



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**Estandarización de un método de diagnóstico  
molecular para la necrosis pancreática  
infecciosa en los salmónidos, utilizando  
controles internos.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

P R E S E N T A:

**EDITH MALDONADO CASTRO**

TUTOR: DR. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ

COMITÉ TUTORAL: DRA. ANA BERTHA MONTERO ROCHA  
DR. RICARDO OROPEZA NAVARRO

**MÉXICO, D. F.**

**2009**



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.

## **DEDICATORIA**

A MIS PADRES **GUILLERMINA** Y **MAXIMINO** POR INCULCARMEL SENTIDO DE LA RESPONSABILIDAD, ESFUERZO Y SUPERACIÓN. GRACIAS POR DARMEL SU AMOR Y APOYO EN TODAS LAS DECISIONES QUE HE TOMADO EN MI VIDA.

A MI HERMANA **RUBÍ** POR ESCUCHARME, APOYARME Y DARMEL LA OPORTUNIDAD DE TENER UNA AMIGA EN ELLA. GRACIAS POR TRAER A LA FAMILIA A MIS CUATRO PRINCESAS: **ESMERALDA, JOCELYN, LESLIE** Y **YADIRA**, QUIENES SON PARA MÍ UN MOTIVO MÁS DE SUPERACIÓN.

A MI HERMANO **ALEJANDRO** POR SU EJEMPLO DE QUE CON TRABAJO Y PREPARACIÓN CONSTANTE SE LOGRA ALCANZAR LA SUPERACIÓN PERSONAL. GRACIAS POR SU GRAN APOYO, INTERÉS Y APORTACIONES QUE REALIZÓ A ESTE TRABAJO JUNTO CON SU ESPOSA **BLANCA**. A ELLA, GRACIAS POR PERTENECER Y SER UN GRAN APOYO PARA MI FAMILIA. PERO SOBRE TODO POR EL GRAN AMOR QUE TIENE A MI HERMANO.

A MI HERMANO **RICARDO** POR NO DESISTIR EN BUSCAR Y CUMPLIR SUS SUEÑOS. POR SER LA ALEGRÍA DE LA FAMILIA Y POR LA BONDAD DE SU CORAZÓN. GRACIAS POR TU CARIÑO Y TU APOYO.

A **JAIME H.** GRACIAS MI AMOR POR TODO TU APOYO Y AMOR. POR PERDONAR MIS ERRORES. PORQUE NUNCA ME DEJASTE CAER Y TOLERASTE MIS MOMENTOS DE TRISTEZA Y FRUSTACIÓN, GRACIAS POR TODOS ESTOS AÑOS EN LOS CUALES RECIBÍ TODA TU COMPRENSIÓN Y ME ALENTASTE A SEGUIR ADELANTE A PESAR DE LOS CONTRATIEMPOS.

**EN ESPECIAL DEDICO ESTA TESIS A MI PRECIOSA ABUELA CARITINA. GRACIAS POR SEGUIR LUCHANDO, POR TUS GANAS DE SEGUIR VIVIENDO, POR TUS CONSEJOS Y POR EL ENORME CARIÑO QUE TRANSMITES.**

## **AGRADECIMIENTOS**

AL **DR. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ** PORQUE SIN CONOCERME CONFIÓ EN MÍ ABRIENDOME LAS PUERTAS DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR. GRACIAS POR TU APOYO, TU INTERÉS Y TU AMISTAD

A MI COMITÉ TUTORAL: A LA **DRA. ANA BERTHA MONTERO ROCHA** POR PROPORCIONAR LAS MUESTRAS DE TRUCHA ARCO IRIS Y LOS REACTIVOS DE LA PRUEBA DE ELISA. AL **DR. RICARDO OROPEZA NAVARRO** POR SU APOYO, PARTICIPACIÓN Y POR LAS APORTACIONES QUE REALIZARON EN CONJUNTO CON LA DRA ANA BERTHA Y EL DR. ANTONIO VERDUGO A ESTE TRABAJO.

AL **DR. DANIEL MARTÍNEZ G** POR SER EL AUTOR INTELECTUAL DE ESTE TRABAJO. PORQUE AUNQUE NO FUISTE OFICIALMENTE MI TUTOR, PLANEASTE Y DISEÑASTE LA ESTRATEGIA EXPERIMENTAL DE ESTE TRABAJO Y SIEMPRE DESEMPEÑASTE TU PAPEL DE ASESOR. GRACIAS DANIEL POR CONCEDERME ESTE GRAN TRABAJO QUE ME DEJÓ MUCHAS ENSEÑANZAS PERO SOBRE TODO GRACIAS POR TUS CONSEJOS Y TU AMISTAD.

AL DR. **ALFREDO CASTAÑEDA** POR COMPARTIR CONMIGO TU TIEMPO, ESPACIO Y CONOCIMIENTOS. GRACIAS POR SER UN GRAN AMIGO Y POR TU DESINTERESADA DISPOSICIÓN EN AYUDARME SIEMPRE QUE NECESITE TU AUXILIO. MIL GRACIAS POR TODAS LAS APORTACIONES QUE HICISTE A ESTE TRABAJO PARA QUE YO PUDIERA SALIR ADELANTE PERO MAS INFINITAMENTE AGRADEZCO TU CONFIANZA, TU AMISTAD Y TU CARIÑO.

A MI JURADO: **DRA SUSANA MENDOZA, DRA LAURA COBOS MARIN, DR. ROGELIO ALONSO MORALES** Y EL **DR. LUIS PADILLA** POR LA PRONTA REVISIÓN, ASÍ TAMBIÉN AGRADEZCO QUE JUNTO CON MI **COMITÉ TUTORAL** HAYAN REALIZADO LAS CORRECCIONES, APORTACIONES Y COMENTARIOS A ESTA TESIS PARA QUE ADQUIRIERA UNA MEJOR PRESENTACIÓN Y UN MEJOR CONTENIDO.

AL **DR. GILBERTO CHÁVEZ GRIS** POR SU APOYO E INTERÉS EN LA CULMINACIÓN DE ESTA TESIS PARA LO CUAL ME OTORGÓ MÚLTIPLES PERMISOS Y AUSENCIAS EN MI TRABAJO.

AL **DR. ANGEL PULIDO** POR SU APOYO Y SU AYUDA PARA REDACTAR EL ABSTRACT.

A LA **FAMILIA VALDEZ GUTIERREZ** POR ACEPTARME EN SU FAMILIA, POR SU APOYO Y POR LOS GRANDES MOMENTOS QUE HEMOS DISFRUTADO JUNTOS. GRACIAS **KATY** POR AYUDARME A MEJORAR LAS FOTOS.

A LA **DRA. FABIOLA VALDEZ ORTEGA** POR AYUDARME Y JUNTO CON **TALI** Y LA **SRA. CARMEN** ME DIERON SU APOYO, CONFIANZA Y COMPARTIERON CONMIGO SU ESPACIO Y CARIÑO.

A **FER** POR TU APOYO, INTERÉS Y AMISTAD. GRACIAS POR QUE EN TODO MOMENTO ME BRINDASTE TU CARIÑO, COMPRENSIÓN Y POR LOS BUENOS MOMENTOS QUE COMPARTIMOS.

A MIS AMIGOS DE GENERACIÓN EN LA LICENCIATURA: **PAOLA** (MAFA), **AMADA**, **MIGUEL ANGEL** Y **ELÍ** POR SU APOYO, COMPRENSIÓN Y CARIÑO.

A MIS AMIGOS DE LA SECUNDARIA: **JOSE LUIS**, **EDUARDO**, **MARCO ANTONIO**, **JORGE**, **GUADALUPE** Y **ERICKA**. PORQUE A PESAR DEL TIEMPO SIGO CONTANDO CON SU AMISTAD Y APOYO.

A **MAU** POR TU AYUDA Y APOYO EN LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO. GRACIAS POR TODO LO QUE HICISTE POR MÍ.

A MI PEPE GRILLO Y AMIGA **GABRIELA**. GRACIAS PEQUE POR LOS BUENOS Y MALOS MOMENTOS COMPARTIDOS. POR ESCUCHARME, POR TUS CONSEJOS Y COMPRENSIÓN PERO SOBRE TODO POR BRINDARME LO MÁS VALIOSO QUE SE PUEDE TENER: TU AMISTAD. GRACIAS POR SER MI HERMANITA Y PORQUE SIEMPRE ESTUVISTE CUANDO TE NECESITE.

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS DEL LMM: **LARISA**, **ILANE**, **ADOLFO**, **EMILIO**, **LUIS**, **MIRIAM**, **JUAN**, **JULIO**, **ZULE**, **ELVIA**, **SRA FRANCIS**, **MARTHA**, **MARI TOÑA** Y **PEPETÓN**. GRACIAS A TODOS POR LOS BUENOS MOMENTOS, POR TODO LO QUE APRENDÍ DE CADA UNO DE USTEDES Y POR LAS INTERMINABLES HORAS DE CHARLA.

A MIS AMIGOS DE GENERACIÓN DE LA MAESTRÍA: **UZIEL**, **ANDIRA** Y **JIMENA** POR SU APOYO Y POR COMPARTIR EL MISMO SENTIR AL REALIZAR LOS ESTUDIOS DE MAESTRÍA.

A LA **DRA. MARCELA FIGUEROA**, **DRA. ESTELA MÉNDEZ**, **DRA. XOCHITL VEGA**, **DR. RAYMUNDO ITURBE** Y AL **DR. JOSÉ ANGEL GUTIERREZ** POR SU INTERES Y APOYO.

AL **CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACyT)** POR HABERME OTORGADO UNA BECA PARA LLEVAR A CABO MIS ESTUDIOS.

**ESTE TRABAJO FUE FINANCIADO MEDIANTE EL PROYECTO SAGARPA 2003 - 002 / 227 “ESTANDARIZACIÓN, ARMONIZACIÓN, INTERCALIBRACIÓN DE LAS TÉCNICAS PARA LA DETECCIÓN DE LAS PRINCIPALES ENFERMEDADES INFECCIOSAS EN SALMÓNIDOS”. RESPONSABLE: DRA ANA BERTHA MONTERO ROCHA Y A TRAVÉS DEL PROYECTO PAPITT IN222307-3 “DESARROLLO Y CONSTRUCCIÓN DE CONTROLES INTERNOS PARA PRUEBAS MOLECULARES DE DIAGNÓSTICO: ENFERMEDADES VIRALES DE ORGANISMOS ACUÁTICOS” RESPONSABLE: M.V.Z. M. EN C. JOSÉ RAMÍREZ LEZAMA**

EXISTE UNA FUERZA MOTRIZ  
MÁS PODEROSA QUE EL VAPOR,  
LA ELECTRICIDAD Y LA ENERGÍA ATÓMICA:

LA VOLUNTAD.

ALBERT EINSTEIN

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>ÍNDICE DE CONTENIDO</b> .....	<b>VI</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>IX</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
1.1 GENERALIDADES .....	3
1.2 ETIOLOGÍA .....	4
1.3 CICLO VIRAL .....	7
1.4 CLASIFICACIÓN .....	9
1.5 RESPUESTA INMUNE .....	9
1.6 FACTORES DE VIRULENCIA .....	11
1.7 EPIDEMIOLOGÍA .....	11
1.8 TRANSMISIÓN.....	13
1.9 PERIODO DE INCUBACIÓN .....	14
1.10 LESIONES Y SIGNOS CLÍNICOS.....	15
1.11 TRATAMIENTO Y CONTROL.....	16
1.12 DIAGNÓSTICO.....	17
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>24</b>
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	<b>25</b>
<b>3. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>26</b>
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
4.1 CÉLULAS HELA EMPLEADAS PARA LA EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL.....	27
4.2 MUESTRAS DE TRUCHA ARCO IRIS EMPLEADAS PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL IPNV.....	27
4.3 EXTRACCIÓN DE ARN A PARTIR DE CULTIVO DE CÉLULAS HELA Y MUESTRAS DE TRUCHA ARCO IRIS.....	28
4.4 EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE CULTIVO DE CÉLULAS HELA.....	29
4.5 ARN TOTAL Y ADN A PARTIR DE CULTIVO DE CÉLULAS HELA TRATADOS CON NUCLEASAS (DNASA Y RNASA) .....	31
4.6 INICIADORES UTILIZADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE B-ACTINA HUMANA, CAI E IPNV .....	32
4.7 RT-PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DE B-ACTINA HUMANA.....	37
4.8 PCR- 1 PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL CAI .....	38
4.9 PCR-2 PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL CAI .....	40
4.10 OBTENCIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES PARA LA CLONACIÓN DEL CAI.....	41
4.11 CLONACIÓN DEL CAI EN UN VECTOR DE EXPRESIÓN .....	42



4.12	EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO.....	43
4.13	PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO PC3.1CAI.....	45
4.14	TRANSFECCIÓN DEL VECTOR PC3.1CAI EN CÉLULAS HELA.....	45
4.15	CONTEO DE CÉLULAS HELA TRANSFECTADAS Y PREPARACIÓN DE CÉLULAS PARA SU CONGELACIÓN.....	46
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>48</b>
<b>6.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>62</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>72</b>
<b>8.</b>	<b>PROSPECTIVAS .....</b>	<b>73</b>
<b>9.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>74</b>

## ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

	Página
Cuadro 1.....	34
Tabla 1a .....	36
Tabla 1b .....	36
Figura 1 .....	33
Figura2.....	33
Figura 3a.....	35
Figura 3b.....	35
Figura 4.....	38
Figura 5.....	39
Figura 6.....	40
Figura 7.....	43
Figura 8a.....	49
Figura 8b.....	49
Figura 9.....	50
Figura 10.....	51
Figura 11.....	53
Figura 12.....	54
Figura13.....	55
Figura14.....	56
Figura 15.....	57
Figura 16.....	58
Figura 17.....	59
Figura18.....	60
Figura 19.....	60
Figura 20.....	61

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>ARNv</b>	Ácido ribonucleico viral
<b>BF-2</b>	Cultivo celular Blue-gill fry
<b>Br-E</b>	Bromuro de etidio
<b>c.b.p</b>	Cuanto baste para
<b>CAI</b>	Control de amplificación interna
<b>CHSE-214</b>	Cultivo celular Chinook salmon embryo
<b>cm</b>	Centímetros
<b>CMV</b>	Citomegalovirus
<b>d</b>	Días
<b>DEPC</b>	Dietil pirocarbonato
<b>DICC<sub>50%</sub></b>	Dosis infectante cultivo celular del 50 %
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>dNTP's</b>	Nucleótidos trifosfatados
<b>EDTA</b>	Ácido etilen diamino tetracético
<b>ELISA</b>	Inmunoensayo enzimático
<b>FHM</b>	Cultivo celular Fathead minnow
<b>Fig</b>	Figura
<b>h</b>	Horas
<b>IFN</b>	Interferón
<b>IPN</b>	Necrosis pancreática infecciosa
<b>IPNV</b>	Virus de la enfermedad de necrosis pancreática infecciosa
<b>IRE</b>	Internal ribosome entry
<b>kDa</b>	Kilodaltones
<b>LB</b>	Medio de cultivo Luria-Bertani
<b>MEM</b>	Minimal Essential Medium
<b>min</b>	minutos
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>NK</b>	Células Natural killer
<b>ORF</b>	Open reading frame
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>PKR</b>	Proteína kinasa dependiente de ARN
<b>r.p.m</b>	Revoluciones por minuto
<b>RTG</b>	Cultivo celular Rainbow trout gonad
<b>RT-PCR</b>	Reverse transcriptase-polymerase chain reaction
<b>RTS</b>	Rainbow trout serum
<b>s/n</b>	sobrenadante
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>seg</b>	segundos
<b>SEM</b>	Simple and efficient method for transformation
<b>TAE</b>	amortiguador Tris-acetato-EDTA
<b>TE</b>	amortiguador Tris- EDTA
<b>UFP/ml</b>	Unidades formadoras de placa por mililitro
<b>UTR</b>	Untranslated region
<b>vol</b>	Volumen

## RESUMEN

Edith Maldonado Castro. “**Estandarización de un método de diagnóstico molecular para la necrosis pancreática infecciosa en los salmónidos utilizando controles internos**”. Bajo la supervisión del Dr. Antonio Verdugo Rodríguez, Dra. Ana Bertha Montero Rocha y el Dr. Ricardo Oropeza Navarro.

La necrosis pancreática infecciosa (IPN) es una enfermedad ocasionada por el virus de necrosis pancreática infecciosa (IPNV) que provoca mortalidades de hasta el 90% en crías de salmónidos. Convencionalmente, el método de detección para IPN es el aislamiento en cultivo celular pero es caro, laborioso y consume demasiado tiempo ya que requiere de 2 a 4 semanas. Debido al impacto económico negativo que ocasiona el IPNV en granjas de salmónidos, es importante contar con técnicas de diagnóstico rápidas, sensibles, específicas y confiables. La transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) es una técnica que cubre las características anteriores y actualmente se emplea en el diagnóstico de IPN. Sin embargo, una de las desventajas es la presencia de resultados falsos negativos que pueden ser causados por inhibidores presentes en las muestras clínicas o adicionados durante el proceso de extracción del ácido ribonucleico (ARN). Un método para estandarizar las pruebas de diagnóstico molecular y estimar la presencia de inhibidores dentro de la muestra clínica es el uso de controles de amplificación interna (CAI); donde la adición del control interno permite la validación del resultado. El objetivo del presente trabajo fue diseñar un CAI y evaluar su aplicación en el diagnóstico de IPN. Para la construcción del CAI primero se amplificó mediante RT-PCR un producto de 394 pares de bases (pb) correspondiente a un fragmento del gen de  $\beta$ -actina humana. La concentración mínima para la amplificación de  $\beta$ -actina humana fue de 60 ng de ARN total de células HeLa. Después, este producto se utilizó como molde para amplificar un producto de 436 pb correspondiente al CAI. Éste consta de un segmento del gen de  $\beta$ -actina humana y en los extremos las secuencias de los iniciadores VP2-1 y VP2-2 que pertenecen a la proteína VP2 del IPNV. Este fragmento fue clonado en un plásmido comercial el cual tiene el promotor de citomegalovirus, posteriormente éste fue nombrado como pc3.1CAI. Con este plásmido se transfectaron células HeLa logrando la expresión del CAI. Se determinó que el nivel de expresión del CAI es menor al del gen de  $\beta$ -actina humana puesto que se hicieron diluciones de ARN total extraído a partir de cultivo celular HeLa transfectado y se logró la amplificación de  $\beta$ -actina humana con 59.3 ng, mientras que con 118.7 ng se logró la amplificación del CAI. Se determinó que se requieren 62,500 células HeLa transfectadas para la amplificación del CAI. Finalmente, las células HeLa transfectadas se utilizaron con 30 muestras clínicas sospechosas, en conjunto se realizó la extracción de ARN hasta la RT-PCR utilizando los iniciadores VP2-1 y VP2-2. El CAI se evaluó en el diagnóstico molecular de IPNV en muestras de trucha arco iris, donde la adición de este control fue adecuado para detectar resultados falsos negativos.

**Palabras clave:** IPNV, control de amplificación interna, resultados falsos-negativos.

## **ABSTRACT**

Edith Maldonado Castro. “**Standardization of a molecular diagnostic method for infectious pancreatic necrosis in salmonids using internal controls**”. Under the supervision of Dr. Antonio Verdugo Rodríguez, Dra. Ana Bertha Montero Rocha and Dr. Ricardo Oropeza Navarro.

Infectious pancreatic necrosis (IPN) is a disease caused by the infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). This virus is responsible of 90% of mortalities in fingerlings. Traditionally, the procedure for IPN diagnosis is based on the isolation of IPNV in susceptible cell lines. However, this procedure is expensive, hard-working and delayed because it requires 2 to 4 weeks. Due to the negative economic impact in farmed salmonids caused by IPNV; fast, sensitive, specific and accurate methods of diagnosis are required. The reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) is a technique that currently is used for detecting IPN. However, one of the disadvantages is the presence of false-negative results. It can be due to inhibitors present in the samples or during the ribonucleic acid (RNA) extraction. A method for standardization the molecular diagnosis and monitoring the presence of inhibitors within the sample is the use of internal amplification controls (IAC), where the addition of internal control allows the validation of the results. The objective of this work was to design an IAC and validate its use in the diagnosis of IPN. The first step for the IAC construction was the amplification through RT-PCR of a 394 base pair (bp) of the human  $\beta$ -actin gene. The minimum concentration for the amplification of the human  $\beta$ -actin was with 60 ng of total RNA of HeLa cells. After that, this product was used as template for the amplification of a product of 436 bp which corresponds to the IAC. This segment contains a human  $\beta$ -actin gene segment and on the extremes the primers VP2-1 and VP2-2, which correspond to the protein VP2 of IPNV. This fragment was cloned in a commercial plasmid which has the cytomegalovirus promoter which was named pc3.1CAI. HeLa cells were transfected with this plasmid achieving the expression of IAC. In this experiment we found that the level of IAC expression is less to the human  $\beta$ -actin gene expression. Since the highest dilution of the RNA extracted from the cells HeLa transfected where we achieved the amplification of human  $\beta$ -actin contained 59.3 ng. In contrast, with 118.7 ng the amplification of IAC was also achieved. At the same time the amount of transfected HeLa cells required for the IAC amplification are 62,500. Finally, the transfected HeLa cells were used with 30 clinical samples suspicious from the RNA extraction to the RT-PCR, using the primers VP2-1 and VP2-2. IAC was evaluated in the molecular diagnosis of IPNV in samples of rainbow trout, where the addition of this control was adequate for detecting false-negative results.

