

**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUIMICA**

Profesor Patrocinante :
Dra. Ana Maria Sandino
Unidad de Virología
Instituto de Nutrición y
Tecnología de los Alimentos
Universidad de Chile.

Profesor Patrocinante :
Dr. Manuel Krauskopf
Instituto de Bioquímica
Universidad Austral de Chile.

**Desarrollo de un método para la detección del Virus de la necrosis
pancreática infecciosa.**

**Tesis de Grado presentada como parte
de los requisitos para optar al Grado de
LICENCIADO EN BIOQUIMICA.**

Marcelo Andrés López Lastra

Valdivia - Chile

1994

**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUIMICA**

Profesor Patrocinante :
Dra. Ana María Sandino
Unidad de Virología
Instituto de Nutrición y
Tecnología de los Alimentos
Universidad de Chile.

Profesor Patrocinante :
Dr. Manuel Krauskopf
Instituto de Bioquímica
Universidad Austral de Chile.

**Desarrollo de un método para la detección del Virus de la necrosis
pancreática infecciosa.**

**Tesis de Grado presentada como parte
de los requisitos para optar al Grado de
LICENCIADO EN BIOQUIMICA.**

Marcelo Andrés López Lastra

Valdivia - Chile

1994

ÍNDICE

Introducción 1

I. Historia 2

II. Descripción 3

III. Metodología 4

IV. Resultados 5

V. Conclusiones 6

VI. Bibliografía 7

VII. Anexos 8

VIII. Glosario 9

IX. Índice de figuras 10

X. Índice de tablas 11

XI. Índice de cuadros 12

XII. Índice de mapas 13

XIII. Índice de fotografías 14

XIV. Índice de esquemas 15

XV. Índice de gráficos 16

XVI. Índice de cuadros estadísticos 17

XVII. Índice de cuadros de datos 18

XVIII. Índice de cuadros de resultados 19

XIX. Índice de cuadros de conclusiones 20

XX. Índice de cuadros de recomendaciones 21

XXI. Índice de cuadros de sugerencias 22

XXII. Índice de cuadros de críticas 23

XXIII. Índice de cuadros de elogios 24

XXIV. Índice de cuadros de felicitaciones 25

XXV. Índice de cuadros de agradecimientos 26

XXVI. Índice de cuadros de dedicatorias 27

XXVII. Índice de cuadros de dedicatorias 28

XXVIII. Índice de cuadros de dedicatorias 29

XXIX. Índice de cuadros de dedicatorias 30

XXX. Índice de cuadros de dedicatorias 31

XXXI. Índice de cuadros de dedicatorias 32

XXXII. Índice de cuadros de dedicatorias 33

XXXIII. Índice de cuadros de dedicatorias 34

XXXIV. Índice de cuadros de dedicatorias 35

XXXV. Índice de cuadros de dedicatorias 36

XXXVI. Índice de cuadros de dedicatorias 37

XXXVII. Índice de cuadros de dedicatorias 38

XXXVIII. Índice de cuadros de dedicatorias 39

XXXIX. Índice de cuadros de dedicatorias 40

XL. Índice de cuadros de dedicatorias 41

XLI. Índice de cuadros de dedicatorias 42

XLII. Índice de cuadros de dedicatorias 43

XLIII. Índice de cuadros de dedicatorias 44

XLIV. Índice de cuadros de dedicatorias 45

XLV. Índice de cuadros de dedicatorias 46

XLVI. Índice de cuadros de dedicatorias 47

XLVII. Índice de cuadros de dedicatorias 48

XLVIII. Índice de cuadros de dedicatorias 49

XLIX. Índice de cuadros de dedicatorias 50

L. Índice de cuadros de dedicatorias 51

L.I. Índice de cuadros de dedicatorias 52

L.II. Índice de cuadros de dedicatorias 53

L.III. Índice de cuadros de dedicatorias 54

L.IV. Índice de cuadros de dedicatorias 55

L.V. Índice de cuadros de dedicatorias 56

L.VI. Índice de cuadros de dedicatorias 57

L.VII. Índice de cuadros de dedicatorias 58

L.VIII. Índice de cuadros de dedicatorias 59

L.IX. Índice de cuadros de dedicatorias 60

L.X. Índice de cuadros de dedicatorias 61

L.XI. Índice de cuadros de dedicatorias 62

L.XII. Índice de cuadros de dedicatorias 63

L.XIII. Índice de cuadros de dedicatorias 64

L.XIV. Índice de cuadros de dedicatorias 65

L.XV. Índice de cuadros de dedicatorias 66

L.XVI. Índice de cuadros de dedicatorias 67

L.XVII. Índice de cuadros de dedicatorias 68

L.XVIII. Índice de cuadros de dedicatorias 69

L.XIX. Índice de cuadros de dedicatorias 70

L.XX. Índice de cuadros de dedicatorias 71

L.XXI. Índice de cuadros de dedicatorias 72

L.XXII. Índice de cuadros de dedicatorias 73

L.XXIII. Índice de cuadros de dedicatorias 74

L.XXIV. Índice de cuadros de dedicatorias 75

L.XXV. Índice de cuadros de dedicatorias 76

L.XXVI. Índice de cuadros de dedicatorias 77

L.XXVII. Índice de cuadros de dedicatorias 78

L.XXVIII. Índice de cuadros de dedicatorias 79

L.XXIX. Índice de cuadros de dedicatorias 80

LXXX. Índice de cuadros de dedicatorias 81

LXXXI. Índice de cuadros de dedicatorias 82

LXXXII. Índice de cuadros de dedicatorias 83

LXXXIII. Índice de cuadros de dedicatorias 84

LXXXIV. Índice de cuadros de dedicatorias 85

LXXXV. Índice de cuadros de dedicatorias 86

LXXXVI. Índice de cuadros de dedicatorias 87

LXXXVII. Índice de cuadros de dedicatorias 88

LXXXVIII. Índice de cuadros de dedicatorias 89

LXXXIX. Índice de cuadros de dedicatorias 90

LXXXX. Índice de cuadros de dedicatorias 91

LXXXXI. Índice de cuadros de dedicatorias 92

LXXXXII. Índice de cuadros de dedicatorias 93

LXXXXIII. Índice de cuadros de dedicatorias 94

LXXXXIV. Índice de cuadros de dedicatorias 95

LXXXXV. Índice de cuadros de dedicatorias 96

LXXXXVI. Índice de cuadros de dedicatorias 97

LXXXXVII. Índice de cuadros de dedicatorias 98

LXXXXVIII. Índice de cuadros de dedicatorias 99

LXXXXIX. Índice de cuadros de dedicatorias 100

**A mis padres
y
a mi amada esposa
Helga.**

INDICE

Indice de figuras y tablas.....	iii
Abreviaturas.....	v
1. Resumen.....	1
Abstract.....	2
2. Introducción.....	3
3. Material y Métodos.....	9
3.1. Materiales.....	9
3.1.2. Reactivos.....	9
3.1.3. Material biológico.....	9
3.1.3.1. Virus.....	9
3.1.3.2. Bacterias.....	10
3.1.3.3. Células.....	10
3.1.3.4. Peces.....	10
3.1.3.5. Ovas.....	11
3.1.4. Oligonucleótido.....	11
3.1.4.1. Partidores.....	11
3.1.5. Sonda.....	13
3.1.5.1. cDNA del segmento A.....	13
3.2. Métodos.....	13
3.2.1. Obtención y caracterización de las partículas virales.....	13
3.2.1.1. Propagación y purificación viral.....	13
3.2.1.2. Caracterización de las partículas virales por microscopía electrónica.....	14
3.2.2. Extracción del RNA genómico de IPNV.....	14
3.2.3. Determinación de la concentración del (ds)RNA viral extraído.....	15
3.2.4. Análisis de las muestras de peces mediante cultivo celular.....	15

3.2.5. Infección experimental de ovas de salmón Coho.....	16
3.2.6. Tratamiento del tejido para ser utilizado directamente en la reacción de amplificación.....	16
3.2.7. Método general de transcripción reversa y amplificación genómica por la reacción de la polimerasa en cadena (RT-PCR).....	16
3.2.8. Análisis de los productos de amplificación.....	17
3.2.8.1. Identificación de los productos de amplificación por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%.....	17
3.2.8.2. Identificación de los productos de amplificación por hibridación.....	17
3.2.8.3. Reconocimiento de los productos de RT-PCR por amplificación anidada.....	18
4. Resultados.....	20
4.1. Obtención y caracterización de las partículas virales.....	20
4.2. Reacción de RT-PCR.....	25
4.3. Identificación de los productos de amplificación de la reacción RT-PCR mediante hibridación y PCR anidado.....	29
4.3.1. Identificación de los producto de amplificación por hibridación.....	29
4.3.2. Identificación de los productos de amplificación por medio de la reacción de PCR anidado.....	34
4.4. Amplificación del RNA genómico de tres cepas de IPNV mediante RT-PCR.....	37
4.5. Especificidad del ensayo RT-PCR.....	42
4.6. Sensibilidad del ensayo RT-PCR.....	45
4.7. Detección de IPNV directamente de tejidos infectados utilizando el ensayo RT-PCR.....	47
5. Discusión.....	54
5.1. Conclusiones.....	61
6. Agradecimientos.....	62
7. Literatura citada.....	64