**Key words:** IPNV, Internal amplification control, false-negative results.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 GENERALIDADES

La necrosis pancreática infecciosa (conocida como IPN por sus siglas en inglés: *infectious pancreatic necrosis*) es una enfermedad viral aguda altamente contagiosa que afecta a crías de distintas especies de salmónidos que son cultivados bajo sistemas intensivos. Sin embargo, esta enfermedad aparece en salmones jóvenes cuando son sometidos a condiciones de estrés, por ejemplo, cuando éstos son criados en agua dulce y posteriormente son transferidos a agua salada. Los efectos más devastadores se observan en granjas productoras de crías de truchas, ya que la presencia de alguna cepa virulenta puede causar mortalidades por arriba del 70% en un periodo de 2 meses (Roberts *et al.*, 2005). La susceptibilidad disminuye con la edad, dado que los brotes de mortalidad más explosivos se presentan en crías que tienen una talla menor a los 5 centímetros (cm)

Esta enfermedad tiene un impacto económico negativo en la acuicultura y en la industria productora de salmones debido a la mortalidad que ocasiona en crías y juveniles, respectivamente (Wolf *et al.*, 1960). En Estados Unidos en 1996, se calculó que las pérdidas económicas en la acuicultura debidas a IPN, fueron más de 60 millones de dólares (Midtlyng *et al.*, 2003). Mientras que en México no existen cifras que muestren las pérdidas económicas que genera IPN en el país.

La trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*), trucha café (*Salmo trutta*), salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y las diferentes especies del salmón del pacífico (*Oncorhynchus spp.*) son las especies donde se presenta el cuadro clínico característico. Sin embargo, también se han

detectado infecciones subclínicas encubiertas en un amplia diversidad de peces tanto de agua dulce como salada, por ejemplo: pez dorado (*Carasius auratus*), rodaballos (*Scophthalmus maximus*), lenguados (*Solea senegalensis*), lucio (*Esox lucius*) y anguilas (*Anguilla spp*). Mientras que en moluscos y crustáceos como el, mejillón azul (*Mytilus galloprovincialis*), ostión japonés (*Crassostrea gigas*) y cangrejo de río (*Astacus astacus*) se ha logrado aislar el virus y se considera que intervienen como vehículos en ésta enfermedad (Adair *et al.*, 1981).

## 1.2 ETIOLOGÍA

La enfermedad fue descrita por primera vez en Canadá en 1940 por M' Gonigle (M' Gonigle, 1941), pero no fue hasta 1955 que Wood, Snieszko y Yasutake revelaron la naturaleza del agente infeccioso; mencionando el posible origen viral (Wood *et al.*, 1955). Posteriormente, este hallazgo fue confirmado por Wolf, quien en 1957 aisló la primera cepa del virus de necrosis pancreática infecciosa a partir de muestras de trucha de arroyo, considerándose tal evento, como el primer aislamiento *in vitro* de virus de peces (Wolf, 1988).

El virus de necrosis pancreática infecciosa (IPNV, *infectious pancreatic necrosis virus*), pertenece a la familia Birnaviridae. Esta familia comprende tres géneros: Aquabirnavirus, al cual pertenece el IPNV; Avibirnavirus, donde se encuentra el Virus de la enfermedad de la bursa infecciosa que afecta a los pollos y el género Entomobirnavirus, al cual pertenece el Virus X de la mosca de la fruta (Brown, 1984; Dobos, 1995a).

Se ha propuesto que solamente los Aquabirnavirus que infectan salmónidos sean denominados como IPNV, mientras que a los virus que se han aislado de otras especies diferentes a los salmónidos se les designe solamente como Birnavirus (Maroni, 2003).

El IPNV es un virus sin envoltura con simetría icosaédrica ( $T=13$ ). El diámetro de su cápside mide aproximadamente 60 nm (Dobos, 1976) y su genoma consiste de dos segmentos de ácido ribonucleico (ARN) de cadena doble. El segmento más grande denominado segmento A [3,097 pares de bases (pb)] posee dos marcos abiertos de lectura (ORF: *open reading frame*); el ORF mayor codifica para un polipéptido precursor de 106 kilodaltones (kDa) el cual es co-traduccionalmente cortado por la proteasa viral conocida como NS o VP4 (29 kDa) para generar las dos proteínas que componen la cápside: pVP2 (62 kDa) y VP3 (31 kDa) (Dobos, 1977; Duncan *et al.*, 1987). Posteriormente, la pVP2 es cortada durante la maduración del virus para generar la proteína VP2 (54 kDa) (Dobos, 1995a; Duncan *et al.*, 1987) y tres pequeños péptidos que son liberados al ser cortados de la poliproteína en los aminoácidos 443-486, 487-495 y 496-508, respectivamente. Actualmente, no se sabe cual es el papel en el que intervienen estos pequeños péptidos (Galloux *et al.*, 2004).

La VP2 es la proteína más expuesta y que se encuentra en mayor cantidad en la cápside, puesto que representa el 62 % de la totalidad de las proteínas virales. La importancia de ésta proteína radica en que es inmunogénica y su variabilidad determina la virulencia del virus. Otra característica relevante de la VP2 es que actúa como proteína de unión a las células que infecta el virus. (Dobos, 1995a; Nicholson, 1993, Granzow *et al.*, 1997). VP3 es otra proteína de la



cápside y actúa en el ensamblaje de la partícula viral, su extremo C-terminal se une al ARN viral (ARNv) formando la ribonucleoproteína (Hjalmarsson *et al.*, 1999). En el segundo ORF del segmento A, está codificada una proteína no estructural llamada VP5 (17 kDa). En la actualidad esta proteína es detectada sólo en células infectadas y es sintetizada en pequeña cantidad en la fase inicial de la multiplicación viral (Duncan *et al.*, 1987; Dobos, 1995a). Estudios recientes, han demostrado que no es necesaria para la replicación viral *in vivo* y no está involucrada en el establecimiento de la infección y virulencia del virus (Santi *et al.*, 2005a). Aunque aun no se conoce con exactitud su función, existen estudios en donde mencionan su probable actividad antiapoptótica (Hong y Wu, 2002).

El segmento B (2,784 pb) codifica una sola proteína llamada VP1 (94 KDa). Ésta proteína es una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) que se encuentra en 2 formas: como una proteína libre o como proteína unida covalentemente al extremo 5' de ambos segmentos del genoma viral conocida como VPg (Dobos, 1995a; Dobos, 1995b; Duncan *et al.*, 1991). La VPg sirve como cebador al unirse a los extremos 5' de cada segmento formando una estructura de reconocimiento que le indica a la ARN polimerasa del virión donde iniciar la replicación (Dobos, 1995b).

Ambos segmentos (A y B) poseen regiones no codificantes, las cuales son importantes para el reconocimiento de la polimerasa, iniciación de la traducción y empaquetamiento del genoma (Duncan *et al.*, 1991).

### 1.3 CICLO VIRAL

El ciclo de replicación del virus consta de varios pasos, primero el virus debe unirse por medio de la VP2 a un receptor específico que se encuentra en la superficie de la célula hospedera. Aunque a la fecha no se conoce la naturaleza y el origen de este receptor su unión marca el tropismo del virus. Se conoce que en células susceptibles, el virus se adhiere en forma específica e inespecífica a proteínas presentes en la membrana plasmática celular y también se sabe que éstas tienen un peso molecular entre 100 y 200 kDa (Dobos, 1995a) las cuales podrían actuar como receptores del virus (Kuznar *et al*, 1995). Una vez que el virus se adhiere a la célula, éste se interna a través de endocitosis en vesículas cubiertas por clatrina que posteriormente adquieren un pH ácido dando lugar a que el material genético viral se libere desde el endosoma al citosol (Kuznar *et al*, 1995). La replicación se realiza en el citoplasma celular, es decir el genoma viral y sus proteínas nunca ingresan al núcleo celular. Para el proceso de replicación a partir de ARN de cadena doble, la VP1 produce varias copias de ARN de cadena sencilla con sentido negativo, estas cadenas son utilizadas para formar los ARNv de sentido positivo y así tener varias copias de ARN cadena doble. Por otra parte, el proceso de transcripción produce ARN cadena sencilla sentido positivo de ambos segmentos que funcionan como ARN mensajero (ARNm). Los ARNm son llevados a los ribosomas celulares donde ocurre el proceso de traducción para la producción de las proteínas virales, tanto estructurales como no estructurales. Puesto que los ARNm del virus no tienen CAP en su extremo 5', el virus utiliza un mecanismo de inicio de la traducción mediado por sitios internos de entrada al ribosoma (IRES: *Internal ribosome entry site*) presentes en el extremo 5' no

traducible (5' UTR: *Untranslated region*) al que la VP1 se encuentra unida. Puesto que no se conoce con exactitud como lleva a cabo en este virus el inicio de la traducción independiente de CAP, comparado con los otros Birnavirus se sugiere que el inicio de la traducción se favorece porque la VPg una vez unida al ARNm interactúa con el factor de inicio de la traducción eIF4A y realiza la función que los factores eIF4E y eIF4G desempeñan en la traducción dependiente de CAP. Así la VPg une a eIF4A al extremo 5' del ARNm viral colocándolo en una estructura secundaria del ARNm desenrollado que sirve como plataforma por apareamiento de bases al complejo de preiniciación 43S entre el sitio de unión del ARN ribosomal 18S y en la unidad ribosomal 40S (Dobos, 1995b).

Una vez que se han producido las proteínas virales; el ensamble de los proviriones (partículas no infecciosas compuestos por proteínas precursoras) ocurre cuando la VP4 realiza cortes proteolíticos en sitios activos en las proteínas VP3 y pVP2 dando lugar a la formación de proteínas estructurales maduras que conforman los viriones, es decir partículas con propiedades infectantes. Finalmente, el proceso de liberación de los viriones infectantes sucede mediante lisis celular (Villanueva *et al.*, 2004). Un solo ciclo de replicación toma de 18 a 22 horas (h) a una temperatura entre 15 y 18°C y los ARNm del virus pueden ser detectados en las células infectadas 3 a 4 h post infección (p.i). Mientras que en líneas celulares con una temperatura de incubación de 22°C, un ciclo de replicación ocurre entre 16 a 20 h p.i mostrando un efecto citopático en el cultivo celular caracterizado por la pérdida de la integridad de las células y de la monocapa que termina en una destrucción celular (Dobos, 1977; Kuznar *et al.*, 1995; Hjarmarsson y Everitt, 1999).

## **1.4 CLASIFICACIÓN**

Debido a sus características antigénicas el IPNV se divide en dos serogrupos, el A que incluye nueve serotipos: A1 (West Buxton) también conocido como VR299, A2 (Spajarup), A3 (Abild), A4 (Hecht), A5 (Tellina), A6 (Canadá 1), A7 (Canadá 2), A8 (Canadá 3) y A9 (Jasper). El serogrupo B incluye un solo serotipo: B1 (TV-1) considerado como no patógeno (Caswell-Reno *et al.*, 1989). Actualmente, se utilizan las secuencias del genoma de los Aquabirnavirus para proponer la formación de genogrupos, que no coinciden totalmente con la clasificación de serogrupos (Heppell *et al.*, 1993; Hosono *et al.*, 1996). El análisis de la secuencia completa deducida del producto del gen VP2 mostró que los nueve serotipos inicialmente descritos para los Aquabirnavirus del serogrupo A, quedaban agrupados en seis genogrupos (Blake *et al.*, 2001). Nishizawa y col. en el 2005, utilizando el análisis de la región VP2/NS del segmento viral A, propusieron un séptimo genogrupo, sin embargo no hay correlación completa con los genogrupos propuestos por Blake (Nishizawa *et al.*, 2005).

## **1.5 RESPUESTA INMUNE**

Durante al proceso de infección, el hospedero responde para tratar de impedir la infección o diseminación del agente. Para esto, en los teleósteos la medida de protección más importante es el sistema de defensa innato, dentro de éste se encuentra el interferón (IFN), el cual es una citocina que impide la replicación de las células infectadas que aún no han sido destruidas por la acción vírica. Otra función importante del IFN es activar a los linfocitos llamados asesinos naturales (NK, del inglés *natural killer*). Las células NK actúan reconociendo y

eliminando a las células infectadas por el virus. El IFN también actúa induciendo la producción de proteínas que tienen actividad antiviral, como la proteína Mx1 y la proteína quinasa dependiente de ARN doble cadena (PKR) en el caso de IPNV (Robertsen, 2005).

La inmunidad humoral contra IPNV se ha observado en infecciones *in vivo* o inmunización con virus inactivo donde se producen anticuerpos neutralizantes del tipo IgM contra las proteínas VP2 y VP3 (Jarp *et al*, 1996). Sin embargo, la presencia de estos anticuerpos no es capaz de prevenir la infección o eliminar el estado portador (Rodríguez *et al*, 2003, Munro *et al.*, 2006).

En cuanto a la inmunidad específica desarrollada ante IPNV, existe un factor sérico presente en el suero de trucha arco iris llamado RTS (por sus siglas en inglés, *Rainbow trout serum*) que actúa inactivando el virus. La inactivación viral por parte del RTS es por acción de una proteína conocida como 6S (por su coeficiente de sedimentación). Esta proteína no es inducida por IFN o por unión a receptores celulares. Park y Reno en el 2003 realizaron ensayos *in vitro* en los cuales incubaron células FHM (*Fathead minnow*) con IPNV en presencia de 1.3 % de RTS durante 20 minutos; aproximadamente el 97% de los virus no fueron adsorbidos; mientras que en ausencia de RTS, el 45% de virus fue adsorbido. Después del experimento concluyeron que la disminución en la adsorción se debió al bloqueo del virus para unirse a la superficie celular. También demostraron que el pre-tratamiento de las células con RTS previo a la exposición de IPNV no afectó la inhibición de IPNV, demostrando que el suero no ocupa los receptores virales (Park y Reno, 2003).

## **1.6 FACTORES DE VIRULENCIA**

El IPNV produce una proteína que le permite infectar eficazmente y asegurar su replicación evitando que la célula muera por la inducción de apoptosis mediante represión del gen del factor de supervivencia *mcl-1*. Dicho gen produce la proteína Mcl-1, ésta es un miembro de la familia de proteínas intracelulares Bcl-2 que incluye a moléculas pro y anti apoptóticas (Hong *et al*, 1998; Hong *et al*, 1999). Actualmente, se conoce que la proteína que reprime al gen *mcl-1* es la VP5 del IPNV, la cual contiene dominios homólogos a los que presentan las proteínas anti apoptóticas de la familia Bcl-2. También se ha demostrado que el IPNV utiliza a la VP5 como un mecanismo para evadir la respuesta de defensa de la célula hospedera sobre todo al inicio de la infección, impidiendo la apoptosis de las células infectadas para que las partículas virales tengan la oportunidad de madurar y ser infectantes. Diversos investigadores han verificado la información anterior y por lo tanto contemplan que dicha proteína se considere como un factor de virulencia en el IPNV (Santi *et al*, 2004; Santi *et al*, 2005b).

## **1.7 EPIDEMIOLOGÍA**

El IPNV se ha aislado de diferentes ambientes y diferentes hospederos. Los aislamientos muestran una amplia diversidad antigénica y diferencias notables en el grado de virulencia, pero independientemente del hospedero, o de su origen geográfico, la mayoría de los aquabirnavirus parecen estar relacionados antigénicamente (Caswell-Reno *et al.*, 1986; Hill y Way, 1995).

El IPNV tiene un amplio rango de distribución geográfica, se encuentra en las principales granjas productoras de salmónidos a lo largo de todo el continente

Americano, principalmente en Norteamérica y Sudamérica, también se ha reportado en Europa y Asia, por lo que se considera una enfermedad de distribución mundial. El virus ha sido reportado en varios países como Australia, Canadá, Chile, Dinamarca, Escocia, España, Finlandia, Francia, Inglaterra, Italia, Japón, Noruega, Suiza y México (Reno, 1999; OIE, Código Sanitario Internacional para los animales acuáticos, 2004).

En Europa, el primer reporte conocido ocurrió en Francia en 1964, en muestras de trucha arco iris. Posteriormente, en Dinamarca se identificaron las cepas Sp y Ab (Hill y Way, 1995).

En Asia, los primeros aislamientos del virus fueron obtenidos en Japón en 1971 por Sano (Sano, 1971).

Posteriormente, en Nueva Zelanda en 1987, se aisló el virus en salmón chinook (*O. tshawytscha*) procedente de una importación de salmón proveniente de Japón (Tisdall y Phipps, 1987).

En el 2000 en Tasmania, Crane y colaboradores aislaron el virus a partir de trucha arco iris, salmón del Atlántico y en diferentes especies de peces marinos (Crane *et al*, 2000).

En México en el 2001, se identificó este agente viral en granjas de crías de trucha arco iris provenientes de Estados Unidos de América (Ortega *et al.*, 2002). Después Guerrero en el 2008, aisló y genotipificó una cepa de IPNV denominado Edomex07, procedente de granjas de reproductores de trucha arco iris en el Estado de México. Mediante análisis filogenético de una región del gen VP2 de este virus lo ubicó en el genogrupo 1, el cual incluye a las cepas Buhl, West Buxton y el aislado mexicano del 2002 (Guerrero *et al.*, 2008).

También se ha observado una distribución geográfica de los diferentes serotipos virales. El serotipo West Buxton se encuentra en Estados Unidos y en Canadá, mientras que los serotipos Canadá 1, 2, 3 y Jasper raramente se encuentran en Estados Unidos. Los serotipos Sp y Ab están diseminados en toda Europa y Asia (Caswell-Reno *et al*, 1986).

## **1.8 TRANSMISIÓN**

Los peces infectados pueden transmitir el virus de forma horizontal y vertical (Reno, 1999).

La enfermedad es transmitida vía horizontal cuando las partículas virales son eliminadas junto con las heces y éstas tienen contacto con las branquias, poros sensoriales de la línea lateral y el sistema digestivo de otros peces (Wolf, 1988; Novoa *et al*; 1995; Chou *et al*, 1999). Se ha demostrado que la transmisión vertical ocurre en ovarios y espermatozoides de trucha arco iris y trucha café, mientras que en otras especies se ha mencionado la presencia del virus sólo en los huevos fertilizados (Anhe *et al.*, 1989; Anhe y Negele, 1985) debido a que se asocia que el virus se encuentra sólo en los espermatozoides (Mulcahy y Pascho, 1984). Los peces adultos que sobreviven después del contagio generalmente actúan como portadores sanos ya que no manifiestan signos clínicos, los cuales representan un riesgo muy importante para la acuicultura y el ambiente (Sadasiv, 1995).



Por otra parte, los moluscos, cangrejos y aves piscívoras pueden actuar como vehículos y diseminar la enfermedad al liberar el virus en otros estanques donde se cultivan peces (Halder y Ahne, 1992).

## **1.9 PERIODO DE INCUBACIÓN**

El periodo de incubación de IPN es muy variable, ya que el tiempo requerido para la presentación de la enfermedad depende de diversos factores como la temperatura del agua, edad del pez, la especie involucrada, la condición fisiológica del hospedero, la virulencia de la cepa y la concentración viral. Por ejemplo, con relación al factor ambiental, los periodos de incubación son cortos cuando la temperatura del agua se encuentra entre 10 y 16°C, ya que el tiempo es de 3-6 semanas y el porcentaje de mortalidad es alrededor de un 70%. Por el contrario, un brote puede persistir durante más de 4 meses cuando la temperatura del agua oscila entre 4 y 6°C, pero el porcentaje de mortalidad disminuye radicalmente comparado con el que se presenta cuando la temperatura del agua se encuentra entre 10 y 16°C (Dobos, 1976).

En condiciones de laboratorio, el IPNV tiene un período de incubación más corto en comparación con las condiciones de infección natural y esto va asociado con la vía de inoculación utilizada. Por ejemplo, después de un periodo de viremia no detectable, la eliminación del virus ocurre dos días después de la inoculación intraperitoneal y disminuye aproximadamente a los 12 días después de la exposición. En éstas condiciones se reportan periodos de incubación de aproximadamente 2 semanas (Bebak *et al.*, 1998).

## 1.10 LESIONES Y SIGNOS CLÍNICOS

En los salmónidos, el virus causa un cuadro de gastroenteritis aguda y destrucción del páncreas (necrosis focal) en etapas tempranas de la vida, causando la mortalidad característica (Mcknigth y Roberts, 1976).

Las lesiones histológicas indican una infección viral aguda, con destrucción extensa y progresiva de células acinares pancreáticas, escaso infiltrado inflamatorio; el tejido endocrino y las células adiposas circundantes se muestran normales o con escasa necrosis (Mcknigth y Roberts, 1976; Wolf, 1998). En el estómago e intestino anterior se presenta degeneración y necrosis (Smail *et al*; 2006), desprendimiento de la mucosa (enteritis catarral) hacia el lumen intestinal, donde se pueden observar células epiteliales con citoplasma hialino eosinofílico, con núcleo fragmentado formando acúmulos de material basofílico distribuido en la periferia celular, estos hallazgos son indicativos de un proceso de apoptosis en células llamadas McKnight (Mcknigth y Roberts, 1976). En hígado se pueden encontrar áreas de necrosis focal o generalizada, estas lesiones suelen ser severas en el salmón, mientras que en trucha arco iris son más moderadas (Roberts y Pearson 2005). También se observa degeneración y necrosis hematopoyética renal.

Los signos clínicos macroscópicos más comunes en las crías son pigmentación oscura de la piel, exoftalmia, anorexia, abultamiento abdominal, pérdida de peso, branquias pálidas, hemorragias cecales, secreción anal de material mucoso y movimientos natatorios en forma de espiral con intervalos de ataxia (Wolf, 1998), aunque cabe mencionar que ninguno de estos signos es específico de esta enfermedad. En una epidemia, el primer evento que llama la

atención es la aparición de mortalidades en crías las cuales disminuyen conforme la edad del pez es mayor. Las crías que inician la primera alimentación son más susceptibles a la infección ya que lo anterior genera en ellas una situación de estrés y por lo tanto el porcentaje de mortalidad que se presenta puede variar de un 70% hasta más del 90% dependiendo de diversos factores, como la cepa del virus, el título viral, el hospedero y el ambiente (Mc Allister y Owens, 1995; Okamoto *et al.*, 1984; Dobos y Roberts, 1983).

En animales más grandes que tienen alrededor de 4 a 6 meses de edad, los peces infectados sufren una infección inaparente y las mortalidades que se presentan son entre el 10 y 20% (Dorson y Torchy, 1981; Reno, 1999; Roberts y Pearson, 2005).

### **1.11 TRATAMIENTO Y CONTROL**

Aunque existen varios compuestos antivirales que inhiben la replicación en cultivo celular; por ejemplo, la ribavirina, la pirazofurina y el 5-etinil-1- $\beta$ -D-ribofuranosilimidazol-4-carboximida (EICAR), no existe un tratamiento eficaz contra el IPNV (Migus y Dobos, 1980; Jashes *et al.*, 1996; Jashes *et al.*, 2000).

Existen vacunas inactivadas, pero su protección no es al 100 % y su uso se justifica sólo en reproductores de alto valor comercial. Los métodos de prevención se basan en la implementación de medidas de control en las granjas de producción y en prácticas de higiene en la crianza de los salmónidos, como evitar la introducción y movilización de huevos fertilizados y crías provenientes de lotes de reproductores portadores de IPNV. Por lo anterior, se recomienda utilizar

reproductores certificados como libres de la enfermedad y tener un suministro de agua libre de peces, por ejemplo; de pozo o de manantial (Morley, 1993). Sin embargo, esta última recomendación se ajusta sólo a algunas granjas productoras de trucha presentes en México. Otra medida para controlar el impacto de la mortalidad en las explotaciones productoras de trucha es la reducción en la densidad de la población.

Para el control del IPNV en granjas de reproductores, se recomienda el sacrificio de los peces infectados y su progenie (huevos, alevines y crías), puesto que la desinfección de los huevos fertilizados no es totalmente efectiva para prevenir la transmisión (Bullock *et al*; 1976). Una vez que son eliminados los peces infectados es conveniente realizar la desinfección de los estanques y secado sanitario de la granja de producción.

## **1.12 DIAGNÓSTICO**

El método de detección más habitual para el IPNV en peces infectados es el aislamiento del virus en líneas celulares susceptibles procedentes de especies homólogas (Wolf y Quimby, 1971; Ahne, 1978; Adair y Ferguson, 1981; McAllister y Reyes, 1984). Aunque existen varias líneas celulares derivadas de diferentes especies de peces, solamente tres son empleadas rutinariamente para el diagnóstico porque muestran más susceptibilidad para observar efecto citopático con un amplio rango de cepas dichas líneas son: RTG-2 (*rainbow trout gonad*), CHSE-214 (*chinook salmon embryo*) y BF-2 (*blue-gill fry*) (Wolf y Quimby, 1962). Aunque el aislamiento viral es una técnica ampliamente utilizada en muchos

laboratorios, el resultado de este método depende de la sensibilidad de la línea celular, la cual está determinada por diversos factores como la edad de la monocapa y el linaje de la línea celular, donde estos factores pueden producir resultados falsos negativos. Por otra parte, el aislamiento de virus en cultivo celular es una técnica cara y que consume tiempo, además se requiere personal capacitado y el tiempo requerido para el aislamiento e identificación del agente es de 2 a 4 semanas (Dopazo y Barja, 2002).

El diagnóstico de los casos clínicos se basa normalmente en la detección directa o indirecta de IPNV. La técnica directa utilizada comúnmente es mediante la demostración de la presencia de IPNV en cultivo celular y una vez que el virus es aislado, se requiere identificarlo usualmente por técnicas serológicas mediante pruebas de seroneutralización, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, inmunodot, e inmunoensayo enzimático (ELISA) (OIE, 2004; Lientz y Springer, 1973; Davis *et al.*, 1994; Sanz y Coll, 1992). La prueba de seroneutralización se realiza con anticuerpos monoclonales específicos para el IPNV. Esta técnica es la más empleada ya que es fácil de realizar y de interpretar pero tiene la desventaja de ser laboriosa y se requiere de 1 a 4 semanas para obtener un resultado confirmatorio (Lientz y Springer, 1973). Otra situación que debe considerarse en la prueba de seroneutralización es la disponibilidad en la obtención de los anticuerpos. En cuanto a la prueba de inmunofluorescencia se debe considerar el título viral y la necesidad de muestras recientes, y tiene la desventaja de la autofluorescencia y la reacción cruzada. La técnica de inmunohistoquímica tiene algunas ventajas sobre la inmunofluorescencia, como la eliminación de la tinción de fondo, el uso de microscopio de luz y la posibilidad de mantener los resultados

por un mayor periodo. Sin embargo, sus desventajas son la necesidad de observar e identificar una muestra a la vez y no es una técnica adecuada que se utilice para el diagnóstico en animales portadores del virus. Aunque la técnica de inmunodot se ha utilizado con ayuda de anticuerpos monoclonales para detectar y cuantificar virus por ser una técnica sencilla, rápida y que requiere una baja cantidad de anticuerpos, los resultados obtenidos demostraron que posee baja sensibilidad para detectar el IPNV comparada con las técnicas anteriores. (Wolf y Quimby, 1971; McMichael *et al.*, 1978).

En el 2001 Rodríguez y col evaluaron cinco métodos serológicos: inmunoensayo enzimático, inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa, inmunodot blot, citometría de flujo y Transcripción Reversa-Reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR, por sus siglas en inglés: *reverse transcriptase-polymerase chain reaction*) para la detección de IPNV. En este estudio concluyeron que las técnicas RT-PCR y citometría de flujo fueron las pruebas más sensibles y rápidas para detectar el IPNV, ya que con la técnica de RT-PCR se detectaron títulos virales de  $1 \times 10^3$  DICC<sub>50</sub>/ml (dosis infectante cultivo celular del 50 % por mililitro) 4 horas post-inoculación en cultivo celular y con citometría de flujo se detectaron  $1 \times 10^2$  DICC<sub>50</sub>/ml 6 horas post-inoculación. Por otra parte, la RT-PCR pudo ser aplicada en la detección y diferenciación del virus en muestras de órganos de peces portadores así como en leucocitos, células del bazo, riñón y en cultivo celular, con un 100 % de detección en muestras positivas (Rodríguez *et al.*, 2001).

El uso de métodos de diagnóstico molecular aplicados a la detección, identificación y tipificación del IPNV, evita los inconvenientes asociados con el aislamiento en cultivo celular y con la identificación serológica, ya que la detección

e identificación del virus se puede hacer directamente de los tejidos de peces infectados. Sin embargo, se tienen otras desventajas como la necesidad de optimizar la extracción del ácido nucleico viral y reducir o eliminar inhibidores que interfieren con las técnicas moleculares (Wiedbrauk y Farkas, 1995).

Actualmente se han desarrollado varios métodos de detección para el IPNV basados en la técnica de RT-PCR. La técnica de RT-PCR apenas comienza a ser utilizada en el diagnóstico de virus que afectan a los peces, su uso se ha incrementando debido a las ventajas mostradas como una técnica rápida, confiable y sensible. (Rimstad *et al.*, 1990; López-Lastra *et al.*, 1994; Blake *et al.*, 1995; Rodríguez *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1997; Alonso *et al.*, 1999, Taksdal *et al.*, 2001). Esta tecnología ha sido empleada para la identificación de virus aislados en cultivo celular o para confirmar la etiología de aislamientos identificados por métodos tradicionales como seroneutralización.

Ejemplos claros de la implementación de métodos de diagnóstico moleculares para el diagnóstico de IPNV son los trabajos de Blake y colaboradores que en 1995 desarrollaron una RT-PCR demostrando su sensibilidad al detectar aquabirnavirus directamente en tejidos de peces. La sensibilidad de la prueba fue comparable a los ensayos de cultivo celular en el cual reportaron un nivel de detección de  $10^{3.2}$  a  $10^{4.6}$  UFP/ml (unidades formadoras de placa por mililitro) en tejidos infectados (Blake *et al.*, 1995).

Posteriormente en 1997, Wang y colaboradores, modificaron la RT-PCR de dos pasos empleada por Blake por la RT-PCR en un solo paso, la cual es más rápida, disminuye el riesgo de contaminación de la muestra al reducir su manejo y reduce la cantidad de reactivos utilizados durante la amplificación del ARN.

Finalmente, en 1999, Williams y col reportaron la amplificación del IPNV a partir de una suspensión viral usando el juego de iniciadores WB1 y WB2 los cuales amplifican un producto de 206 pb correspondientes a la región VP2. En este trabajo, reportaron una sensibilidad de detección de 100 DICC<sub>50</sub>/ml. Sin embargo en muestras de tejidos la sensibilidad no fue determinada (Williams *et al.*, 1999).

Aunque la RT-PCR es ampliamente utilizada en el diagnóstico de diversas enfermedades infecciosas y puede ser empleada en programas de vigilancia y control sanitario, tiene como desventaja la presencia e interpretación de resultados falsos negativos (muestras reportadas como negativas aun cuando el patógeno está presente) que pueden ser causados por agentes inhibidores de la reacción (Pallen *et al.*, 1992). Con frecuencia se encuentran componentes inhibidores que están presentes en las muestras biológicas, los cuales pueden reducir la sensibilidad e inhibir la reacción cinética de la prueba (Radstrom *et al.*, 2004). Estos agentes inhibidores pueden ser reactivos usados durante la extracción de los ácidos nucleicos o componentes presentes en las muestras clínicas como grasa, calcio, sales biliares, urea, hemoglobina o durante su obtención con el uso de heparina en muestras de sangre (Abu Al-Soud y Radstrom, 2001). Numerosos estudios demuestran que existen sustancias inhibidoras, éstas pueden actuar durante la extracción de los ácidos nucleicos, al degradar o secuestrar los ácidos nucleicos, o inhibiendo la Polimerasa. Sin embargo, aunque existen una gran variedad de inhibidores, en la mayoría de los casos no se sabe la manera en la que actúan (Wilson, 1997). Estas sustancias no son completamente removidas durante el proceso de extracción de los ácidos nucleicos e inclusive la utilización



de detergentes, proteasas, fenol y cloroformo para la remoción de las mismas pueden interferir con la amplificación de ácidos nucleicos (Rolfs *et al* 1992). La presencia de los inhibidores mencionados anteriormente sumado a la variación en el diseño de los termocicladores, la eficiencia de las diferentes ADN polimerasas y la persona que realiza la técnica dificulta que la RT-PCR sea reproducible (Hoorfar *et al.*, 2004).

Un método para estandarizar las pruebas de diagnóstico molecular y estimar la presencia de inhibidores dentro de la muestra clínica es el uso de controles de amplificación interna (CAI) (Pasloske *et al.*, 1998). Un CAI es una secuencia de ADN no blanco presente en el mismo tubo donde se tiene la muestra en la que se busca la secuencia de interés (secuencia blanco) y que es coamplificada simultáneamente bajo las mismas condiciones de la reacción (Rosenstrauss *et al.*, 1998). Los CAI se dividen en competitivos y no competitivos. Los CAI de tipo competitivo consisten en amplificar con un solo juego de iniciadores la secuencia de interés y el control interno bajo las mismas condiciones y en el mismo tubo de reacción; mientras que en los CAI de tipo no competitivo se amplifican en el mismo tubo la secuencia blanco y el control usando para cada uno un juego diferente de iniciadores (Siebert y Larrick, 1992; Hoorfar *et al*, 2003).

El uso de CAI en la técnica RT-PCR permite tener una validación en el resultado positivo o negativo de la prueba ya que, la presencia de la amplificación del control y la ausencia del producto de amplificación de la muestra sospechosa significa que la secuencia buscada de la muestra sospechosa no estaba presente en la reacción (Sachadyn y Kur, 1998).

El diseño de un control interno para el diagnóstico en ensayos de RT-PCR es factible de producir y de estandarizar, adicionalmente tiene las ventajas de ser estable, se evita el uso de agentes infecciosos, no se encuentra en las muestras clínicas y se puede aplicar en la detección múltiple de diferentes microorganismos (Dreier *et al.*, 2005).

En México actualmente no existen laboratorios de referencia para el diagnóstico de enfermedades que afectan a organismos acuáticos incluyendo a IPN. A este hecho se suma la falta de programas de vigilancia que eviten la entrada de nuevas enfermedades infecciosas, sobre todo de aquellas que están emergiendo en los principales países productores de peces. Lo anterior se suma a la problemática a la que se enfrentan las diferentes instituciones que realizan diagnóstico de IPNV en el país, puesto que no cuentan con técnicas reproducibles implementadas con metodologías estandarizadas asociadas a resultados falsos negativos. En resumen, la implementación de políticas de control hace necesario el establecimiento de técnicas diagnósticas confiables para tomar decisiones a partir de conocer la situación real de la enfermedad en el país.

## **JUSTIFICACIÓN**

El sector trutícola es afectado económicamente debido a la mortalidad que ocasiona la enfermedad necrosis pancreática infecciosa en trucha arco iris. Éste sector demanda de una prueba diagnóstica rápida, sensible y específica para la toma de decisiones a partir del resultado de dicha prueba. La RT-PCR es una técnica ampliamente utilizada debido a que es específica, sensible, rápida y que puede ser utilizada como herramienta diagnóstica en programas de vigilancia y control sanitario, pero tiene como desventaja la interpretación de resultados falsos negativos cuando no se cuenta con controles internos. Debido a lo anterior, se construyó un CAI para estandarizar el método diagnóstico para IPNV basado en la RT-PCR y crear un sistema de control reproducible en los laboratorios que realizan dicha prueba diagnóstica que permita al usuario la interpretación de resultados confiables.

## **2. HIPÓTESIS**

Si se utilizan controles internos en la RT-PCR para el diagnóstico de la necrosis pancreática infecciosa en los salmónidos, entonces se identificarán resultados falsos negativos.

### **3. OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar controles internos empleando construcciones génicas, con el fin de mejorar metodologías de diagnóstico basadas en la técnica de RT-PCR para la necrosis pancreática infecciosa de los salmónidos.

#### **3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Construir un control interno, adicionando en los extremos de un fragmento del gen de  $\beta$  actina humana, secuencias que codifican para la proteína VP2 del virus de necrosis pancreática infecciosa.
2. Evaluar la expresión del control interno y compararla con la expresión del gen de la  $\beta$ -actina humana en células HeLa.
3. Evaluar la metodología estandarizada empleando células HeLa transfectadas con el control interno adicionándolas a muestras de peces sospechosos para el diagnóstico de necrosis pancreática infecciosa.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 CÉLULAS HELA EMPLEADAS PARA LA EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL.**

Se utilizó cultivo de células HeLa, el cual se propagó en botellas de poliestireno<sup>a</sup> para cultivo celular con área de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>, a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sup>2</sup>. Se utilizó medio *Minimal Essential Medium*<sup>b</sup> (MEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino<sup>c</sup>, L-glutamina<sup>d</sup> 2 miliMolar (mM) y bicarbonato de sodio<sup>e</sup> 0.1 mM.

### **4.2 MUESTRAS DE TRUCHA ARCO IRIS EMPLEADAS PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL IPNV.**

Se utilizaron crías de trucha arco iris provenientes de granjas del Estado de México e Hidalgo. De las crías que tenían un tamaño menor a los 5 cm. de largo se utilizaron los cuerpos completos sin eviscerar pero se retiraron cabezas y colas; mientras que de las crías con un tamaño mayor a los 5 cm se utilizaron solamente el riñón y bazo. Las muestras fueron almacenadas en un ultracongelador<sup>f</sup> a -80°C hasta su uso.

---

<sup>a</sup> NUNC, California, EUA.

<sup>b</sup> Gibco, EUA.

<sup>c</sup> Invitrogen, EUA.

<sup>d</sup> Gibco BRL, UK.

<sup>e</sup> Gibco, EUA.

<sup>f</sup> REVCO Harris, Asheville, N.C.,EUA.

### 4.3 EXTRACCIÓN DE ARN A PARTIR DE CULTIVO CELULAR HELA Y MUESTRAS DE TRUCHA ARCOÍRIS.

La extracción de ARN total se realizó a partir de cultivo de células HeLa sin transfectar, cultivo de células HeLa transfectado y muestras de campo, utilizando el método de extracción de ARN con TRIZOL®<sup>g</sup> siguiendo las indicaciones del fabricante, con algunas modificaciones que se mencionan a continuación. Previo a la adición del TRIZOL, las células HeLa crecidas en una botella de 25 cm<sup>2</sup> con 100% de confluencia, fueron lavadas dos veces con 1 mililitro (ml) de solución amortiguadora de fosfatos<sup>h</sup> fría 1X (PBS, por sus siglas en inglés: *phosphate buffered saline*) (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.9 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.1 mM, NaCl 154 mM, pH 7.2). Después de retirar el excedente de PBS se agregó 1 ml de TRIZOL por cada 10 cm<sup>2</sup> de superficie de monoestrato presente en la botella, se incubó durante 5 minutos sobre hielo y se pasó a un microtubo<sup>i</sup>. Posteriormente, se agregaron 200 µl de cloroformo<sup>j</sup>, se agitó vigorosamente con un homogenizador eléctrico<sup>k</sup> por 15 segundos (seg) y se incubó por 2 minutos (min) en hielo, esta mezcla se centrifugó en una microcentrífuga<sup>l</sup> a 12,000 x g durante 15 min a 4°C. Posteriormente, se colectó la fase acuosa en un microtubo nuevo, se precipitó el ARN con 0.5 ml de isopropanol<sup>m</sup> frío, se mezcló suavemente con el homogenizador, se incubó durante 10 min sobre hielo. Se volvió a centrifugar a 12,000 x g durante 10 min a 4°C, posteriormente se retiró el excedente de isopropanol para obtener la pastilla

---

<sup>g</sup> Invitrogen, California, EUA.

<sup>h</sup> J.T. Baker, Mex.

<sup>i</sup> Axygen Scientific, EUA.

<sup>j</sup> Mallinckodt Speciality Chemicals Co., EUA

<sup>k</sup> Lab-Line Instrument INC, EUA.

<sup>l</sup> Eppendorf, EUA.

<sup>m</sup> Merck KGaA, Alemania.

de ARN, la cual se lavó con 1 ml de etanol<sup>n</sup> frío al 75% con agua tratada con dietil pirocarbonato<sup>o</sup> al 0.1% (DEPC). Se centrifugó a 7,500 x g durante 7 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante (s/n) y se secó la pastilla de ARN a temperatura ambiente. El ARN se suspendió con 20 µl de agua con DEPC al 0.1%. Una vez que se realizó lo anterior, se midió la concentración de ARN total utilizando un espectrofotómetro<sup>p</sup>. Después se observó la integridad del ARN mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% en amortiguador Tris-acetato (TAE) teñido con bromuro de etidio (Br-E<sup>q</sup> a una concentración de 100µg/100ml) en una cámara horizontal<sup>f</sup> y finalmente se almacenó en un ultracongelador a -80 °C hasta su uso.

Posteriormente, se hicieron diluciones dobles seriadas a partir de 960 ng de ARN total de cultivo de células HeLa sin transfectar para determinar la concentración mínima detectable para la amplificación de β-actina humana. También se hicieron diluciones dobles seriadas a partir de 950 ng de ARN total de cultivo de células HeLa transfectadas para la amplificación de β-actina humana y el CAI para comparar el nivel de expresión de ambos.

#### **4.4 EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE CULTIVO CELULAR HELA.**

Se realizó la extracción de ADN genómico a partir de cultivo de células HeLa por medio de un protocolo estándar (Sambrook *et al.*, 2002) de la siguiente

---

<sup>n</sup> Merck KGaA, Alemania.

<sup>o</sup> Sigma, St. Louis, MO, EUA.

<sup>p</sup> Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, Cambridge, England

<sup>q</sup>Sigma, St. Louis, MO, EUA.

<sup>f</sup> Gibco © BRL Horizon 58 California, EUA.



manera: a partir de cultivo de células HeLa, se agregó 1 ml de tripsina<sup>s</sup> al 0.5 % a una botella de poliestireno con área de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> con monoestrato al 100% de confluencia. Una vez desprendido el monoestrato se transfirieron las células a un tubo estéril para microcentrífuga, se centrifugó a 500 x g durante 5 min y se descartó el s/n. La pastilla de células se suspendió con 10 ml de PBS frío, se centrifugaron a 500 x g durante 5 min y se eliminó el s/n. Con el fin de lavar las células se repitió el paso de suspensión de las células con PBS y el paso de centrifugación. Se eliminó el s/n y se suspendieron las células en 1 ml de solución amortiguadora de digestión [NaCl<sup>t</sup> 100 mM, Tris-Cl<sup>u</sup> 10 mM, ácido etilen diamino tetracético (EDTA)<sup>v</sup> 25 mM, dodecil sulfato de sodio<sup>w</sup> (SDS) 0.5 %, proteinasa K<sup>x</sup> 0.1 mg/ml]. Las células se incubaron en baño maría con agitación<sup>y</sup> a 50 °C durante 3 horas, se agregó 1 volumen (vol) igual de fenol<sup>z</sup>-cloroformo-álcohol isoamílico<sup>aa</sup> (en proporción 25:24:1, respectivamente), se mezclaron con homogenizador eléctrico, se centrifugaron a 1700 x g durante 10 min, se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se adicionó 0.5 vol de acetato de amonio<sup>bb</sup> 7.5 M y 2 vol de etanol al 100%. El ADN se recuperó por centrifugación a 1700 x g por 2 min, se lavó la pastilla con etanol al 70%, se centrifugó a 500 x g durante 5 min y se descartó el etanol, se retiró el excedente y se secó la pastilla a temperatura ambiente. Por

---

<sup>s</sup> Gibco, EUA.

<sup>t</sup> J.T. Baker, Mex.

<sup>u</sup> Sigma Chemicals Co., EUA.

<sup>v</sup> Sigma Chemicals Co., EUA.

<sup>w</sup> Sigma Chemicals Co., EUA

<sup>x</sup> Gibco, EUA.

<sup>y</sup> Precisión Scientific, Modelo 25, EUA.

<sup>z</sup> Merck KGaA, Alemania.

<sup>aa</sup> Merck KGaA, Alemania.

<sup>bb</sup> J.T. Baker, Mex

último se suspendió el ADN con 20 µl de solución TE (Tris-Cl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) hasta disolver la pastilla y se almacenó en un congelador<sup>cc</sup> a -20 °C hasta su uso.