Indice de figuras y tablas.

a) Figuras :

Figura 1 :	Diagrama de la síntesis de los polipéptidos del virus IPN.....	6
Figura 2 :	Ubicación de las secuencias partidoras en el segmento A del genomio de IPNV.....	11
Figura 3 :	Identificación del efecto citopático del virus IPNV en la línea celular CHSE-214.....	22
Figura 4 :	Microfotografía de partículas virales de IPNV.....	23
Figura 5 :	Caracterización del genomio viral en geles de poliacrilamida.....	24
Figura 6 :	Caracterización de los productos de amplificación RT-PCR en geles de poliacrilamida.....	26
Figura 7 :	Optimización del número de ciclos de amplificación para la reacción RT-PCR.....	28
Figura 8 :	Electroforesis en gel de agarosa del segmento de cDNA aislado a partir del plasmidio VLN.....	30
Figura 9 :	Detección de la marca radiactiva de la sonda de cDNA por autorradiografía.....	31
Figura 10 :	Identificación de los productos de amplificación RT-PCR por hibridación.....	33
Figura 11 :	Identificación de los productos por medio de PCR anidado.....	35 - 36

Figura 12 : Amplificación del RNA genómico de tres cepas de IPNV mediante RT-PCR.....	38
Figura 13 : Verificación de la marcación no radiactiva de la sonda de cDNA.....	39
Figura 14 : Ensayo de hibridación de los productos de amplificación obtenidos a partir de RNA genómico de tres cepas diferentes de IPNV.....	41
Figura 15 : Especificidad del método RT-PCR para la identificación de IPNV.....	43 - 44
Figura 16 : Sensibilidad del ensayo RT-PCR.....	46
Figura 17 : Análisis directo de tejidos infectados.....	49 - 50
Figura 18 : Ensayo RT-PCR en muestras de tejidos provenientes de peces portadores del virus IPN.....	51 - 53

b) Tablas :

Tabla I : Secuencias, código de identificación, posición en el mapa de VP2, longitud y orientación de los partidores.....	12
Tabla II : Combinación de los partidores y longitud de los productos esperados.....	25

Abreviaturas.

A	: Absorbancia.
BSA	: Seroalbúmina de bovino.
BCIP	: 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil fosfato.
CHSE-214	: Células de embrión de salmón Chinook.
dATP	: Desoxiadenosina-5' trifosfato.
dATP-7 biotina	: Biotina-7-desoxidaenosina-5' trifosfato.
dCTP	: Desoxicitosina- 5' trifosfato.
DEPC	: Dietilpirocarbonato.
dGTP	: Desoxiguanosina-5' trifosfato.
DNA	: Acido desoxirribonucleico.
dsRNA	: Acido ribonucleico de doble hebra.
DTT	: Ditiotreitol.
dTTP	: Desoxitimidina- 5' trifosfato.
ECP	: Efecto citopático.
EDTA	: Acido etilendiaminotetracético.
HEPES	: Acido N-2-hidroxietil piperazín-N' -2- etanosulfónico.
IHNV	: Virus de la Necrosis Hematopoiética Infecciosa.
IPN	: Necrosis pancreática infecciosa.
IPNV	: Virus de la necrosis pancreática infecciosa.
MEM	: Medio mínimo de Eagle.
MMLV	: Virus de la leucemia murínica de Maloney.
NBT	: Azul de nitrotetrazolium.
PCR	: Reacción de la polimerasa en cadena.
PFU	: Unidades formadoras de placas.
RNA	: Acido ribonucleico.
RT	: Transcripción reversa.
SDS	: Dodecil sulfato de sodio.
SFB	: Suero fetal bovino.
TdT	: Desoxinucleotidil transferasa terminal.
TEMED	: N, N, N', N' -tetrametiletilendiamina.
Tris	: Tris-(hidroximetil) aminometano.
UI/ml	: Unidades Internacionales por mililitro.
V	: Volt.