#### **4.5 ARN TOTAL A PARTIR DE CULTIVO CELULAR HELA TRATADO CON NUCLEASAS (DNasa Y RNasa)**

A 1 µg de ARN total extraído a partir de cultivo de células HeLa se adicionó 0.5 µl de DNasa pancreática I<sup>dd</sup> (2.5mg/ml), esta mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos. El ARN se purificó para eliminar la DNasa utilizando el siguiente protocolo: se adicionaron 25 µl de solución para detener la reacción [50 mM EDTA, 1.5 M acetato de sodio<sup>ee</sup>, 1% SDS], se mezcló suavemente, se agregó 1 vol de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). Posteriormente, se centrifugó a 9,300 x g durante 2 min, se removió la fase acuosa a un tubo nuevo, se adicionaron 325 µl de etanol al 100%, se mezcló y se colocó sobre hielo durante 15 min y se centrifugó a 9,300 x g por 15 min. La pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 75%, se centrifugó a 5,300 x g durante 5 minutos, se retiró el s/n y se secó a temperatura ambiente, finalmente se suspendió en 20 µl de agua con DEPC 0.1 %.

También se trataron las muestras de ADN con RNasas. Brevemente, a 1 µg de ADN extraído a partir de cultivo celular HeLa se adicionó 0.5 µl de RNasa

---

<sup>cc</sup> Amana 17, EUA.

<sup>dd</sup> Invitrogen, California, EUA.

<sup>ee</sup> J.T. Baker, Mex.

pancreática A<sup>ff</sup> con una concentración de 20 µg/ml, se mezcló suavemente, se incubó a 37°C por 30 minutos y se guardaron las muestras a -20°C hasta su uso.

#### **4.6 INICIADORES UTILIZADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE $\beta$ -ACTINA HUMANA, CAI E IPNV**

Se diseñó un par de iniciadores a partir de la secuencia de nucleótidos de ARNm que codifica para el gen de  $\beta$ -actina humana reportada en el *GeneBank* con número de acceso EF036500 por Santana-Roman y col en el 2006 (**Fig. 1**). También se diseñó otro juego de iniciadores, los cuales tienen una secuencia del gen de  $\beta$ -actina humana en los extremos 3' y en los extremos 5' se adicionaron secuencias del gen de la proteína VP2 del IPNV éstos últimos reportados por Taksdal en el 2001. Dichos iniciadores amplifican un producto de 436 pb (**Fig. 2**). Finalmente, se sintetizó un tercer juego de iniciadores utilizando nuevamente la secuencia reportada por Taksdal para amplificar un fragmento de 232 pb de la secuencia de la VP2 del IPNV. En el **cuadro 1** se muestra la orientación de los diferentes iniciadores, la secuencia, el tamaño, así como la región sobre la que amplifican.

---

<sup>ff</sup> Roche Diagnostics, EUA.

670	680	690	700	710	720
aaatcgtgag	tgaatttaa	gagaagctgt	gctacgtcgc	cctggacttc	gagcaagaga
tttagcaagg	actgaaattc	ctcttcgaca	cgatgcagcg	ggacctgaag	ctcgttctct
730	740	750	760	770	780
tggccaacggc	tgttccagc	tectccctgg	agaagagcta	cgagctgect	gacggccagg
accggtgccg	acgaaggtcg	aggagggacc	tcttctcgat	gctcgacgga	ctgccggctcc
790	800	810	820	830	840
tcatcaccat	tggcaatgag	cggttccgct	gccctgagge	actcttccag	ccttccctcc
agtagtggtg	accgttactc	gccaaaggcg	cgggactccg	tgagaaggtc	ggaaggaagg
850	860	870	880	890	900
tgggcatgga	gtcctgtggc	atccacgaaa	ctaccctcaa	ctccatcatg	aagtgtgacg
accctgacct	caggacaccg	taggtgcttt	gatggaagtt	gaggtagtac	ttcacactgc
910	920	930	940	950	960
tggacatccg	caaagaacctg	tacgccaaca	cagtgtgtgc	tggcggcacc	accatgtacc
acctgtaggc	gtttctggac	atgcggttgt	gtcacgacag	accgccgtgg	tggtacatgg
970	980	990	1000	1010	1020
ctggcattgc	cgacaggatg	cagaaggaga	tcaactgccct	ggcaccaccg	acaatgaaga
gaccgtaacg	gctgtcctac	gtcttctctc	agtgacggga	ccgtgggtcg	tgttacttct
1030	1040	1050	1060	1070	1080
tcaagatcat	tgtctctctt	gagggcaagt	actccgtgtg	gatcgggggc	tccatcctgg
agttctagta	acgaggagga	ctcgggttca	cgaggcacac	ctagccgccg	aggtaggacc

Fig. 1. Secuencia del ADNc que codifica para un segmento del gen de  $\beta$ -actina humana flanqueado en color azul por las secuencias de los iniciadores Actin-1 y Actin-2 que permiten la amplificación del fragmento específico de 394 pb.

10	20	30	40	50	60
atctgagggtg	tagacatcaa	agaaatcgtg	cgtgacatta	aggagaagct	gtgctacgtc
tagacgccac	atctgtagtt	tcttttagcac	gcactgtaat	tcctcttcga	cacgatgcag
70	80	90	100	110	120
gccctggact	tcgagcaaga	gatggccaacg	gctgcttcca	gctcctccct	ggagaagagc
cgggacctga	agctcgttct	ctaccgggtgc	cgacgaaggt	cgaggaggga	cctcttctcg
130	140	150	160	170	180
taagagctgc	ctgacggcca	ggtcataacc	attggcaatg	agcggttccg	ctgccctgag
atgctcgacg	gactgccggt	ccagtagtgg	taaccgttac	tcgccaaggc	gacgggactc
190	200	210	220	230	240
gcactcttcc	agccttccct	cctgggcatg	gagtcctgtg	gcataccaga	aaactacctc
cgtgagaagg	tcggaaggaa	ggacccttac	ctcaggacac	cgtaggtgct	ttgatggaag
250	260	270	280	290	300
actccatca	tgaagtgtga	cgtggacatc	cgcaagacc	tgtacgccaa	cacagtgtgc
ttgaggtagt	acttcacact	gcacctgtag	gcgtttctgg	acatgccggt	gtgtcacgac
310	320	330	340	350	360
tctggcggca	ccaccatgta	ccctggcatt	gccgacagga	tgcagaagga	gatcactgcc
agaccgccgt	ggtggtagat	gggaccgtaa	cggctgtcct	acgtcttctc	ctagtgcagg
370	380	390	400	410	420
ctggcaccca	gcacaatgaa	gatcaagatc	attgctcttc	ctgagcgaac	gtactcggga
gaccgtgggt	cgtgttactt	ctagttctag	taacgaggag	gactcgcggt	catgagccct
430	440				
tggacgagga	actgca				
acctgctcct	tgacgt				

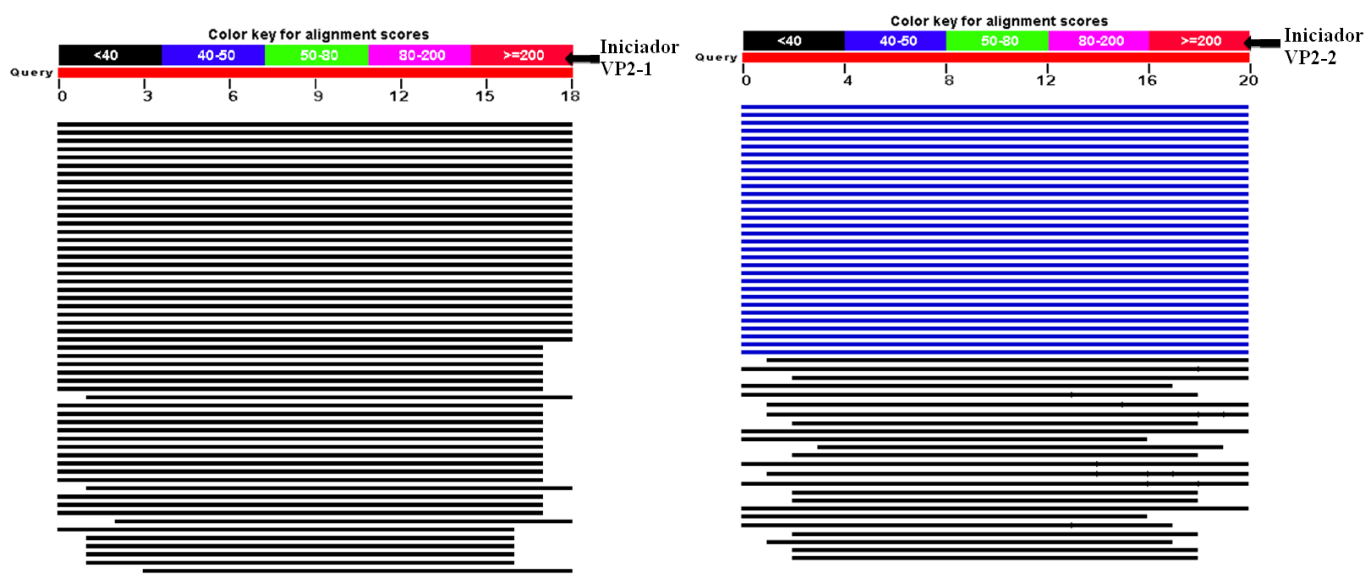
Fig. 2. Secuencia del CAI, en los recuadros verdes se muestran las secuencias en ambas orientaciones de un fragmento de la proteína VP2 del IPNV, las cuales corresponden a los extremos 5' de los iniciadores VP2-Act1 y VP2-Act2; mientras que en los recuadros color morado se muestran las secuencias de los iniciadores en sus extremos 3' que codifican para el gen de  $\beta$ -actina humana, dando como resultado un producto de 436 pb.

Nombre	Orientación	Secuencia nucleotídica 5'3'	Tamaño del producto	Región sobre la que amplifica
Actin -1	sentido	AAATCGTGCGTGACATTAAG	394 pb	$\beta$ -actina humana
Actin -2	antisentido	GAGTACTTGCGCTCAGGAG	394 pb	$\beta$ -actina humana
VP2-Act1	sentido	ATCTGCGGTGTAGACATCAAAG AAATCGTGCGTGACATTAAG	436 pb	VP2- $\beta$ -actina humana
VP2-Act2	antisentido	TGCAGTTCCTCGTCCATCCC GAGTACTTGCGCTCAGGAG	436 pb	VP2- $\beta$ -actina humana
VP2-1	sentido	ATCTGCGGTGTAGACATC	232 pb	VP2
VP2-2	antisentido	TGCAGTTCCTCGTCCATCCC	232 pb	VP2

**Cuadro 1. Iniciadores utilizados durante las reacciones de RT-PCR y PCR, donde se indica además de la orientación de cada iniciador, la secuencia nucleotídica, el tamaño del producto amplificado y la región sobre la que complementan.**

Para comprobar la especificidad de los iniciadores VP2-1 y VP2-2 utilizados para la amplificación de un fragmento correspondiente a VP2 del IPNV se comparó la secuencia de dichos iniciadores con respecto a otras secuencias reportadas en el *GeneBank* y utilizando el programa *Blast* del *Nacional Center for Biotechnology Information* (NCBI) se realizó la búsqueda y la comparación de secuencias para obtener un valor que nos indica el nivel de homología que presentan los iniciadores VP2-1 y VP2-2 con respecto a otras secuencias. En las **fig. 3a y 3b** se muestran los porcentajes de homología de la secuencias de los

iniciadores VP2-1(**fig 3a**) y VP2-2 (**fig 3b**), con respecto a otras secuencias reportadas en el *GeneBank*. Las flechas del lado derecho indican a las barras que representan la escala de puntuación que se asigna a las secuencias de los iniciadores VP2-1 y VP2-2 con respecto a otras secuencias, mientras que en la parte inferior se muestran las barras que representan la longitud y localización de los fragmentos que tienen homología con la secuencias empleadas en la búsqueda.



**Fig 3a y 3b .Diagramas donde se muestran los resultados de una búsqueda en el *Blast* del *NCBI*. Fig 3a. Las líneas en negro indican una homología en menos de 40 nucleótidos de las secuencias reportadas comparas con respecto a la secuencia del iniciador VP2-1. Fig 3b. Las líneas en azul muestran una homología entre 40 y 50 nucleótidos, mientras que las líneas en color negro indican una homología en menos de 40 nucleótidos de las secuencias reportadas comparadas con respecto al iniciador VP2-2.**

Mientras que en **tabla 1** se enlista con el número de acceso al *Genebank* del *NCBI*, el nombre de los organismos a los cuales pertenecen las secuencias homólogas comparadas en las fig 3a y 3b, así como los porcentajes de identidad de cada uno de los microorganismos encontrados para los iniciadores VP2-1 y VP2-2, respectivamente (**Tabla 1a y 1b**).

Accession	Description	Max ident
<a href="#">EF493156.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus from Spain seqment A polyprot	100%
<a href="#">DQ536091.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate S-IPNV-SH2-98 seqment	100%
<a href="#">DQ536090.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate S-IPNV-FS12-01 seqmer	100%
<a href="#">AY379744.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate NVI-010 seqment A 107	100%
<a href="#">AY379740.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate NVI-015 seqment A 12.1	100%
<a href="#">AY379738.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate NVI-013 seqment A 12.1	100%
<a href="#">AY379737.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate NVI-023 seqment A 12.1	100%
<a href="#">AY379736.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate NVI-020 seqment A 15.4	100%
<a href="#">AY379735.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate NVI-011 seqment A 14.7	100%
<a href="#">AY374435.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate NVI-001 seqment A 15.4	100%
<a href="#">AB006783.1</a>	Yellowtail ascites virus - Y-6 gene for polyprotein, complete cds	100%
<a href="#">AY283785.1</a>	Marine birnavirus strain AY-98 seqment A, complete sequence	100%
<a href="#">AY283782.1</a>	Marine birnavirus strain YT-01A seqment A, complete sequence	100%
<a href="#">AY283781.1</a>	Marine birnavirus strain Y-6 seqment A, complete sequence	100%
<a href="#">AY354521.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate Sp122 12-kDa nonstruct	100%
<a href="#">AY354520.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate Sp116 15-kDa nonstruct	100%
<a href="#">AY354519.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate Sp103 15-kDa nonstruct	100%
<a href="#">AY823632.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate VP5-deficient Sp103 pol	100%
<a href="#">AY064396.1</a>	Marine birnavirus strain GC-1 polyprotein mRNA, complete cds	100%
<a href="#">AF342728.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus Sp polyprotein mRNA, partial cc	100%
<a href="#">AJ622822.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus seqment A pVP2-VP4-VP3 gene	100%
<a href="#">AJ489229.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus gene for polyprotein, isolate 88I	100%
<a href="#">AJ489222.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus gene for polyprotein, isolate 11-	100%
<a href="#">AY283783.1</a>	Marine birnavirus - H1 seqment A, complete sequence	100%
<a href="#">D00701.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus genes for small ORF, large ORF	100%
<a href="#">U56907.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus structural polyprotein gene, con	100%

#### VP2-1 (1a)

Accession	Description	Max ident
<a href="#">EF493156.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus from Spain seqment A polyprot	100%
<a href="#">DQ536091.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate S-IPNV-SH2-98 seqment	100%
<a href="#">DQ536090.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate S-IPNV-FS12-01 seqmer	100%
<a href="#">AY379744.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate NVI-010 seqment A 107	100%
<a href="#">AY379742.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate NVI-016 seqment A 15.4	100%
<a href="#">AY379740.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate NVI-015 seqment A 12.1	100%
<a href="#">AY379738.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate NVI-013 seqment A 12.1	100%
<a href="#">AY379737.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate NVI-023 seqment A 12.1	100%
<a href="#">AY379736.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate NVI-020 seqment A 15.4	100%
<a href="#">AY379735.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate NVI-011 seqment A 14.7	100%
<a href="#">AY374435.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate NVI-001 seqment A 15.4	100%
<a href="#">AY354521.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate Sp122 12-kDa nonstruct	100%
<a href="#">AY354520.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate Sp116 15-kDa nonstruct	100%
<a href="#">AY354519.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate Sp103 15-kDa nonstruct	100%
<a href="#">AY823632.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate VP5-deficient Sp103 pol	100%
<a href="#">AF343571.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus Dry Mills polyprotein mRNA, par	100%
<a href="#">AF342733.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus Canada 2 polyprotein mRNA, p	100%
<a href="#">AF342728.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus Sp polyprotein mRNA, partial cc	100%
<a href="#">AF342727.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus West Buxton polyprotein mRNA,	100%
<a href="#">AY780924.3</a>	Infectious pancreatic necrosis virus strain 20G1d seqment A, compl	100%
<a href="#">AY780923.3</a>	Infectious pancreatic necrosis virus strain 19G7e seqment A, compl	100%
<a href="#">AY780922.3</a>	Infectious pancreatic necrosis virus strain 19G3e seqment A, compl	100%
<a href="#">AY780920.3</a>	Infectious pancreatic necrosis virus strain 17F2 seqment A, complet	100%
<a href="#">AY780918.3</a>	Infectious pancreatic necrosis virus strain 5B1d seqment A, complet	100%
<a href="#">AJ622822.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus seqment A pVP2-VP4-VP3 gene	100%
<a href="#">AJ489229.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus gene for polyprotein, isolate 88I	100%
<a href="#">AJ489222.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus gene for polyprotein, isolate 11-	100%
<a href="#">D00701.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus genes for small ORF, large ORF	100%
<a href="#">U48225.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus structural polyprotein gene incl	100%
<a href="#">AJ829474.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus (serotype SP) partial polyprotei	100%
<a href="#">U56907.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus structural polyprotein gene, con	100%
<a href="#">AF342730.1</a>	Infectious pancreatic necrosis virus - He polyprotein mRNA, partial	100%

#### VP2-2 (1b)

Tabla 1. Porcentajes de identidad de las secuencias de los iniciadores VP2-1(a) y VP2-2 (b) comparado con las secuencias reportadas de otros microorganismos en el Blast del GeneBank.

## 4.7 RT-PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DE $\beta$ -ACTINA HUMANA

Se realizó la RT-PCR en un solo paso para la amplificación de un fragmento del gen de  $\beta$ -actina humana. La amplificación del ADN complementario (cDNA) fue llevado a cabo en un vol de reacción de 50  $\mu$ l considerando la adición de 500 ng de ARN total de cultivo de células HeLa. Brevemente, en un tubo estéril de 0.2 ml para PCR se agregó 1  $\mu$ l de los iniciadores Actin-1 y Actin-2 a una concentración de 10  $\mu$ M, 2  $\mu$ l de mezcla de nucleótidos trifosfatados<sup>eg</sup> (dNTP's) a una concentración 10 mM cada uno, 1.5  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> a una concentración final de 1.5 mM, 3  $\mu$ l de amortiguador de síntesis de 1<sup>a</sup> cadena 5x [250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub> ]; 1  $\mu$ l de DTT 0.1 M, 100 unidades (U) de Transcriptasa reversa SuperScript<sup>hh</sup>, 1 U de TAQ polimerasa<sup>ii</sup> y agua des-ionizada estéril cuanto baste para (c.b.p) 50  $\mu$ l. La RT-PCR se realizó en un termociclador<sup>jj</sup> donde los ciclos de la reacción fueron los siguientes: un ciclo a 42°C por 50 min (transcripción reversa), un ciclo a 94° por 5 min. (desnaturalización inicial), 35 ciclos a 94° por 1 min y 30 seg (desnaturalización) , 55° por 1 min (alineamiento), 72° por 1 min y 30 seg (extensión) y el último ciclo fue de 72°C por 8 min (extensión final). En la **fig. 4** se muestra gráficamente los ciclos y condiciones de

---

<sup>eg</sup> Gibco BRL, Gaithersburg, EUA

<sup>hh</sup> Invitrogen, California, EUA

<sup>ii</sup> Invitrogen, California, EUA.

<sup>jj</sup> Techne, Inc., EUA.



temperatura que se emplearon durante la RT-PCR para la amplificación de un fragmento del gen de  $\beta$ -actina humana.

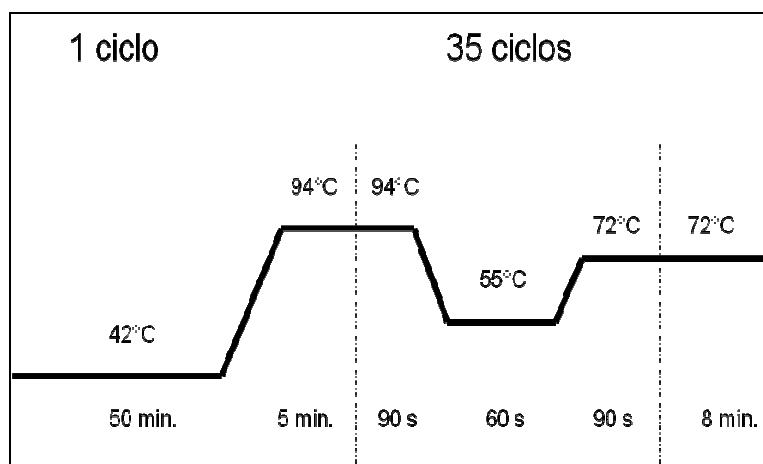


Fig. 4. Esquema con las condiciones empleadas en la RT-PCR para la amplificación de  $\beta$ -actina humana. S= segundos.

La visualización de los productos amplificados por RT-PCR fue con geles de agarosa al 1% teñidos en TAE con Br-E (100  $\mu$ g/100 ml), en los cuales se utilizó marcadores de peso molecular 1 Kb y 100 pb<sup>kk</sup> para ubicar el tamaño del producto obtenido.