1. RESUMEN.

El virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), es el agente etiológico de una enfermedad altamente contagiosa que produce grandes mortalidades, especialmente en salmones jóvenes en cultivo. Además este virus también afecta a especies no salmónidos, y es así como ha sido aislado desde una gran variedad de peces y moluscos. En la actualidad no existen vacunas para prevenir la enfermedad y es por ello fundamental contar con un método de diagnóstico que permita vigilar la presencia del agente y así controlar su diseminación. Por este motivo hemos desarrollado un método de diagnóstico rápido, sensible y altamente específico para el virus IPN, basado en la asociación de la reacción de transcripción inversa con la reacción de la polimerasa en cadena (RT-PCR). Este ensayo permite realizar la transcripción inversa del RNA genómico de IPNV y la amplificación posterior del cDNA en un mismo tubo de reacción. La especificidad del ensayo está dada por los oligonucleótidos utilizados como partidores, los que se seleccionaron desde la región del genoma que codifica para la proteína mayoritaria de la cápside viral, VP2. Al realizar la reacción RT-PCR utilizando distintas combinaciones de partidores se obtiene sólo un producto mayoritario, el cual se caracterizó por hibridación con una sonda de cDNA específica y por un ensayo de PCR anidado. Los partidores reconocen como templado inicial al genoma proveniente de tres cepas de IPNV, Sp, VR-299 y Jasper, correspondientes a serotipos y serogrupos diferentes. Además no se obtiene producto de amplificación al utilizar otros patógenos marinos importantes para la acuicultura. Mediante este ensayo se detectó cantidades tan pequeñas como 1pg de RNA genómico viral, al utilizar como sistema de visualización del producto amplificado, geles de poliacrilamida teñidos con plata. El aporte más trascendental del método es que a diferencia de los métodos que actualmente se utilizan para identificar el virus IPN, no requiere de la propagación viral por cultivo celular, y permite detectar el virus directamente en tejido de peces infectados, tanto sintomáticos como asintomáticos para la enfermedad. Además se tienen resultados preliminares que permiten sugerir que la reacción RT-PCR desarrollada posibilita detectar el virus IPN directamente en ovas infectadas.

ABSTRACT.

Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) is the causal agent of a contagious, high-mortality disease of young, hatchery-reared salmonids. However it can also kill a number of nonsalmonid fish and has been isolated from a variety of marine fish and molluscs. Currently no vaccine exists for its prevention, therefore a rapid and sensitive method of diagnosis is critical if dissemination of this virus is to be controlled. For this reason we have developed a rapid, sensitive and highly specific IPNV detection method, based on a reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). This PCR assay permits the reverse transcription of IPNV genomic RNA and the amplification of the cDNA in a single reaction tube. The specificity of the assay is provided by the oligonucleotide primers, selected from IPNV major capsid, VP2, coding region. For each primer combination only one major product is obtained when amplification is performed using IPNV dsRNA, from three different viral strains, which have been classified as different serotypes and which belong to different viral serogroups, Sp, VR-299 and Jasper, as the initial reaction template. This product was further characterized by Southern hybridization using a specific cDNA probe and by a nested PCR assay. No RT-PCR product was detected when genomic nucleic acids other than IPNVs were used as RT-PCR templates. To assess the sensitivity of the method, dilutions of purified IPNVs dsRNA total genome were amplified. Quantities as little as 1pg of purified dsRNA were detected, when the amplification product was visualized by silver stained polyacrylamide gel electrophoresis. This technique detected IPNV directly from, symptomatic and asymptomatic, infected coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissues and ova samples, avoiding previous viral propagation in cell cultures. The results show that RT-PCR amplification is useful for the rapid direct tissue detection of IPNV.

2. INTRODUCCION.

El creciente interés mundial por la actividad acuícola ha impulsado el estudio de aquellos factores que implican un riesgo en la producción de las especies en crianza intensiva. Uno de los factores de riesgo de mayor importancia lo constituyen las enfermedades asociadas a agentes infecciosos. Entre los agentes patógenos más estudiados se encuentran los virales (Ortega et al., 1993). En la actualidad se han identificado más de 60 virus como agentes causales de enfermedades que afectan a las especies en cultivo (McAllister, 1988, Samil and Munro, 1989). Entre los patógenos virales de mayor importancia para la industria acuícola encontramos : Adenovirus, Herpesvirus, Iridiovirus, Birnavirus, Calicivirus, Rabdovirus, Reovirus y Retrovirus (Wolf, 1988). De éstos, el agente viral de mayor incidencia, es el virus de la necrosis pancreática infecciosa, IPNV, miembro de la familia *Birnaviridae*. Este agente viral ha sido aislado desde 63 especies de peces y mariscos, y es reconocido además como el virus acuático de mayor distribución global. Entre las especies marinas, económicamente importantes, afectadas por este agente viral encontramos aquéllas que pertenecen al género *Salmo* (trucha arcoiris y salmón del atlántico), al género *Oncorhynchus* (salmón coho, salmón rosado, salmón chum, salmón kokane, salmón chinook y trucha amago) y al género *Salvelinus* (trucha alpina, trucha lacustre americana y umbrea japonesa). El virus IPN también ha sido aislado desde anguila japonesa (*Anguilla japonica*), anguila europea (*Anguilla anguilla*), lenguado común (*Solea solea*), carpa común (*Cyprinus carpio*), desde alevines de turbot (*Scophthalmus maximus*) y de mariscos marinos como ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*), ostra americana (*Crassostrea virginica*), ostra plana (*Ostrea edulis*), almeja (*Mercenaria mercenaria*), mejillón (*Mytilus edulis*) y lapa (*Patella vulgata*) entre otras (McAllister, 1988, Novoa et al., 1993, Hsu et al., 1993). El IPNV ha sido detectado en aguas y en los peces en cultivo en países como Canadá, Dinamarca, Inglaterra, Francia, Alemania, Grecia, Italia, Japón, Corea, Noruega, Escocia, Suecia, Yugoslavia, Estados Unidos, Taiwán y Chile (MacDonald, 1983, Hedrick et al., 1983, McAllister y Reyes, 1984, Hedrick et al., 1985, Wolf, 1988, Kusuda et al., 1993, Sanjuan et al., 1993).

La amplia distribución del agente viral IPN, puede explicarse, ya que éste se transmite tanto vertical como horizontalmente (Pilcher y Fryer, 1980, Wolf,

1988, McAllister, 1988). La transmisión vertical está asociada a las ovas provenientes de las hembras portadoras, mientras que la transmisión horizontal ocurre como una consecuencia de la diseminación del virus a través de las heces y la orina. También pueden actuar como vectores mecánicos de transmisión homeotermos y poiquilotermos (McAllister, 1988, McAllister y Owens, 1992, Rivas et al., 1993). Además, es importante considerar como fuente de diseminación del virus, a aquellos peces que sobreviven a los brotes virales, los que se transforman en portadores de por vida, eliminando constantemente pequeñas cantidades del patógeno al medio (Pilcher y Fryer, 1980).

La enfermedad causada por IPNV se conoce como necrosis pancreática infecciosa (IPN) y produce una alta morbi y mortalidad entre las especies cultivadas, especialmente en salmónidos (Pilcher y Fryer, 1980, Samil y Munro, 1989). En los salmónidos la susceptibilidad al virus IPN varía con la edad. En los peces de uno a cuatro meses de edad la enfermedad se manifiesta como una infección aguda que puede resultar en una mortalidad acumulativa de hasta un 100% de los individuos (McAllister, 1988). Los peces de seis o más meses de edad en cambio, pueden desarrollar síntomas subclínicos o infecciones inaparentes, convirtiéndose en portadores del virus (McAllister, 1988). El mayor problema de esta enfermedad, es que no existe vacuna para su prevención (Dixon y Hill, 1983) ni tratamiento quimioterapéutico para controlarla (Sanz y Coll, 1992). Por lo tanto, la única manera de evitar la diseminación del IPNV, es mediante el reconocimiento precoz del virus y la erradicación inmediata de aquellos peces portadores del agente viral (Pilcher y Fryer, 1980).

Los signos clínicos de la enfermedad, pueden variar dependiendo del huésped afectado, del serotipo viral, de la densidad poblacional y de las condiciones ambientales predominantes, como son la temperatura y el contenido de oxígeno del agua (McAllister, 1988, Wolf, 1988). Sin embargo, los signos clínicos producidos por IPNV son muy semejantes a aquellos signos producidos por otros virus y bacterias que afectan a los salmónidos, lo que impide que éstos puedan ser utilizados por sí solos para la identificación certera del agente infeccioso responsable del cuadro clínico (MacAllister, 1988, Wolf, 1988).