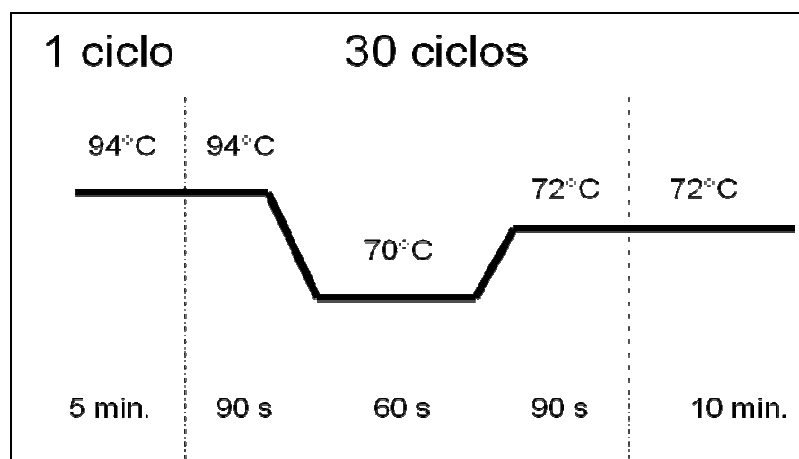
#### 4.8 PCR- 1 PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL CAI

La reacción de PCR se realizó para amplificar un producto de 436 pb compuesto de dos fragmentos: en la parte central un fragmento que corresponde al gen de  $\beta$ -actina humana y en los extremos 5' secuencias correspondientes a la proteína VP2 del IPNV; a dicha construcción se le denominó Control de amplificación interna (CAI). Se utilizó como molde 100 ng del producto

---

<sup>kk</sup> Invitrogen, California, EUA

previamente obtenido en la RT-PCR para  $\beta$ -actina humana. En un vol final de 50  $\mu$ l se agregó 1  $\mu$ l de cada uno de los iniciadores compuestos VP2-Act1 y VP2-Act2 a una concentración de 100 nM, 1  $\mu$ l con la mezcla de dNTP's para tener una concentración de 10 mM, 1.5  $\mu$ l con  $MgCl_2$  para tener una concentración final de 1.5 mM, 5  $\mu$ l de amortiguador para PCR 10X [200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl], 1 U de TAQ polimerasa y agua des-ionizada estéril c.b.p 50  $\mu$ l. La PCR se realizó en un termociclador con las temperaturas que se mencionan a continuación: un ciclo a 94°C por 5 min. (desnaturalización inicial), 30 ciclos a 94°C por 1 min y 30 seg (desnaturalización), 70°C por 1 min (alineamiento), 72°C por 1 min y 30 seg (extensión) y el último ciclo fue de 72°C por 10 min (extensión final). En la **fig. 5** se muestra gráficamente los ciclos y condiciones de temperatura que se emplearon durante la PCR para la amplificación de un fragmento de 436 pb.



**Fig. 5.** Esquema con las condiciones empleadas en la PCR-1 para la amplificación del CAI. S= segundos.

La visualización de los productos amplificados por RT-PCR fue con geles de agarosa al 1% teñidos en TAE con Br-E.

#### 4.9 PCR-2 PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL CAI

Se realizó una segunda PCR para amplificar el producto esperado de 436 pb (CAI) en esta ocasión se utilizaron los iniciadores VP2-1 y VP2-2 específicos para la VP2 a una concentración de 80 nM, en esta reacción se utilizaron 50 ng de ADN de  $\beta$ -actina humana (obtenido en la PCR 1), mientras que las concentraciones de los demás reactivos no se modificaron. La PCR se realizó en un termociclador con las siguientes condiciones: un ciclo a 94°C por 5 m in. (desnaturalización inicial), 30 ciclos a 94°C por 1 min y 30 seg (desnaturalización), 55°C por 1 min (alineamiento), 72°C por 1 min y 30 seg (extensión) y el último ciclo fue de 72°C por 10 min (extensión final).

En la **fig. 6** se muestra gráficamente los ciclos y condiciones de temperatura que se emplearon en la PCR-2 para la amplificación del CAI.

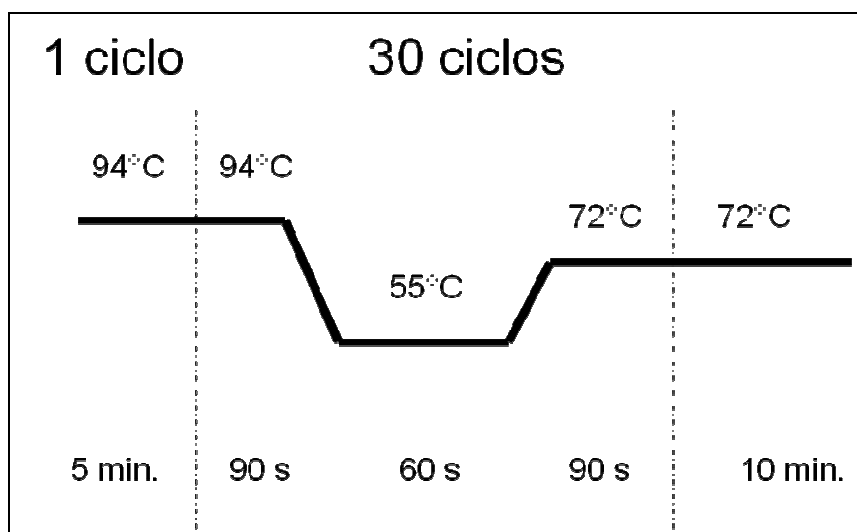


Fig. 6. Esquema con las condiciones empleadas en la PCR-2 para la amplificación del CAI.  
S= segundos.

#### 4.10 OBTENCIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES PARA LA CLONACIÓN DEL CAI

Se obtuvieron células competentes por el método *Simple and efficient method for transformation* (SEM) (Inoue *et al*, 1990). En primera instancia se sembró una caja con agar Luria-Bertani<sup>ll</sup> (LB) sin antibiótico con colonias puras de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  y a partir de ésta se tomaron 10 colonias y se sembraron por agitación en 10 ml de medio líquido YT2X. En seguida, se incubaron a temperatura ambiente con agitación rápida<sup>mmm</sup> a 200-250 revoluciones por minuto (r.p.m.) hasta alcanzar una densidad óptica  $A_{600}=0.6$ . Una vez alcanzada la densidad óptica, el cultivo se colocó en hielo durante 10 min, después se centrifugó a 0.8 x g durante 30 min a 4°C y se desechó el s/n. La pastilla se suspendió con 3.2 ml de solución TB fría (Pipes 10mM, MnCl<sub>2</sub> 55mM, CaCl<sub>2</sub> 15mM, KCl 250 mM, pH 6.7) y se incubó en hielo durante 10 min, se centrifugó a 0.8 x g durante 30 min a 4°C, y se eliminó el s/n. La pastilla se suspendió en 0.8 ml de TB, se agregó con agitación suave dimetil sulfóxido<sup>nn</sup> (DMSO) a una concentración final del 7% y después se incubó en hielo durante 10 min. Se hicieron alícuotas de 200  $\mu$ l en microtubos previamente enfriados en hielo que se congelaron inmediatamente sumergiéndolos en nitrógeno líquido durante 5 seg y por último se mantuvieron congelados a -80°C hasta su uso.

---

<sup>ll</sup> Gibco, EUA.

<sup>mmm</sup> Lab-line Instrumens, Mod. 3525, EUA.

<sup>nn</sup> Invitrogen, California, EUA

#### 4.11 CLONACIÓN DEL CAI EN UN VECTOR DE EXPRESIÓN

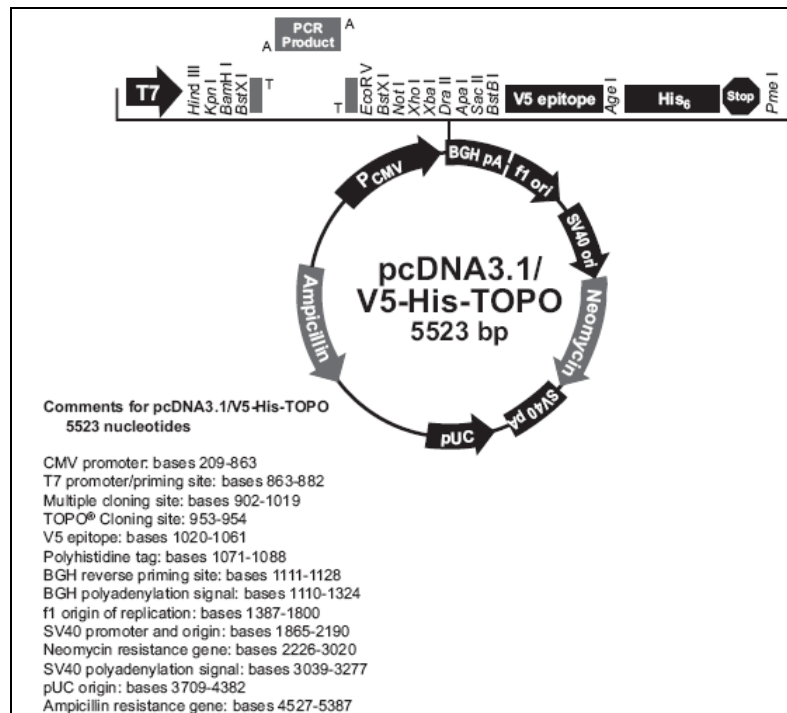
El producto de 436 pb que pertenece al CAI contiene un segmento del gen de  $\beta$ -actina humana y en los extremos segmentos de la proteína VP2 del IPNV fue clonado directamente en el vector comercial pcDNA3.1/V5-His mediante el sistema TOPO® *Cloning*<sup>oo</sup> siguiendo las recomendaciones del fabricante con el protocolo de transformación para células competentes mediante transformación química. Este sistema tiene la ventaja de ser un vector abierto que en cada extremo posee topoisomerasas capaces de insertar directamente un producto de PCR sin la necesidad de enzimas ligasas y además posee un promotor del virus de citomegalovirus (CMV) que permite expresar dicho producto en células eucariontes. En la **fig.7** se muestra el mapa del vector pcDNA3.1/V5-His-TOPO. Para una reacción final de 6  $\mu$ l para clonar el CAI se agregaron los siguientes reactivos: 3  $\mu$ l con el producto de PCR-2 (CAI), 1  $\mu$ l de amortiguador<sup>pp</sup> (proporcionado por el fabricante), 1  $\mu$ l de agua estéril, 1  $\mu$ l con el vector pcDNA3.1/V5-His-TOPO, se mezcló la reacción suavemente y se dejó incubar durante 5 min a temperatura ambiente, inmediatamente se colocó la reacción en hielo. Para la transformación de las células competentes, el procedimiento se realizó descongelando a temperatura ambiente colocando en hielo una alícuota de células bacterianas, enseguida se adicionaron los 6  $\mu$ l de la reacción anterior y se mezcló suavemente sin usar la pipeta. La mezcla se incubó en hielo durante 30 min, posteriormente se colocó en baño maría a 42°C durante 30 seg, se colocó inmediatamente en hielo, se agregaron 0.8 ml de medio líquido YT2X y se incubó

---

<sup>oo</sup> Invitrogen, EUA.

<sup>pp</sup> Invitrogen, California, EUA.

a 37°C durante 1 h con agitación. Por último se col ocaron y se diseminaron 100 µl del cultivo de bacterias transformadas en placas con agar LB con ampicilina<sup>99</sup> (75 mg/ml) y finalmente se incubaron a 37 °C durante toda la noche. El plásmido resultante se designó como pc3.1CAI.



**Fig. 7.** Esquema del vector comercial pcDNA3.1/V5-His-TOPO donde se muestra el sitio múltiple de clonación empleado para la clonación del CAI.

#### 4.12 EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO

Una vez que se tuvieron colonias transformadas en agar LB con ampicilina se les realizó la extracción de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 2002), consistiendo en el siguiente protocolo: se eligieron varias colonias, se identificaron y se transfirieron por separado a microtubos con 1 ml de

<sup>99</sup> Invitrogen, EUA.

medio líquido LB con ampicilina; se incubaron a 37°C con agitación vigorosa durante toda la noche, una vez terminado el tiempo de incubación se centrifugaron a 12,000 x g por 1 min, se descartó el s/n y se dejó secar la pastilla retirando el excedente de medio; se suspendieron en 100 µl de solución I fría (glucosa 50 mM, Tris-Cl 25 mM, EDTA 10 mM) y se homogenizaron vigorosamente las muestras; se adicionaron 200 µl de la solución II fresca (NaOH 0.2 N, SDS 1%), se mezcló el contenido por inversión y se colocaron sobre hielo; se adicionaron 150 µl de la solución III fría (acetato de potasio 5M, ácido acético glacial), se mezclaron suavemente con homogenizador eléctrico y se colocaron sobre hielo 5 min; se centrifugaron a 12,000 x g, 5 min a 4°C, se transfirió el s/n a un tubo nuevo, se adicionó 1 vol igual de fenol-cloroformo (a una relación 24:1, respectivamente), nuevamente se mezclaron con homogenizador eléctrico, se centrifugaron a 12,000 x g por 2 min a 4°C, se transfirió el s/n a un tubo nuevo, se precipitó con 2 vol de etanol al 100%, se mezclaron y se dejaron incubar durante 2 min a temperatura ambiente; se centrifugaron a 12,000 x g por 5 min, se retiró el s/n por decantación, se lavaron las pastillas con 1 ml de etanol frío al 70%, se centrifugaron a 12,000 x g por 5 min; se removió el s/n por decantación, se dejaron secar las pastillas a temperatura ambiente y finalmente, las muestras se suspendieron con 20 µl de solución TE y se les agregó RNasa A (20 µg/ml); se mezclaron y se incubaron durante 30 min a 37°C y después se almacenaron a -20°C.

#### **4.13 PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO pc3.1CAI**

Se realizó mediante la columna comercial *Concert<sup>TM</sup> High Purity Plasmid Midiprep System<sup>tr</sup>*, la cual se basa en la adsorción del ADN plasmídico a partículas de sílica en presencia de una solución con alto contenido de sales. La purificación se realizó de acuerdo a las indicaciones del fabricante y el ADN fue suspendido con 20 µl de agua inyectable estéril y conservado a -20°C hasta su uso.

#### **4.14 TRANSFECCIÓN DEL VECTOR pc3.1CAI EN CÉLULAS HELA**

Se realizó en células HeLa con el protocolo para el uso de Lipofectamina<sup>ss</sup> al cual se le realizaron algunas modificaciones para su utilización en botellas de cultivo celular con una superficie de 25 cm<sup>2</sup>. Brevemente, para una botella con cultivo celular HeLa con una confluencia al 100% se mantuvieron con medio de crecimiento MEM, L-glutamina 2 Mm y bicarbonato de sodio 0.1 mM, sin antibióticos y con 10% de suero fetal bovino. Posteriormente, se retiró el MEM, se realizaron 3 lavados con PBS pH 7.4 y se agregaron 4 ml de medio de crecimiento MEM sin suero. Para la mezcla de Lipofectamina<sup>TM</sup> y del vector se requirió una cantidad total de 1250 µl de medio de crecimiento sin suero y sin antibióticos en el que se diluyeron 6.25 µg de ADN plasmídico y 15.5 µl de de Lipofectamina<sup>TM</sup>. Esta mezcla se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Una vez terminado el tiempo de incubación, se agregó la mezcla anterior a la botella con el cultivo de células HeLa, se mezcló suavemente y se incubó a 37°C. Una vez transcurridas 5

---

<sup>tr</sup> Gibco BRL, EUA

<sup>ss</sup> Invitrogen, EUA



h, se agregaron otros 5 ml de MEM sin suero y se incubaron durante 19 h más (Ciccarone *et al*, 2000).

#### **4.15 CONTEO DE CÉLULAS HELA TRANSFECTADAS Y PREPARACIÓN DE CÉLULAS PARA SU CONGELACIÓN.**

El conteo de las células se realizó utilizando la cámara de Newbauer. A partir de una botella de 25 cm<sup>2</sup> con células HeLa transfectadas se agregaron 2 ml de tripsina al 0.5 %, una vez desprendidas las células se tomaron 100 µl y se mezclaron con 900 µl de azul de tripan (dilución 1:10). Una vez que se hizo el conteo y se determinó el número total de células HeLa por ml, a partir de la suspensión celular se realizó una dilución para obtener una concentración inicial de 1, 000, 000 de células, para lograr dicha concentración se utilizó la siguiente fórmula  $Ci1 \times Vi1 = Ci2 \times Vf2$  donde:  $Ci1$ =concentración inicial de la solución 1,  $Vi1$ =volumen inicial de la solución 1,  $Ci2$ =concentración inicial de la solución 2,  $Vf2$ =volumen final de la solución 2. A partir de la concentración de 1, 000, 000 de células HeLa se hicieron diluciones dobles seriadas, hasta llegar a una dilución 1/64 con una concentración final aproximada de 16,250 células. Cada dilución de células se mantuvo por separado en tubos de microcentrífuga, se centrifugaron a 0.8xg durante 5 min a 4°C, se obtuvo una pastilla, se retiró el s/n y se suspendieron en 1 ml de PBS pH 7.4 para lavarlas y retirar el excedente de tripsina; se volvieron a centrifugar a 0.8xg durante 5 min a 4°C, se retiró el s/n y después se agregaron 0.8 ml de TRIZOL a cada tubo homogenizando perfectamente la suspensión celular. Posteriormente se siguió el protocolo de TRIZOL con las modificaciones anteriormente mencionadas y una vez que se

obtuvo el ARN total de cada una de las diluciones se utilizó en la RT-PCR junto con los iniciadores VP2-1 y VP2-2 para poder determinar cual es la mínima cantidad de células HeLa transfectadas empleadas para la amplificación del CAI.

Para determinar las condiciones en las cuales pueden almacenarse y manejarse las células HeLa una vez que se han transfectado y el tiempo en cual todavía puede realizarse la extracción de ARN total y lograr la amplificación del CAI, se realizaron los siguientes ensayos. Primero, a partir de una botella de 25 cm<sup>2</sup> con células HeLa transfectadas se agregaron 2 ml de tripsina, una vez desprendidas en esta suspensión se contó el número de células utilizando la cámara de Neubauer; a partir del número total de células por ml se realizaron diluciones a partir de la suspensión celular hasta obtener la concentración de 62,500 células. Una vez obtenido el número deseado de células se colocaron en tubos de microcentrífuga y se centrifugaron a 0.8xg durante 5 min a 4°C, se obtuvieron pastillas a las cuales se retiró el s/n y se suspendieron en 1 ml de PBS pH 7.4 para lavarlas y retirar el excedente de tripsina. Las células se volvieron a centrifugar a 0.8xg durante 5 min a 4°C, se retiró el s/n, se quitó el excedente de líquido colocando los tubos en posición invertida durante 3 min y después las pastillas fueron suspendidas con 0.8 ml de TRIZOL, finalmente se almacenaron a -80°C durante 24, 48, 72 h., 7 d y 15 d. Una vez que pasaron los periodos antes mencionados, en cada periodo se descongeló un tubo dejándolo sobre hielo. En todos los tubos se siguió el protocolo de extracción de ARN total y después se realizó la RT-PCR para la amplificación del CAI.

## 5. RESULTADOS

### RT-PCR para la amplificación de $\beta$ -actina humana

Para la construcción del CAI primero se realizó la extracción de ARN total a partir de cultivo de células HeLa. Se obtuvo un ARN íntegro de adecuada calidad en concentraciones mayores a  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . En algunas muestras después de la adición de cloroformo fue necesario realizar un tratamiento extra con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), este paso fue realizado para retirar el excedente de proteínas y compuestos orgánicos. En las muestras tratadas se logró obtener un ARN más limpio. El ARN se diluyó y se cuantificó mediante un espectrofotómetro logrando una concentración entre 1 y  $1.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . (**Fig. 8a**). Una vez obtenido el ARN total a partir de cultivo de células HeLa se utilizaron 500 ng y los iniciadores Actin-1 y Actin-2 para la amplificación mediante RT-PCR de un producto esperado de 394 pb correspondiente a un fragmento del gen de  $\beta$ -actina humana. En la fig. **8b** se observan productos de amplificación correspondientes a  $\beta$ -actina humana obtenidos mediante RT-PCR utilizando el ARN total que se observa en la figura 8a.

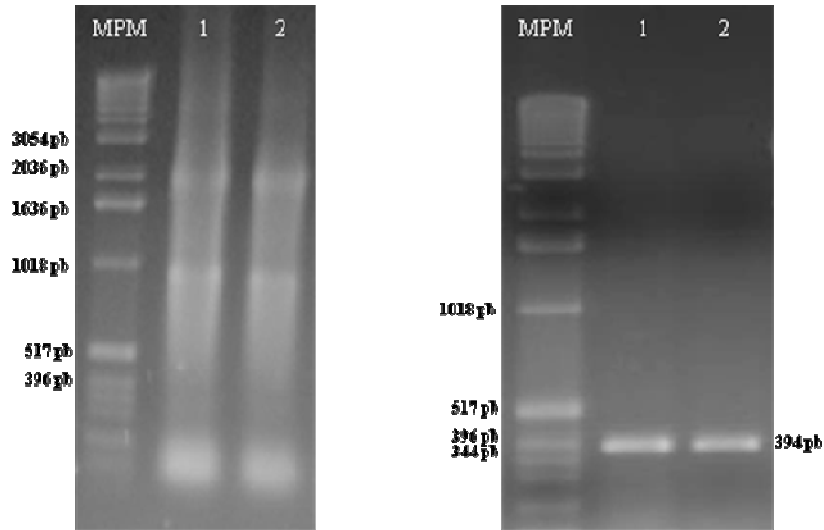
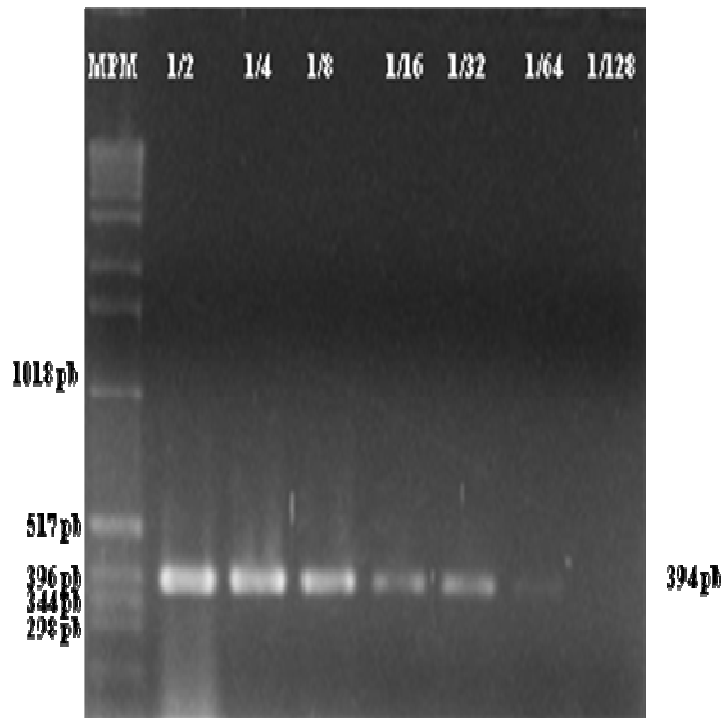


Fig.8 Fotos de geles de agarosa al 1 % en TAE teñido con Br-E, donde se observan en la fig. 8a ARN total (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) extraído a partir de cultivo celular HeLa. Carriles del 1 al 2: cultivo celular HeLa y en la fig 8b se observan productos de amplificación de  $\beta$ -actina humana por medio de RT-PCR utilizando el ARN total observado en la fig 8a. Carriles 1 al 2:  $\beta$ -actina humana. MPM= Marcador de peso molecular 1 Kb.