Inicialmente se determinó la existencia de 3 serotipos del virus IPN : el serotipo 1 que corresponde a la cepa VR-299, predominante en Norte América, el

serotipo 2 que corresponde a la cepa Sp, predominante en Europa, y el serotipo 3 que corresponde a la cepa europea Ab. Sin embargo, actualmente ya se pueden distinguir alrededor de 10 serotipos (Barrie et al, 1992, Heppell et al, 1992). Además se ha efectuado una genotipificación basada en el análisis de la secuencia del genomio viral, definiéndose tres genogrupos principales y una gran variedad de subgrupos (Heppell et al., 1992).

En cuanto a las características estructurales y moleculares, el virus IPN posee una cápside icosaédrica (Cohen et al. 1973), de aproximadamente 60 nm de diámetro (Dobos y Roberts 1983). Su peso molecular es de 55×10^6 (Dobos y Rowe, 1977) y su genoma, consiste en dos segmentos de ácido ribonucleico de doble hebra (dsRNA), segmento A y segmento B (Dobos y Rowe, 1977, Mac Donald y Yamamoto, 1977, Dobos et al., 1979) los que equivalen al 8,7% del peso molecular de la partícula viral (Dobos y Rowe, 1977). Se ha determinado que ambos segmentos de RNA genómico tienen una proteína covalentemente unida al extremo 5' terminal, denominada VPg (Calvert et al., 1991).

El segmento A, de 3100 pares de bases y un peso molecular de $2,5 \times 10^6$ (Duncan y Dobos, 1986, Lawrence et al., 1989), codifica para una poliproteína de 100 kDa, la cual es procesada dando origen a dos proteínas estructurales, el precursor de VP2 (pVP2), VP3, y a una proteína no estructural, NS. El orden de los polipéptidos virales en la poliproteína es $\text{NH}_2\text{-pVP2-NS-VP3-COOH}$ (figura 1) (Duncan y Dobos, 1986, Duncan et al., 1987). El polipéptido NS ha sido identificado como la proteasa viral, responsable del procesamiento de la poliproteína (Lawrence et al., 1989). La proteína VP3 se encuentra formando parte de la nucleocápside, mientras que la proteína VP2 es la que constituye, en forma mayoritaria, la cápside externa (Lawrence et al., 1989). Además la proteína VP2 es la principal responsable de la inducción de anticuerpos neutralizantes del IPNV (MacDonald y Dobos, 1981, Samil y Munro, 1989, Lawrence et al., 1989). Se ha identificado en ella dos regiones inmunoreactivas, una que se extiende desde el aminoácido 99 al 206 y que contiene un epítipo muy conservado y la otra que está comprendida entre los aminoácidos 207 al 305 y que corresponde a un epítipo altamente divergente entre las diferentes cepas virales (Barrie et al., 1992).

El segmento B, de aproximadamente 2900 pares de bases y un peso molecular de $2,3 \times 10^6$, codifica para el polipéptido de la cápside interna o

nucleocápside, VP1, de aproximadamente 90 kDa (figura 1). De acuerdo a su secuencia nucleotídica se ha sugerido que VP1 correspondería a la RNA polimerasa viral. Esta proteína se encuentra presente en dos formas, libre en la nucleocápside y asociada al extremo 5' terminal del RNA genómico (MacDonald y Dobos, 1981, Mertens et al., 1982, Duncan et al. 1991, Calvert et al., 1991). Esta última forma de la proteína VP1 es la denominada VPg (Dobos y Roberts, 1982).