### Concentración mínima de ARN total para la amplificación de $\beta$ -actina humana

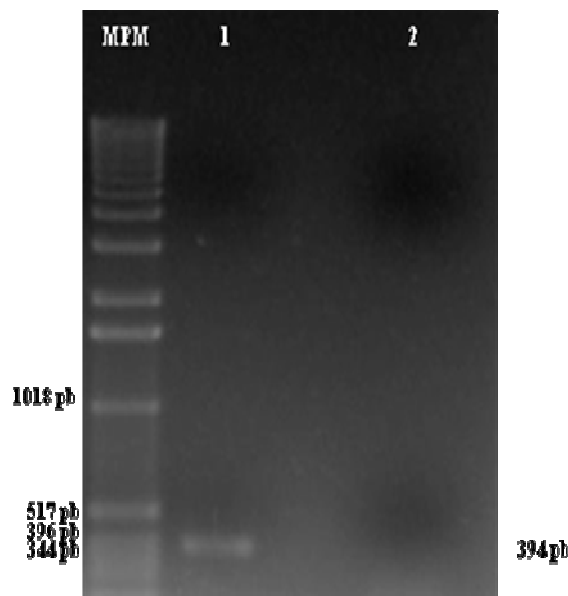
Con el fin de conocer la concentración mínima de ARN total necesario para la amplificación de  $\beta$ -actina humana en la RT-PCR, a partir de 960 ng se hicieron diluciones dobles seriadas hasta obtener una concentración final de 15 ng. En este experimento se determinó que la concentración mínima de ARN total requerida para la amplificación de un producto de 394 pb correspondiente a un fragmento del gen de  $\beta$ -actina humana son 60 ng de ARN total extraído a partir de cultivo de células HeLa. (Fig. 9)



**Fig 9.** Foto de un gel de agarosa al 1 % en TAE teñido con Br-E, donde se observan productos de 394 pb correspondientes a  $\beta$ -actina humana. Carriles de la dilución (dil.) 1/2 a la dil. 1/128 se observan productos amplificados de diferentes diluciones: dil. 1/2 (960 ng); dil.1/4 (480 ng); dil. 1/8 (240 ng); dil. 1/16 (120 ng); dil. 1/32 (60 ng); dil. 1/64 (30 ng); dil. 1/128 (15 ng). PM = Marcador de peso molecular 1 Kb.

Por otra parte, aunque los iniciadores Actin-1 y Actin-2 se diseñaron a partir de la secuencia de ARNm del gen de  $\beta$ -actina humana, se consideró otro control externo para asegurar que la amplificación de  $\beta$ -actina humana se lleva a cabo a partir de ARNm y no a partir de la amplificación de ADN genómico presente como contaminante durante la extracción de ARN. Con este fin se realizó la extracción de ARN total a partir de cultivo de células HeLa, se trató con DNasa I y después se realizó la RT-PCR para la amplificación de  $\beta$ -actina humana. De forma paralela se realizó la extracción de ADN genómico, se agregó RNasa A y posteriormente se realizó la PCR para la amplificación de  $\beta$ -actina humana. Al visualizar los productos mediante electroforesis en un gel de agarosa; en la reacción de RT-

PCR se observó un producto de amplificación de 394 pb correspondiente al producto esperado de  $\beta$ -actina humana, mientras que en la reacción de PCR con ADN genómico no se observó ningún producto de amplificación (**Fig. 10**) lo que indica que la amplificación del producto de 394 pb es obtenido a partir de ARNm. Utilizando el programa *Genetix*<sup>a</sup> se hizo el alineamiento de los iniciadores Actin-1 y Actin-2 en la secuencia completa de ADN genómico del gen de  $\beta$ -actina humana para conocer que el tamaño del producto esperado resultaría en un segmento de 601 pb



**Fig. 10.** Foto de un gel de agarosa al 1 % en TAE teñido con Br-E, donde se observa un producto de amplificación de  $\beta$ -actina humana por medio de RT-PCR. Carril 1: RT-PCR utilizando ARN total de células HeLa tratado con DNasa; carril 2: PCR utilizando ADN genómico de células HeLa tratado con RNasa. MPM=Marcador de peso molecular 1 Kb.

---

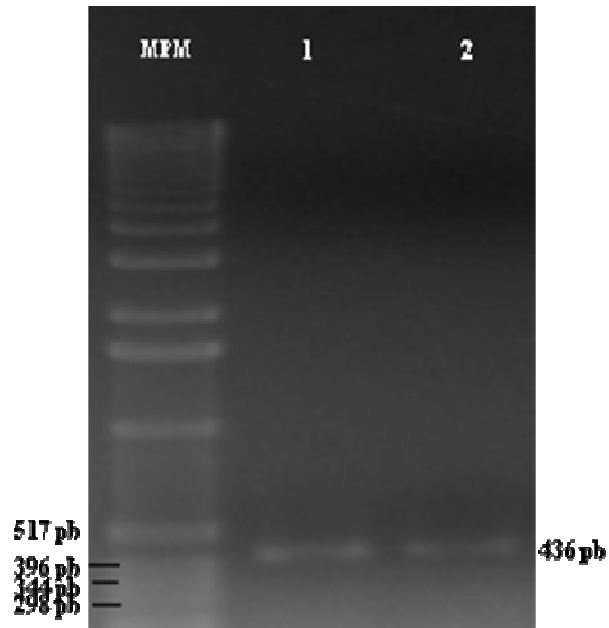
<sup>a</sup> Genetix® versión 6.1 1996-2002, Genetix CORP.

### **PCR-1 para la amplificación del CAI**

El producto de 394 pb obtenido mediante RT-PCR fue posteriormente utilizado como molde en una primera PCR. Para ello se usaron los iniciadores compuestos VP2-Act1 y VP2-Act2, los cuales, en los extremos 3' tienen una secuencia del gen de la  $\beta$ -actina humana y en los extremos 5' secuencias del gen de la proteína VP2 del IPNV. Así se obtuvo un producto de PCR de 436 pb que corresponde al CAI. Al analizar los productos mediante electroforesis en un gel de agarosa, se visualizaron dos bandas, una de 394 pb y otra banda de 436 pb (dato no mostrado). Debido al resultado anterior, se realizó una segunda PCR para obtener solamente productos de 436 pb.

### **PCR-2 para la amplificación de un producto de 436 pb correspondiente al CAI.**

En esta segunda PCR se utilizó como molde el producto de amplificación de la PCR-1 y los iniciadores VP2-1 y VP2-2 específicos para la proteína viral VP2. Se decidió la utilización de dichos iniciadores ya que en sus extremos contienen secuencias pertenecientes a la VP2 del IPNV. Una vez realizada la PCR-2, se logró amplificar un solo producto de 436 pb correspondiente al CAI (**fig. 11**) En la fig 2 contenida en materiales y métodos se muestra la secuencia y el tamaño del producto de 436 pb (construcción que incluye un segmento del gen  $\beta$ -actina humana y secuencias de la VP2)



**Fig.11.** Foto de un gel de agarosa al 1 % en TAE teñido con Br-E, donde se observan productos de amplificación de 436 pb correspondientes al CAI. Carriles 1 al 2: CAI. MPM = Marcador de peso molecular 1 Kb.

### **Clonación del CAI**

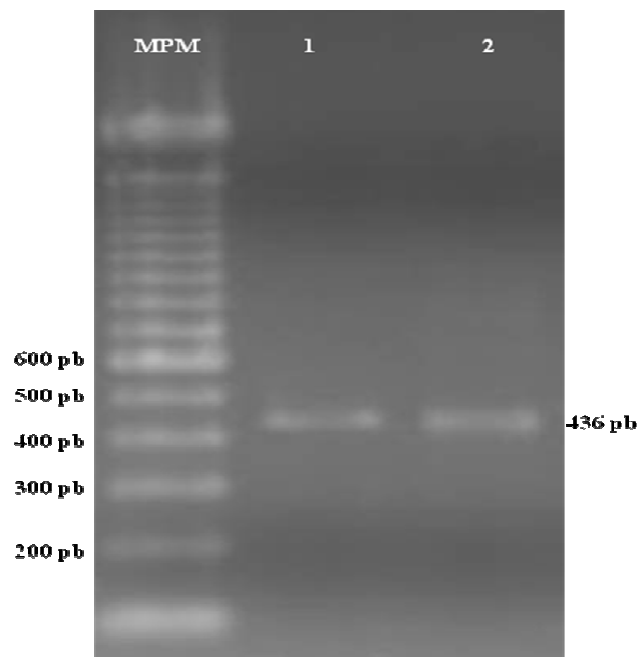
Una vez lograda la obtención de la amplificación del producto de 436 pb correspondiente al CAI, la construcción se insertó en el sitio múltiple de clonación del vector pcDNA3.1/V5-His-TOPO®. Este sistema ofrece una estrategia de clonación altamente eficiente y rápida, en el cual un producto amplificado por PCR se inserta en el sitio múltiple de clonación del plásmido sin necesidad de ligasa y también ofrece la ventaja de contener el promotor de CMV que expresa en células eucariontes el inserto de PCR clonado. El plásmido resultante se designó como pc3.1CAI.

El pc3.1CAI se utilizó para transformar la cepa *E. coli* DH5α en placas de agar LB con ampicilina usando el protocolo de transformación para células competentes mediante transformación química.



Para identificar a las colonias bacterianas portadoras del plásmido con el inserto se eligieron aleatoriamente colonias bacterianas transformantes de las cuales se obtuvo el ADN plasmídico.

Posteriormente, se realizó una tercer PCR utilizando los iniciadores VP2-1 y VP2-2 para comprobar la presencia de la secuencia del CAI en el ADN plasmídico extraído a partir de las colonias bacterianas transformantes seleccionadas. En dichas colonias se logró amplificar el CAI (**Fig. 12**)



**Fig. 12.** Foto de un gel de agarosa al 1 % en TAE teñido con Br-E, donde se observan productos de amplificación del CAI por medio de PCR utilizando ADN del pc3.1CAI. Carriles 1: CAI amplificado a partir de la clona 1; carril 2: CAI amplificado a partir de la clona 2. MPM = Marcador de peso molecular 1 Kb.

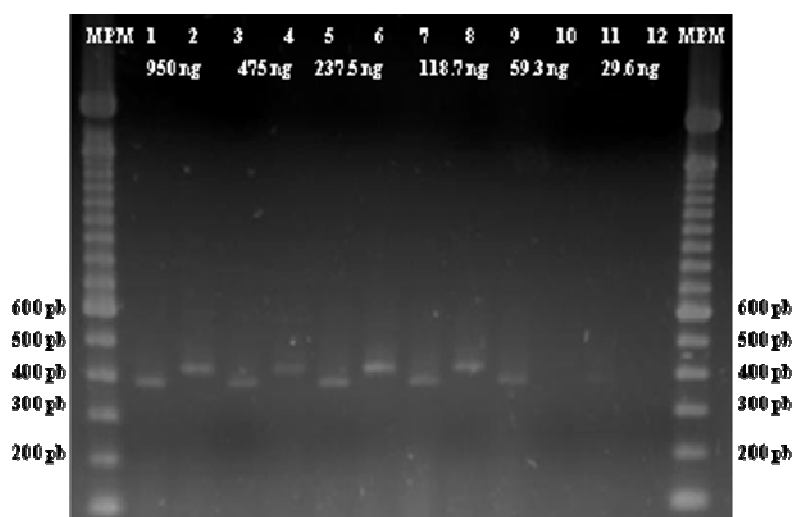
Una vez que se comprobó la presencia del CAI en las clonas seleccionadas y se realizó la purificación del ADN plasmídico; se realizó la transfección del pc3.1CAI en cultivo de células HeLa mediante el uso de Lipofectamina<sup>TM</sup>, esto con la finalidad de expresar en células eucariontes la secuencia del CAI clonado.

Para confirmar la expresión del ARNm del CAI, se realizó la extracción de ARN total en células HeLa transfectadas y una vez obtenido se realizó una RT-PCR utilizando los iniciadores Actin-1 y Actin-2 para la amplificación de  $\beta$ -actina humana y la amplificación del CAI con los iniciadores VP2-1 y VP2-2. Se consideraron como controles negativos: células HeLa transfectadas con el plásmido pcDNA3.1/V5-His-TOPO® sin el inserto, células HeLa tratadas con Lipofectamina™ y células HeLa sin transfectar. En las células HeLa transfectadas tanto a las 24 h como a las 36 h post-transfección se logró amplificar  $\beta$ -actina humana y el CAI, mientras que en los controles negativos solamente se logró amplificar un producto correspondiente a  $\beta$ -actina humana (**Fig. 13**).



**Fig. 13.** Foto de un gel de agarosa al 1 % en TAE teñido con Br-E, donde se observan productos de amplificación mediante RT-PCR, correspondientes a  $\beta$ -actina humana de 394 pb (carriles nones) y al CAI (carriles pares) de 436 pb, a partir de cultivo de células Hela transfectadas. Carril 1 y 2: células HeLa transfectadas con el plásmido pcDNA3.1/V5-His-TOPO® sin el inserto; carril 3 y 4: células HeLa tratadas con Lipofectamina; carril 5 y 6: células HeLa sin transfectar, carril 7 y 8: células HeLa transfectadas con el plásmido pc3.1CAI a las 24 h; carril 9 y 10: células HeLa transfectadas con el plásmido pc3.1CAI a las 36 h. MPM = Marcador de peso molecular 100 pb.

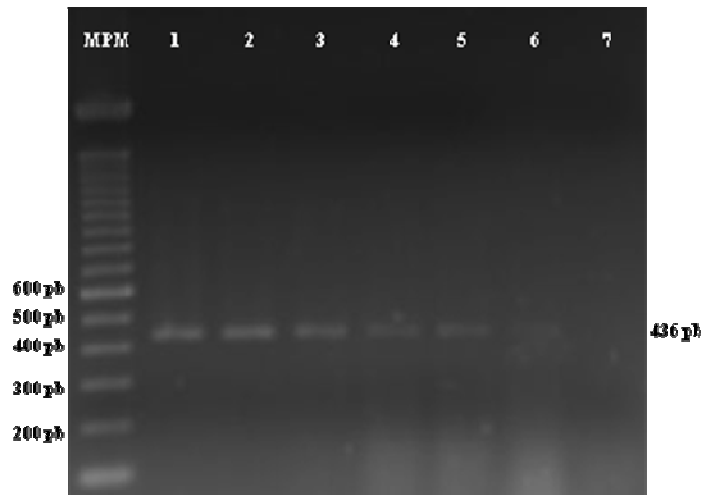
Con el fin de conocer el nivel de expresión del CAI en células HeLa transfectadas, se comparó el nivel de expresión del CAI con la expresión del gen de  $\beta$ -actina humana, para lo cual se hicieron diluciones dobles seriadas comenzando con 950 ng de ARN total hasta 29.6 ng. En este experimento se detectó que con 59.3 ng de ARN total extraído a partir de cultivo celular HeLa transfectado se logró la amplificación de  $\beta$ -actina humana, mientras que con 118.7 ng de ARN total se logró la amplificación del CAI (**Fig. 14**)



**Fig. 14.** Foto de un gel de agarosa al 1 % en TAE teñido con Br-E, donde se observan productos de amplificación mediante RT-PCR a partir de diluciones dobles seriadas iniciando con 950 ng de ARN total de células HeLa transfectadas. Carriles 1, 3, 5, 7, 9 y 11:  $\beta$ -actina humana; carriles 2, 4, 6, 8, 10 y 12: CAI. MPM = Marcador de peso molecular 100 pb.

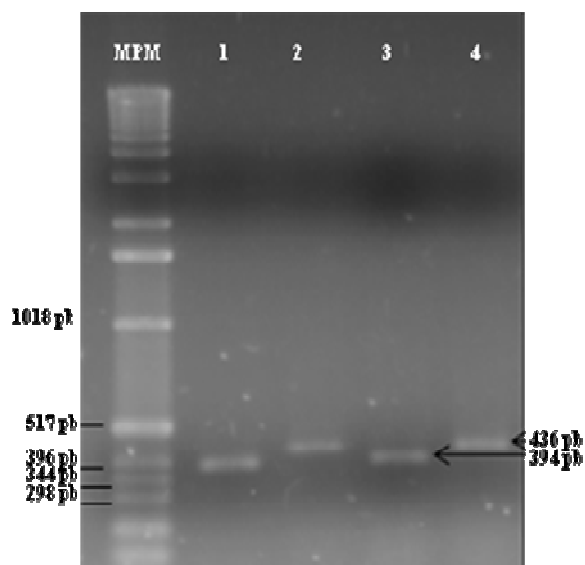
Una vez que se logró expresar el CAI en células HeLa y se comparó el nivel de expresión con respecto al gen de  $\beta$ -actina humana fue necesario conocer la cantidad mínima requerida de células HeLa transfectadas durante la extracción de ARN total para la amplificación del CAI. Para esto, se hicieron diluciones dobles seriadas a partir de 1, 000, 000 de células HeLa transfectadas. Posteriormente, se realizó la extracción de ARN total y se hizo la RT-PCR para amplificar el CAI utilizando los iniciadores VP2-1 y VP2-2. En este experimento, se detectó que la

cantidad mínima de células HeLa transfectadas requerida para la amplificación del CAI es con 62, 500 células (**Fig.15**)



**Fig.15.** Foto de un gel de agarosa al 1 % en TAE teñido con Br-E, donde se observan productos de amplificación del CAI a partir de diluciones dobles seriadas de cultivo de células HeLa transfectadas. Carril 1: 1,000,000 células, carril 2: 500,000 céls, carril 3: 250,000 céls, carril 4: 125, 000 céls, carril 5: 62,500 céls, carril 6: 31,250 céls, carril 7: 15,625 céls. MPM=Marcador de peso molecular 100 pb.

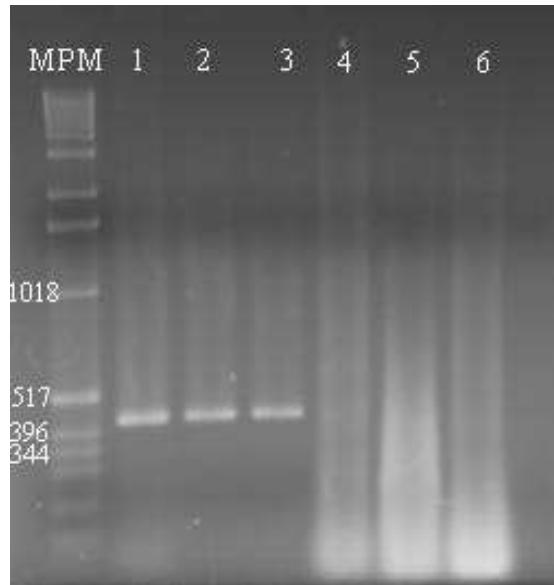
También se determinaron las condiciones y los períodos de tiempo durante los cuales deben mantenerse las células HeLa transfectadas hasta su utilización con las muestras clínicas. Para esto, una vez que se obtuvieron células HeLa transfectadas se mezclaron con TRIZOL y se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ , posteriormente se descongelaron a las 24,48 y 72 h para hacer la extracción de ARN total y la RT-PCR (dato no mostrado). Puesto que en los tiempos anteriores de congelación se logró la amplificación del CAI se decidió prolongar el tiempo de congelación a 7 y 15 d. En ambos períodos se logró la amplificación del CAI (**Fig. 16**).



**Fig. 16.** Foto de un gel de agarosa al 1 % en TAE teñido con Br-E, donde se observan productos de amplificación del CAI y  $\beta$ -actina humana a partir de cultivo de células HeLa transfectadas conservadas en TRIZOL a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Carril 1:  $\beta$ -actina humana, 7 días (d); carril 2: CAI, 7 d; carril 3:  $\beta$ -actina humana, 15 d; carril 4: CAI, 15 d. MPM = Marcador de peso molecular 1 Kb.

Por último, la utilización de las células HeLa transfectadas con el CAI se evaluó empleando dichas células con muestras de peces sospechosos a IPNV. Las células HeLa transfectadas se adicionaron junto con órganos o crías completas de trucha arco iris; se realizó la extracción de ARN total y finalmente se hizo la RT-PCR. Esta metodología permite evaluar las condiciones de la prueba desde la extracción de ARN hasta la RT-PCR, puesto que utilizando los iniciadores VP2-1 y VP2-2 se logra la amplificación del CAI y un producto de 232 pb perteneciente a un fragmento de la VP2 del IPNV en muestras positivas. Los resultados obtenidos a partir de las muestras de órganos fue la amplificación del producto de 436 pb correspondiente al CAI mientras que 3 muestras de crías completas no se obtuvo amplificación (**Fig.17**). Se procesaron en total 30 muestras de trucha arco iris y en la fig. 17 se muestra una imagen donde hubo fracaso en la reacción de RT-PCR cuando se utilizaron 3 muestras diferentes de

crías completas de trucha arco iris, mientras que en las 27 muestras de órganos de trucha arco iris restantes se logró la amplificación del CAI.



**Fig.17.** Foto de un gel de agarosa al 1.5 % en TAE teñido con Br-E, donde se observan productos de amplificación del CAI a partir de muestras de riñón, bazo y crías de trucha con la adición de cultivo de células HeLa transfectadas. Carril 1: muestra riñón1a; carril 2: muestra bazo4Ra, carril 3: bazo2b, carril 4: cría044, carril 5: cría014, carril 6: cría01. MPM = Marcador de peso molecular, ladder 1 Kb.

Debido a que no se obtuvo la amplificación de un fragmento del IPNV, se decidió buscar la secuencia de los iniciadores VP-1 y VP-2 en las diferentes cepas reportadas para IPNV y se observó que estos iniciadores son adecuados para lograr una amplificación mediante RT-PCR en la mayoría de las cepas reportadas en el *GeneBank*. En la **fig.18** se muestra el alineamiento del iniciador VP2-1 en cepas de IPNV y en la **fig. 19** se muestra la secuencia del iniciador VP2-2.



Fig. 18. Alineamiento del iniciador VP2-1 con diferentes cepas de IPNV reportadas en el *GeneBank*. En el recuadro rojo se muestra la complementariedad del iniciador con algunas cepas virales de IPN.

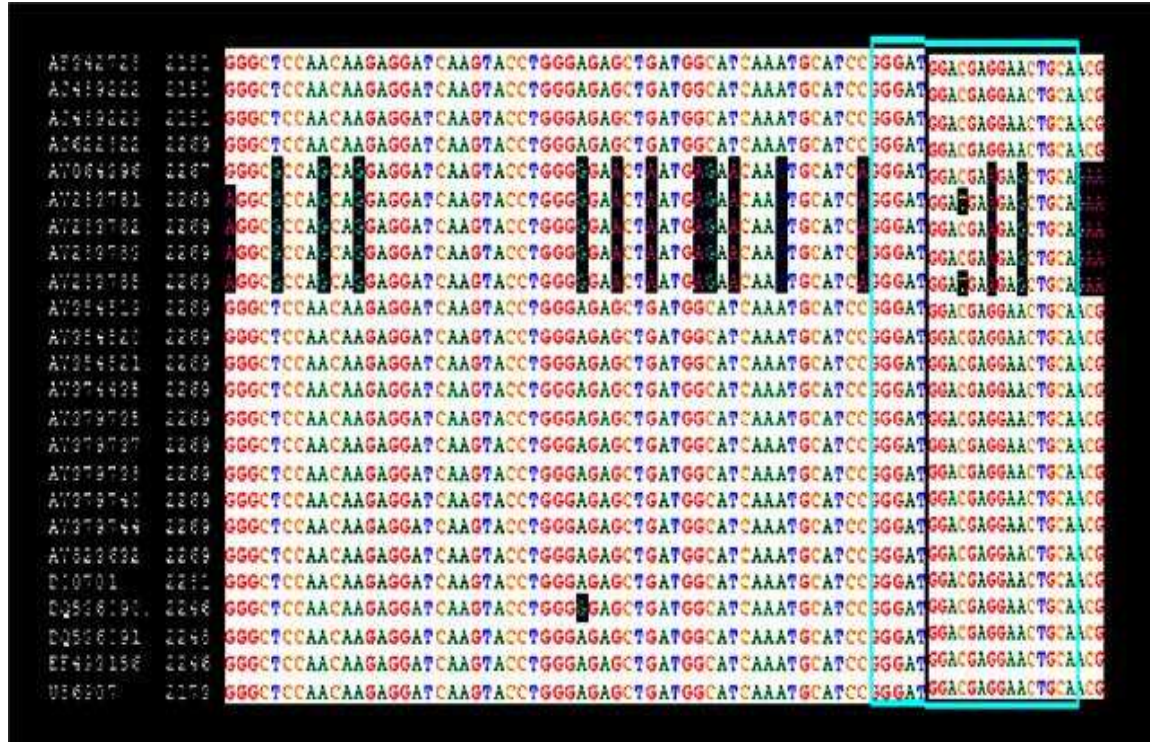


Fig. 19. Alineamiento del iniciador VP2-2 con diferentes cepas de IPNV reportadas en el *GeneBank*. En el recuadro azul se muestra la complementariedad del iniciador con cepas virales de IPN.



Por último, para confirmar que el producto esperado de 436 pb correspondiente al CAI fue el mismo producto que se clonó en el pcDNA3.1/V5-His-TOPO®, el plásmido pc3.1CAI una vez purificado se mandó a secuenciar a la Unidad de Secuenciación del Instituto de Fisiología Celular perteneciente a la UNAM. El análisis de la comparación muestra que aunque la secuencia clonada es igual a la esperada, el producto de 436 pb quedó insertado en sentido contrario. En la **fig. 20** se muestra la secuencia completa del CAI, incluyendo las secuencias de los iniciadores VP2-1 y VP2-2.

```

SEQSECUENCIA PCDNA3.1: 724 bp;
Composition 141 A; 214 C; 199 G; 183 T; 5 OTHER
Percentage: 19% A; 29% C; 27% G; 25% T; 1%OTHER
Molecular Weight (kDa): ssDNA: 228.63 dsDNA: 457.5

1 CTGGCTA GTTAAC TTGGTACCGAGCTCGGA TCCACTA GTCCA GTGTGGTGGGAATTGCCCT
61 TTGCAGTT CCTCGTC CATCCCGA GTACTTGCCTTAGGAG G AGCAATGAT CTTGATCTTC
121 ATTGTGCTG GGTGCCAGGGCAGTGATCT CC TTCTGCATCCTGTGCGCAATGCCAGGGTAC
181 ATGGTGGT GCCG CCAGACAGCACT GTGTTGGCGTACAGGTCTTTGCGGATGTCCACGTCA
241 CACTTCATG ATGGAGTTGAAGGTAGTT TCGTGGATGCCACAGGACTCCATGCCAGGAAG
301 GAAGGCTGGAAGAGTGCCTCAGGGCAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGGTGATGACCTGG
361 CCGTCAGGCAGCTCGTAGCTCTTCTCCAGGGAGGAGCTGGAAGCAGCCGTGGCCATCTCT
421 TGCTCGAAGTCCA GGGCGACGT AGCACAACTT CTCCTTAA TGTCACGCACGATTTCTTTG
481 ATGTCTACACCGCAGATAAGGGCAATTCTGCAGATATCCAGCACAGTGGCGGCCGCTCGA
541 GTCTAGAGGGCCCGCGTTTGAAGGTAAGCCTATCCCTAACCCCTCCTCGGTCTCGATT
601 CTACGCGTA CCGGTCATCATCACCATC ACCATTGAGTTTAAACCGCTGATCAGCCTCGA
661 CTGTGC CTTCTAGTT GCCAGC CATCTGTTGT TTGCCC CTCCCCCGTGCCTTCCT TG NCC
721 TGGA

```

**Fig. 20. Resultado del análisis de secuenciación del pc3.1CAI. Secuencia completa del CAI en color marrón y flanqueado en color azul por la secuencia del iniciador VP2-2 y en color rojo la secuencia del iniciador VP2-1.**



## **6. DISCUSIÓN.**

En este trabajo se construyó un control de amplificación interna (CAI), el cual está compuesto en el centro por la secuencia de un segmento del gen de  $\beta$ -actina humana y los extremos por fragmentos de la secuencia de la proteína VP2 del IPNV. Después este CAI fue expresado en células HeLa y se establecieron las condiciones de uso para la aplicación de dicho control. De forma específica, se determinó el número de células HeLa transfectadas requeridas para su amplificación del CAI y el método para su conservación. Finalmente, estas células se emplearon junto con muestras sospechosas a IPNV para evaluar la metodología desde la extracción de ARN total hasta la RT-PCR y determinar alguna falla a lo largo del procedimiento y por consiguiente resultados falsos negativos.

Aunque las pruebas de diagnóstico molecular son rápidas, sensibles y específicas, no están exentas de tener resultados falsos negativos. Una falla en la reacción puede deberse a una incorrecta mezcla de los reactivos, mala actividad de la ADN polimerasa o mal funcionamiento del termociclador. Estas situaciones pueden evaluarse utilizando controles positivos. Las muestras clínicas, éstas por su origen pueden contener factores inhibidores o éstos pueden ser adicionados durante el procedimiento de extracción de los ácidos nucleicos ocasionando resultados falsos negativos. A diferencia de los controles positivos externos, la aplicación de los CAI al ser colocados en cada una de las muestras clínicas sospechosas, generan información sobre la eficiencia de la extracción de los ácidos nucleicos, así como las condiciones en las que se lleva a cabo la reacción en cada una de las muestras, detectando con precisión las muestras verdaderas

negativas. Numerosos estudios demuestran que existen sustancias inhibidoras, que pueden actuar durante la extracción de los ácidos nucleicos, degradándolos o secuestrándolos, o en etapas posteriores inhibiendo la Polimerasa. Aunque existen una gran variedad de inhibidores, como hemoglobina, urea, ácidos biliares, grasa,  $\text{Ca}^{2+}$  y heparina, en la mayoría de los casos no se sabe la manera en la que actúan. Debido a la condición anterior, en este trabajo se construyó un CAI de tipo competitivo diseñado para utilizarse en conjunto con muestras sospechosas a IPNV, las cuales en su mayoría contienen elementos inhibidores que pueden ocasionar errores en la RT-PCR (Wilson, 1997). Durante este estudio se pudo observar la inhibición de la amplificación del CAI en algunas muestras, específicamente las correspondientes a crías completas de trucha. Este resultado puede deberse a la presencia de factores inhibidores de la reacción, los cuales podrían haber estado en el contenido intestinal o deberse a una excesiva cantidad de grasa y tejido. Lo anterior demuestra que sí existen sustancias inhibidoras en las muestras de trucha y la adición del CAI en dichas muestras permitió identificar los resultados falsos negativos que representan un problema grave en el diagnóstico de IPNV.

En el CAI de tipo competitivo se utiliza un solo juego de iniciadores para amplificar tanto al CAI como a la secuencia blanco, es importante considerar que en este caso, la amplificación del CAI puede competir con la amplificación del otro producto de interés, puesto que existe competencia entre el control y la secuencia blanco por los reactivos y los iniciadores. Por tal motivo, para evitar favorecer alguna de las dos reacciones, Hoorfar recomienda considerar que el tamaño del CAI siempre debe ser mayor al de la secuencia blanco, debido a que la reacción

cinética se verá inclinada hacia la amplificación del producto de menor tamaño (Hoorfar *et al*, 2004).

En este trabajo se decidió construir un CAI de tipo competitivo, ya que con los controles de tipo no competitivo se tienen las siguientes desventajas: se requiere una PCR simultáneo en la cual las condiciones de temperatura y de la reacción sean las adecuadas para la amplificación de dos reacciones diferentes, puesto que se utilizan dos juegos diferentes de iniciadores se corre el riesgo de interacciones inespecíficas entre ellos; de igual forma este control puede no necesariamente reflejar las condiciones de amplificación de la secuencia blanco.

Considerando lo anterior, se construyó un CAI de tipo competitivo con un tamaño de 436 pb mientras que la amplificación de la VP2 del IPNV tiene un tamaño de 232 pb. Esta diferencia de tamaño permite favorecer la amplificación del producto de 232 pb, detectar y diferenciar mediante electroforesis al CAI del producto amplificado perteneciente al IPNV.

Otros autores han utilizado controles internos competitivos en el diagnóstico de diferentes enfermedades infecciosas. Estos investigadores observaron que la adicción del control interno no compromete el límite de detección de la secuencia blanco y dicho control sirvió como indicador de la prueba detectando falsos negativos (Rosenstraus *et al.*, 1998; Siebert y Larrick, 1992; Sachadyn y Kurt, 1998; Dreier *et al.*, 2005). Existen experimentos donde se reportan resultados negativos, pero algunos de estos corresponden realmente a resultados falsos negativos. Maauroufi y col diseñaron un control interno múltiple para la detección de 5 microorganismos de diferente naturaleza (4 virus y un parásito); donde éste control contenía todas las secuencias de los iniciadores sentido y contrasentido. El

control interno se utilizó analizando 614 muestras y el fracaso en la PCR se presentó con una frecuencia de 0 a 8.8% de inhibición. Además, observaron que en las reacciones en las que agregaron una alta concentración de ADN del microorganismo se originó una inhibición o desaparición de la señal del CAI, para resolver este problema hicieron diluciones del ADN y finalmente lograron la amplificación del CAI en algunas muestras (Maaouroufi *et al.*, 2006). Jason y col, mencionan que un adecuado método de extracción de ARN junto con la adición de adyuvantes como albúmina sérica bovina y polivinilpirrolidona pueden reducir los efectos de inhibidores presentes en la reacción, pero sin un adecuado control interno para la RT-PCR la efectividad de la reacción en muestras clínicas no puede ser evaluada. Por tal motivo, en el 2005, diseñaron un control interno competitivo para la técnica de Transcripción Reversa cuantitativa-Reacción en Cadena de la Polimerasa (qRT-PCR) en el diagnóstico de enterovirus en muestras medioambientales. El 93% de las muestras (25 de 27) tuvo un fracaso en la reacción. Después, las muestras que mostraron una inhibición de la reacción fueron diluidas y posteriormente incluidas en una nueva reacción junto con el control interno y el 15% (4 de 27) de las muestras determinadas como negativas sí contenían el genoma viral (Jason *et al.*, 2006). Debido a lo anterior, es importante utilizar CAI para detectar resultados falsos negativos y así disminuir errores en la interpretación de los resultados obtenidos en la PCR y RT-PCR.

El primer paso para la construcción del CAI es obtener de la muestra un ARN con cantidad y calidad suficiente para lograr la amplificación del producto esperado en la RT. Según Kerr y Cunningham, López-Vázquez y col, los métodos de extracción de ácidos nucleicos deben de evaluarse antes de ser incluidos en

una técnica de diagnóstico de rutina (Kerr y Cunningham, 2004, López-Vázquez *et al.*, 2006). El método utilizado en este trabajo para la extracción de ARN a partir de cultivo de células HeLa se basó en el uso de isotiocianato de guanidina (Chomczynski y Sacchi, 1987), éste método fue adecuado puesto que se obtuvo la calidad y cantidad suficiente para la amplificación de la  $\beta$ -actina humana y el CAI en la RT-PCR.

Una vez obtenido el ARN se utilizaron los iniciadores Actin-1 y Actin-2, los cuales fueron útiles para lograr la amplificación mediante RT-PCR de un producto esperado de 394 pb que corresponde a un fragmento del gen de  $\beta$ -actina humana. Por lo tanto el diseño de estos iniciadores fue óptimo para la amplificación del fragmento de 394 pb el cual se logra solo a partir de ARNm de células HeLa.

Para conocer la concentración mínima requerida en la RT-PCR para la amplificación un fragmento del gen de  $\beta$ -actina humana se hicieron diluciones de ARN total extraído de cultivo de células HeLa y se utilizaron para amplificar al producto que corresponde a  $\beta$ -actina humana. Tres repeticiones de este ensayo fueron consistentes para determinar que con 60 ng de ARN total a partir de células HeLa se logra amplificar el fragmento de 394 pb.

El CAI se construyó utilizando el producto de amplificación de  $\beta$ -actina humana y los iniciadores compuestos VP2-Act1 y VP2-Act2. Aunque inicialmente, en la PCR 1 se obtuvieron dos productos, uno de 394 pb correspondiente a la  $\beta$ -actina y otro de 436 pb correspondiente al CAI, finalmente al realizar otra PCR utilizando como molde los productos de la PCR 1 y los iniciadores VP2-1 y VP2-2 se logró obtener un sólo producto de 436 pb.

Utilizando el Programa *Blast* del NCBI se logró determinar la especificidad de los iniciadores VP2-1 y VP2-2, la cual se confirmó mediante el análisis realizado para determinar el porcentaje de homología con otros organismos. Al utilizar solamente las secuencias en las cuales se detectó homología entre los iniciadores VP2-1 y VP2-2 y las secuencias reportadas se determinó que existía un 100 % de identidad sólo con cepas de IPNV. De igual forma, para confirmar el alineamiento de los iniciadores VP2-1 y VP2-2 se utilizó el programa *Genetix*. Los resultados obtenidos correspondieron a los esperados en los cuales se obtuvo una complementaridad de los iniciadores con la mayoría de las cepas de IPNV reportadas.

Mediante el análisis bioinformático se comprobó la utilidad de los iniciadores VP2-1 y VP2-2, reportados y utilizados por Taksdal en el 2001. Los resultados mostraron que estos iniciadores son específicos y son adecuados para obtener un producto de amplificación mediante RT-PCR en la mayoría de las cepas de IPNV reportadas. Los anteriores resultados son respaldados por los experimentos realizados en el país por la Universidad Autónoma de Chihuahua y el Centro Nacional de Servicios de diagnóstico en Salud Animal (CENASA) en donde se comprobó la utilidad de dichos iniciadores para detectar IPNV en muestras de truchas asintomáticas obtenidas en granjas productoras de trucha arco iris presentes en el país (Guerrero, 2007).

Una vez obtenida la construcción del CAI, se clonó en el plásmido pcDNA3.1/V5-His TOPO®, éste tiene el promotor de CMV que expresa en células eucariontes el inserto de PCR. El plásmido resultante se identificó como pc3.1CAI. Una vez que se obtuvo la clonación del CAI se mandó a secuenciar y el análisis de

comparación demostró que el producto clonado es igual al producto esperado de 436 pb. Y aunque el inserto no se encontraba en la dirección correcta de traducción, este hecho no afectó el objetivo del experimento.

Para conocer el comportamiento del CAI en el vector con el sistema eucarionte elegido en este trabajo, se comparó el nivel de expresión del CAI con respecto al de la  $\beta$ -actina humana, puesto que se conoce que el gen de la  $\beta$ -actina humana es un gen constitutivo y su nivel de expresión se utiliza como control de referencia para muchos estudios (Thellin *et al.*, 1999). Para conocer la sensibilidad de detección de moléculas de ARNm de este ensayo, los resultados obtenidos fueron estimados por comparación a los niveles de expresión de ARNm para  $\beta$ -actina reportados en la Enciclopedia *GeneCard* del Instituto de Ciencia Weizmann. En ésta enciclopedia se integra información almacenada en las principales fuentes de datos como la de NCBI, también se incluyen los datos de expresión de genes obtenidos mediante diferentes métodos como microarreglos y qRT-PCR. El dato obtenido a partir de esta enciclopedia es que 1  $\mu$ g de ARN total extraído a partir de células humanas contiene  $1.2 \times 10^8$  moléculas de ARNm del gen de  $\beta$ -actina humana. Por lo tanto, si en este ensayo se apreció que se requiere 118.7 ng de ARN total para amplificar el CAI esto equivale a 14, 244, 000 moléculas de ARNm, mientras que para amplificar  $\beta$ -actina se necesitaron 59.3 ng de ARN total equivalente a 7, 116, 000 moléculas de ARNm para su amplificación. Esto va aunado con el número de células transfectadas que se requieren para la amplificación del CAI. En este estudio, también se determinó que la cantidad mínima de células HeLa transfectadas requeridas son 62,500 células, mantenidas con TRIZOL a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante un periodo no mayor a 15 días. Considerando los

experimentos anteriores puede asumirse que utilizando un plásmido con un promotor de expresión en células eucariontes la expresión del CAI con este sistema no tuvo un nivel de expresión similar al de la  $\beta$ -actina humana. 62,500 células puede parecer un número excesivo, sin embargo debe contemplarse que no se sabe el número real de células HeLa transfectadas. Un experimento que puede considerarse a partir de los resultados obtenidos en este trabajo, es que en ensayos posteriores para el diseño de CAI para RT-PCR se utilicen vectores de expresión que contengan genes reporteros como la proteína verde fluorescente para conocer con exactitud la eficiencia de transfección y optimizar la cantidad de células HeLa empleadas (Cubitt, 1995; Tsien, 1998).

Finalmente, el uso del CAI se evaluó con la adición de células HeLa transfectadas a muestras de peces sospechosos a IPNV. La amplificación del CAI apoya la interpretación de los resultados, ya que la presencia de la amplificación del CAI y la ausencia de la amplificación del IPNV permite validar un resultado verdadero negativo, de igual forma la amplificación del CAI y del producto correspondiente al fragmento de la proteína VP2 del IPNV en una muestra clínica sospechosa puede reportarse como positiva.

Aunque la amplificación del IPNV no se detectó en las muestras clínicas, la detección del CAI provee una confianza de que las condiciones en las cuales se realizaron la extracción de ARN total y la RT-PCR fueron correctas y que no hubo factores inhibidores. En algunos casos, la amplificación del CAI y la ausencia de la amplificación de la secuencia blanco puede deberse a la baja cantidad de microorganismos presentes en la muestra clínica, sobre todo cuando las muestras no son conservadas adecuadamente, esto en el caso específico de la detección de



partículas virales, donde el ARNv es muy sensible a la degradación (Dingle *et al.*, 2003). En el caso de inhibición de la amplificación del CAI y/o del IPNV cuando se utilizaron crías completas de trucha arco iris este resultado puede asociarse a las reacciones en las que están presentes una alta concentración de sustancias inhibitoras que originan una inhibición o desaparición de la señal del CAI, para resolver este problema pueden realizarse diluciones del ARN total incluido en la RT-PCR (Maauroufi *et al.*, 2006;

El CAI fue diseñado en este trabajo para identificar resultados falsos negativos cuando se trabajan muestras clínicas y que por su naturaleza se considera que pueden contener factores inhibidores. Existen varios trabajos donde se construyen y se utilizan CAI cuando realizan el diagnóstico de microorganismos en muestras biológicas, pero a la fecha no se ha reportado ninguno en que se utilice un sistema de expresión en células eucariontes para producir moléculas de ARNm del CAI. Por lo anterior, es importante mencionar que la adición de células HeLa transfectadas con el plásmido pc3.1CAI a las muestras clínicas permite evaluar desde la metodología de extracción de ARN total hasta las condiciones en las que se realizó la RT-PCR para el diagnóstico de IPN.

La cepa de IPNV aislada y genotipificada por Guerrero y col. en el 2008, que fue donada a la Dirección General de Investigación en Acuicultura del Instituto Nacional de la Pesca, SAGARPA, puede ser utilizada como cepa de referencia junto con el CAI para el control positivo en el diagnóstico de IPNV en ensayos posteriores.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en éste trabajo, se considera que se cumplió el objetivo general y los objetivos específicos planteados. De igual

se acepta la hipótesis ya que, la utilización de controles internos en la RT-PCR para el diagnóstico de la necrosis pancreática en los salmónidos permitió identificar resultados falsos negativos.

## **7. CONCLUSIONES**

1. Se construyó un sistema de producción de moléculas de ARNm utilizando un vector de expresión para células eucariontes. Este vector fue empleado como control de amplificación interna (CAI) y se demostró su utilidad para monitorear las condiciones en las cuales se realiza la extracción de ARN hasta la amplificación de las secuencias blanco durante la RT-PCR.
2. La adición del CAI a muestras de trucha arco iris permitió detectar resultados falsos negativos.
3. Este CAI puede ser utilizado y reproducido en cualquier laboratorio que realice el diagnóstico de IPNV.
4. Este es el primer trabajo en el cual se diseña un control de amplificación interna para apoyar el diagnóstico de IPNV en México.

## **8. PROSPECTIVAS**

- Evaluar el CAI con otros sistemas en los cuales se incluya cultivo celular infectado con IPNV, virus de IPN o muestras infectadas experimentalmente con títulos virales conocidos.
- Realizar ensayos de competencia en la RT-PCR, entre el CAI y el virus de IPN para determinar la concentración mínima detectable del IPNV.
- Hacer una evaluación más extensiva del CAI utilizando un número mayor de muestras sospechosas a IPN.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Abu Al-Soud W and Rådström P. 2001. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol* 39:485-493.
2. Adair BM, Ferguson HW. 1981. Isolation of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus from non-salmonid fish. *J. Fish Dis* 4: 69-76.
3. Ahne W. 1978. Isolation and characterization of infectious pancreatic necrosis virus from pike (*Esox lucius*). *Arch Virology* 58: 65-69.
4. Alonso M, Rodríguez S, Perez-Prieto SI. 1999. Nested PCR improves detection of infectious hematopoietic necrosis virus in cells co infected with infectious pancreatic necrosis virus. *J Virol Methods* 81:1-9.
5. Anhe W and Negele RD. 1985. Studies on transmission of infectious pancreatic necrosis virus via eyed eggs and sexual products of salmonid fish. In: *Fish and Shellfish Pathology*, Ellis A.E., ed. Academic Press, London, UK. p. 261-269.
6. Anhe W, Jorgensen PE, Olesen NJ, Fischer-Scherl T and Hoffmann R. 1989. Aquatic Birnaviruses: virus of the serogroup II isolated from an IPN outbreak in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 9:14-16.
7. Bebak J, McAllister PE, Smith G. 1998. Infectious pancreatic necrosis virus: transmission from infectious to susceptible rainbow trout fry. *J Aquat Anim Health* 10:287-293.
8. Blake S, Ma J and Caporale D. 2001. Phylogenetic relationships of aquatic birnaviruses based on deduced amino acid sequences of genome segment A cDNA. *Dis Aquat Org* 45: 89-102.
9. Blake SL, Schill WB, McAllister PE, Lee MK, Singer JT, Nicholson BL. 1995. Detection and identification of aquatic birnaviruses by PCR assay. *J Clin Microbiol* 33:835-839.
10. Brown F. 1984. The classification and nomenclature of viruses: summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses in Sendal, September 1984. *Intervirology* 25: 141-143.

11. Bullock GL, Rucker RR, Amend D, Wolf K, Stuckey HM. 1976. Infectious pancreatic necrosis: transmission with iodine-treated and non treated eggs of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). J Fish Res Board Can 33:1197-1198.
12. Caswell-Reno P, Lipipun V, Reno PW and Nicholson BL. 1989. Utilization of a group reactive and other monoclonal antibodies in an enzyme immunodot assay for identification and presumptive serotyping of aquatic birnaviruses. J Clin Microbiol 27:1924-1929.
13. Caswell-Reno P, Reno PW, Nicholson BL. 1986. Monoclonal antibodies to infectious pancreatic necrosis virus: analysis of viral epitopes and comparison of different isolates. J Gen Virology 67: 2193-2205.
14. Chomczynski P and Sacchi N. 1987. Annal. Biochem. 162:156-159.
15. Chou HY, Peng TY, Chang SJ, Hsu YL, Wu JL. 1999. Effect of heavy metal stressor and salinity shock on the susceptibility of grouper (*Epinephelus sp.*) to infectious pancreatic necrosis virus. Vir Res 63. 121-129.
16. Ciccarone V. Lipofectamine<sup>TM</sup>. 2000. Reagent for rapid, efficient transfection eukaryotic cells-Focus 21: 54.
17. Crane MSJ, Smith PH, Williams LM, Hyatt AD, Eaton LM, Gould A et al. 2000. First isolation of an aquatic birnavirus from farmed and wild fish species in Australia. Dis Aquat Organ 43:1-14.
18. Cubitt AB. 1995. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. Trends Biochem Sci 20:448-455.
19. Davis FJ, Landler LA, Perry PW, Rossington D and Alcock R. 1994. The detection of infectious pancreatic necrosis virus in asymptomatic carrier fish by an integrated cell-culture and ELISA technique. J Fish Dis 17:99-110.
20. Dingle K, Crook D and Jeffery K. 2003. Stable and noncompetitive RNA Internal Control for routine clinical diagnostic Reverse Transcription-PCR. J Clin Microbiol 42:1003-1011.
21. Dobos P and Roberts TE. 1983. The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus: a review. Can. J. Gen. Microbiol 29:377-384.
22. Dobos P. 1976. Size and structure of the genome of infectious pancreatic necrosis virus. Nucleic Acids Res. 3:1903-1919.

23. Dobos P. 1977. Virus-specific protein synthesis in cells infected by infectious pancreatic necrosis virus. *J. Virology*. 21:242-258.
24. Dobos P. 1995a. The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Annu. Rev. Fish Dis*. 5:24-54.
25. Dobos P. 1995b. Protein-primed RNA synthesis in vitro by the virion associated RNA polymerase of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* 208: 19-25.
26. Dopazo CP, Barja JL. 2002. Diagnosis and identification of IPNV in salmonids by molecular methods. In: *Molecular Diagnosis of Salmonid Diseases* (ed. by C.O. Cunningham) Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. p.23-48
27. Dorson M and Torchy C. 1981. The influence of fish age and water temperature on mortalities of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, caused by a European strain of infectious pancreatic necrosis virus. *J Fish Dis* 4:213-221.
28. Dreier J, Stormer M, and Kleesiek K. 2005. Use of bacteriophage MS2 as a control in viral Reverse- Transcription-PCR Assays. *J Clin Microbiol* 43: 4551-4557.
29. Duncan R, Mason CL, Nagy E, Leong JA and Dobos P. 1991. Sequence analysis of infectious pancreatic necrosis virus genome segment B and its encoded VP1 protein: a putative RNA-dependent RNA polymerase lacking the Gly-Asp-Asp motif. *Virology* 181:541-552.
30. Duncan R, Nagy E, Krell PJ and Dobos P. 1987. Synthesis of the infectious pancreatic necrosis virus polyprotein, detection of a virus-encoded protease, and fine structure mapping of genome segment A coding regions. *J. Virology*. 61:3655-3664.
31. Galloux M, Chevalier C, Henry C, Huet JC, Da Costa B and Delmans B. 2004. Peptides resulting from the pVP2 C-terminal processing are present in infectious pancreatic necrosis virus particles. *J Gen. Virology* 85:2231-2236.
32. Granzow H, Weiland F, Fichtner D and Enzmann PJ. 1997. Studies of the ultrastructure and morphogenesis of fish pathogenic viruses grown in cell culture. *J Fish Dis* 20: 1-10.

33. Guerrero CL. 2007. Detección de Aquabirnavirus por RT-PCR en infección experimental. Resumen final. Instituto Nacional de la Pesca. Centro Nacional de Servicios de diagnóstico en Salud Animal (CENASA). México, D.F.
34. Guerrero L, Herrera E, Salinas J, Torres J, Montero AB, Barrón B. 2008. Detection and genotyping of an infectious pancreatic necrosis virus from asymptomatic rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) facilities in Mexico. *Intervirology* 51: 285-292.
35. Halder M, Ahne W. 1992. Freshwater crayfish *Astacus astacus* – a vector for infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Dis Aquat Organ* 1988; 4:205-209.
36. Heppell J, Berthiaume L, Corbin F, Tarrab E, Lecomte J and Arella M. 1993. Comparison of amino acid sequences deduced from a cDNA fragment obtained from infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) strains of different serotypes. *Virology* 195:840-844.
37. Hill BJ, Way K. 1995. Serological classification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and other aquatic birnaviruses. *Ann Rev Fish Dis* 5:55-77.
38. Hjalmarsson A, Carlemalm E and Everitt E. 1999. Infectious pancreatic necrosis virus: identification of a VP3-containing ribonucleoprotein core structure and evidence for O-linked glycosylation of the capsid protein VP2. *J Virol* 73:3484-3490.
39. Hong JR, Hsu YL, Wu JL. 1999. Infectious pancreatic necrosis virus induces apoptosis due to down-regulation of survival factor MCL-1 protein expression in a fish cell line. *Virus Res* 63:75-83.
40. Hong JR, Lin TL, Hsu YL, Wu JL. 1998. Apoptosis precedes necrosis of fish cell line with infectious pancreatic necrosis virus infection. *Virology* 250:76-84.
41. Hong JR, Wu JL. 2002. Induction of apoptotic death in cells via Bad gene expression by Infectious pancreatic necrosis virus infection. *Cell Death Differ* 9, 113-124.



42. Hoorfar J, Cook N, Malorny B, Wagner M, De Medici D, Abdulmawjood A and Fach P. 2003. Making internal amplification control mandatory for diagnostic PCR. *J Clin Microbiol* 41: 5835.
43. Hoorfar J, Malorny B, Abdulmawjood A, Cook N, Wagner M, Fach P. 2004. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostics PCR assays. *J Clin Microbiol* 42:1863-1868.
44. Hosono N, Suzuki S and Kusuda R. 1996. Genogrouping of birnaviruses isolated from marine fish: a comparison of VP2/NS junction regions on genome segment A. *J Fish Dis* 19:295-302.
45. <http://bioinformatics.weizmann.ac.il/cards>
46. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
47. Inoue H, Nojima H and Okayama H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28.
48. Jarp J, Taksdal T, Tørud B. 1996. 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* 27:81-88.
49. Jashes M, Gonzalez M, Lopez-Lastra M. De Clercq E, Sandino A. 1996. Inhibitors of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) replication. *Antiviral Res* 312.
50. Jashes M, Mlynarz G, De Clercq E, Sandino AM. 2000. Inhibitory effects of EICAR on infectious pancreatic necrosis virus replication. *Antiviral Res* 45:9-17.
51. Jason BG, Litaker W and Noble R. 2006. Rapid one-step quantitative Reverse Transcriptase PCR assay with Competitive Internal positive Control for detection of Enteroviruses in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 72:3960-3967
52. Kerr CR and Cunningham CO. 2006. Moving molecular diagnostics from laboratory to clinical application: a case study using infectious pancreatic necrosis virus serotype A. *Letters in Applied Microbiology* 43:98-104.

53. Kuznar J, Soler M, Farias G, Espinoza JC. 1995. Attachment and entry of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) into CHSE-214 cells. Arch Virology 140:1833-1840.
54. Lientz JC, Springer JE. 1973. Neutralization test of infectious pancreatic necrosis virus with polyvalent antiserum. J Wild Dis 9:120-124.
55. Lopez-Lastra M, Gonzalez M, Jashes M, Sandino AM. 1994. A detection method for infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) based on reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR). J Fish Dis 17:269-282.
56. López-Vázquez C, Dopazo CP, Oliveira JG, Barja JL, Bandin I. 2006. Development of a rapid, sensitive and non-lethal diagnostic assay for the detection of viral haemorrhagic septicaemic virus. J of Virological Methods 133:167-174.
57. M'Gonigle RH. 1941. Acute catarrhal enteritis of salmonid fingerlings. Trans. Am. Fish. Soc. 70: 297-303.
58. Maauroufi Y, De Bruyne J M, Duchateau V, Scheen R and Crokaert F. 2006. Development of a multiple internal control for clinical diagnostic real-time amplification assays. FEMS Immunol Med Microbiol 48:183-191.
59. Maroni K. 2003. IPN in Salmonids, A. Review. VESO and FHL. A report supported by the Fisheries and Aquaculture industries Research Fund and the Norwegian Research Council. p. 118.
60. Mc Allister PE, Owens WJ. 1995. Recovery of infectious pancreatic necrosis virus from the faeces of wild piscivorous birds. Aquaculture 1992; 106: 227-232.
61. McAllister PE, Reyes X. 1988. Infectious pancreatic necrosis virus: isolation from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, imported into Chile. J Fish Dis 7:319-322.
62. McKnight IJ, Roberts RJ. 1976. The pathology of infectious pancreatic necrosis. The sequential histopathology of the naturally occurring condition. Br Vet J 132:76-85.

63. McMichael J, Fryer JL and Pilcher KS. 1978. An antigenic comparison of three strains of infectious pancreatic necrosis virus of salmonid fish. *Aquaculture* 6:203-210.
64. Midtlyng P, Evensen O, Rimstad E, Stagg R, Brun E, Skjelstad B, Johansen LH and Jensen I. 2003. Vaccination in IPN in Salmonids: A Review. Trondheim, Norway: FHL and VESO. p. 85-95.
65. Migus DO, Dobos P. 1980. Effect of ribavirin on the replication of infectious pancreatic necrosis virus in fish cell cultures. *J Gen Virology* 47:47-57.
66. Morley RS. 1993. A model for the assessment of the animal disease risk associated with the importation of animals and animal products. *Rev Sci Tech* 12:1055-1092.
67. Mulcahy D, Pascho RJ. 1984. Adsorption to fish sperm of vertically transmitted fish virus. *Science* 225:333-335.
68. Munro ES, Gahlawat SK, Acosta F and Ellis AE. 2006. In infectious pancreatic necrosis virus carrier Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts, almost all kidney macrophages ex vivo contain a low level of non-replicating virus. *J Fish Dis* 29:43-48.
69. Nicholson BL. 1993. Use of monoclonal antibodies in identification and characterization of fish viruses. *Annu. Rev. Fish Dis* 3:241-257.
70. Nishizawa T, Kinoshita S, Yoshimizu M. 2005. An approach for genogrouping of Japanese isolates of aquabirnaviruses in a new genogroup VII, based on the VP2/NS junction region. *J Gen Virology* 86: 1973-1978
71. Novoa B, Barja JL, Figueras A. 1995. Entry and sequential distribution of an aquatic birnavirus in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 131:1-9.
72. Okamoto N, Taniguchi N, Seno Y and Sano T. 1984. The relation between the change of quantities of infectious pancreatic necrosis virus in infected rainbow trout fry and the disease process. *Fish Pathol* 19:1-4.
73. Ortega SC, Montes de Oca R, Groman D, Yason C, Nicholson B and Blake S. 2002. Case report: viral infectious pancreatic necrosis in farmed rainbow trout from Mexico. *J Aquat Anim Health* 14:305-310.

74. Pallen MJ, Puckey LH and Wren BW. 1992. A rapid, simple method detecting PCR failure. *PCR Methods and Applications* 2: 91-2.
75. Park KC, PW Reno. 2003. The effect of in vitro passage of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) on virulence and sensitivity of the virus to rainbow trout serum. *J Aquat anim Health* 15: 128-135.
76. Pasloske BL, Walkerpeach CR, Obermoeller RD, Winkler M, Dubois DB. 1998. Armored RNA technology for production of ribonuclease-resistant viral RNA controls and standards. *J Clin Microbiol* 36:3590-3594.
77. Radstrom P, Knutsson R, Wolffs P, Lovenklev M, Lofstrom C. 2004. Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples. *Mol. Biotechnol* 26:133-146.
78. Reno PW. 1999. Infectious pancreatic necrosis and associated aquatic birnaviruses.. In: Woo PTK, Bruno DW, editors. *Fish Diseases and Disorders. Viral, Bacterial and Fungal Infections*. London: CABI Publishing. p.1-55.
79. Rimstad E, Hornes E, Olsvik O, Hyllseth B. 1990. Identification of a double-stranded RNA virus by using polymerase chain reaction and magnetic separation of the synthesized DNA segments. *J Clin. Microbiol* 28: 2275-2278.
80. Roberts RJ, Pearson MD. 2005. Infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon *Salmo salar* L. *J Fish Dis* 28:383-90.
81. Roberts RJ, Pearson MD. 2005. Infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.J. *fish Dis* 28:383-390.
82. Robertsen B. 2005. The interferon system of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol* 2:171-191.
83. Rodríguez S, Borrego JJ and Pérez Prieto SI. 2001. Comparative evaluation of five serological methods and RT-PCR assay for the detection of IPNV in fish. *J Virology Methods* 97:23-31
84. Rodríguez S, Vilas MP, Alonso M, Pérez SI. 1995. Study of a viral-dual infection in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) by seroneutralization, Western blot and polymerase chain reaction assay. *Microbiol SEM* 11: 461–470.

85. Rolfs A, Schuller I, Finckh U and Weber-Rolfs I. 1992. Clinical diagnostics and research, substances affecting PCR: Inhibition or enhancement. Edit. Springer –Velag Berlin Heidelberg. p53-55.
86. Rosenstraus M, Wang Z, Chang SY, De Bonville D and Spadaro JP. 1998. An internal control for routine diagnostic PCR: desing, properties, and effect on clinical performance. J Clin Microbiol 36:191-197.
87. Sachadyn P and Kur J. 1998. The construction and use of PCR internal control. Molecular and Cellular Probes 12: 259-262.
88. Sadasiv EC.1995.Immunological and pathological responses of salmonids to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). Annu. Rev. Fish Dis. 5:209-223.
89. Sambrook J, Fritsh EF and Maniatis T. 2002. Molecular cloning a Laboratory Manual, 2a edition, Tomo I.
90. Sano T. 1971. Studies on viral diseases of Japanese fishes. Infectious pancreatic necrosis of rainbow trout: first isolation from epizooties in Japan. Bull Jpn Soc Fish 37: 495-498.
91. Santi N, Song H, Vakharia VN and Evensen Ø. 2005a. Infectious pancreatic necrosis virus VP5 is dispensable for virulence and persistence. J Virol 79:9206-9216.
92. Santi N, Sandtrø A, Sindre H, Song H, Hong JR, Thu B, Wu JL, Vakharia VN, Evensen Ø. 2005b. Infectious pancreatic necrosis virus induces apoptosis in vitro and in vivo independent of VP5 expression. Virology 342:13-25.
93. Santi N, Vakharia VN, Evensen Ø. 2004. Identification of putative motifs involved in the virulence of infectious pancreatic necrosis virus. Virology 322: 31-40.
94. Sanz F, Coll J. 1992. Techniques for diagnosing viral diseases of salmonid fish. Diseases of Aquatic Organisms 13: 211-223.
95. Siebert PD and Larrick JW. 1992. Competitive PCR. Nature 359:557-558.
96. Smail DA, Bain N, Bruno DW, King JA, Thompson F, Pendrey DJ, Morrice S and Cunningham CO. 2006. Infectious pancreatic necrosis virus in Atlantic salmon, *Salmo salar* L; post-smolts in the Shetland Isles, Scotland: virus

- identification, histopathology, immunohistochemistry and genetic comparison with Scottish main an isolates. J Fish Dis 29:31-41.
97. Taksdal T, Danneving BH, Rimstad E. 2001. Detection of infectious pancreatic necrosis (IPN)-virus in experimentally infected Atlantic salmon parr by RT-PCR and cell culture isolation. Bull Eur Assoc Fish Pathol 21:214-219.
  98. Thellin O, Zora W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A and Heinen E. 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. J Biotechnol 75: 291-295.
  99. Tisdall DJ and Phipps JC. 1987. Isolation and characterization of a marine birnavirus from returning quinnat salmon (*O. tshawytscha*) in the south island Zealand. NZ Vet. J 35: 217-218.
  100. Tsien RY. 1998. The green fluorescent protein. Ann Rev Biochem 67:509-544.
  101. Villanueva RA, Galaz JL, Valdés JA, Jashés MM and Sandino AM. 2004. Genome assembly and particle maturation of Birnavirus Infectious pancreatic necrosis virus. J of Virology 78:13829-13838.
  102. Wang WS, Wi YL, Lee JS. 1997. Single-tube, non-interrupted reverse transcription PCR for detection of infectious pancreatic necrosis virus. Dis aquat Org 28:229-233.
  103. Wiedbrauk DL and Farkas DH. 1995. Molecular methods of virus detection. Acad. Press. p. 386
  104. Williams K, Blake S, Sweeney A, Singer JT, Nicholson BL. 1999. Multiplex reverse transcriptase PCR assay for simultaneous detection of three fish viruses. J Clin Microbiol; 37:4139-4141.
  105. Wilson IG. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Applied and environmental microbiology 63:3741-3751.
  106. Wolf K and Quimby Mc. 1971. Salmonid viruses: infectious pancreatic necrosis virus. Morphology, pathology and serology of first European isolations. Arch. Gesamte Virusforsch 34:144-56.

107. Wolf K, Snieszko SF, Dunbar CE and Pyle E. 1960. Virus nature of infectious pancreatic necrosis virus in trout. Proc. Soc. Exp. Biol. Med 104:105-108.
108. Wolf K. 1998. Infectious pancreatic necrosis in "Fish viruses and fish virus diseases". New York. Cornell University Press, Ithaca. p. 115-157.
109. Wood EM, Snieszko SF and Yasutake WT. 1955. Infectious pancreatic necrosis in brook trout. Arch. Pathol 60:26-28.
110. World Organisation for Animal Health. Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases. France: OIE. 2004.