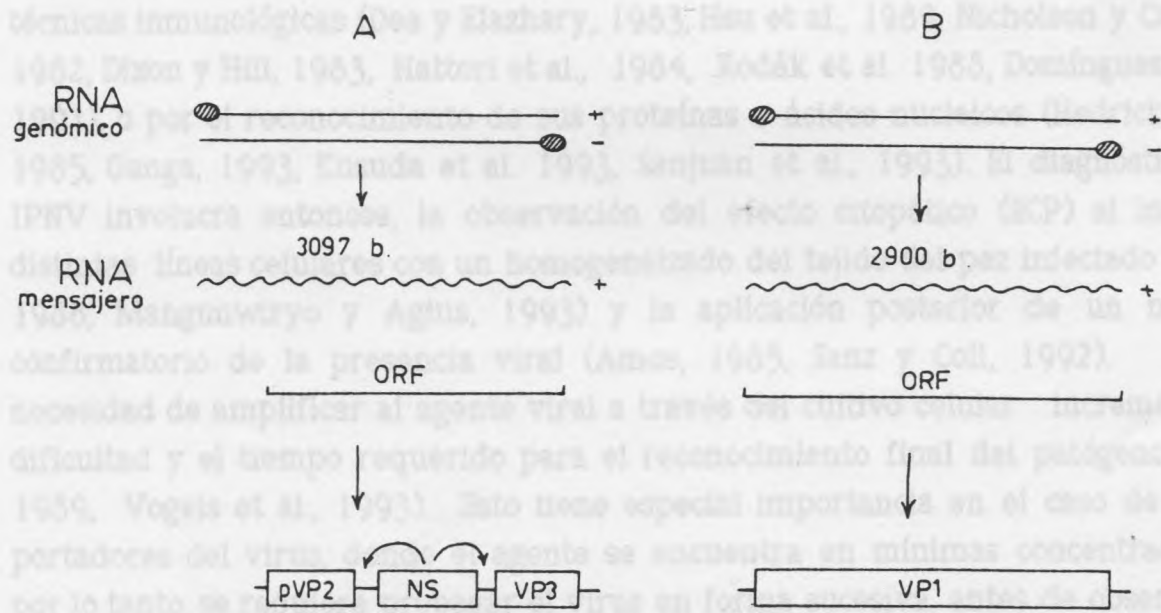


Figura 1 : Diagrama de la síntesis de los polipéptidos del virus IPN.

El virus IPNV se replica en una gran variedad de líneas celulares de salmónidos y no salmónidos (Pilcher y Fryer, 1980, Lannan et al., 1984). Sin embargo, las líneas más comúnmente utilizadas para su aislamiento son CHSE-214 (células de embrión de salmón Chinook), FHM (*Finephales promelas*), RTG-2 (células de gónadas de trucha arcoiris) y BF-2 (células de fibroblasto de "bluegill"). La eficiencia de producción de la progenie viral varía según la línea celular

utilizada siendo la línea celular CHSE-214 aquella con la cual se obtienen los mejores resultados (Pilcher y Fryer, 1980, Lannan et al., 1984, MacAllister, 1988).

Los métodos de diagnóstico para el virus IPN actualmente en uso pueden separarse en dos grupos. Aquéllos que miden la respuesta específica del huésped al agente viral y aquéllos que detectan directamente la presencia del virus (Amos, 1985, Sanz y Coll, 1992). Para detectar la reacción del huésped al agente patógeno generalmente se mide la respuesta inmune (Sanz y Coll, 1992, Mangunwiryo y Agius, 1993). Por otra parte, los métodos que detectan la presencia del agente viral requieren de un paso previo de propagación del virus en líneas de cultivo celular de peces, para posteriormente identificarlo ya sea por la caracterización de su morfología mediante microscopía electrónica (Kudo et al., 1973), utilizando técnicas inmunológicas (Dea y Elazhary, 1983, Hsu et al., 1989, Nicholson y Caswell, 1982, Dixon y Hill, 1983, Hattori et al., 1984, Rodák et al. 1988, Domínguez et al., 1991), o por el reconocimiento de sus proteínas o ácidos nucleicos (Hedrick et al. 1985, Ganga, 1993, Kusuda et al. 1993, Sanjuan et al., 1993). El diagnóstico del IPNV involucra entonces, la observación del efecto citopático (ECP) al inocular distintas líneas celulares con un homogeneizado del tejido del pez infectado (Wolf, 1988, Mangunwiryo y Agius, 1993) y la aplicación posterior de un método confirmatorio de la presencia viral (Amos, 1985, Sanz y Coll, 1992). Esta necesidad de amplificar al agente viral a través del cultivo celular incrementa la dificultad y el tiempo requerido para el reconocimiento final del patógeno (Hsu, 1989, Vogels et al., 1993). Esto tiene especial importancia en el caso de peces portadores del virus, donde el agente se encuentra en mínimas concentraciones, por lo tanto, se requiere propagar el virus en forma sucesiva, antes de observar la aparición del ECP esperado.

A la fecha no se ha descrito un método de identificación para el IPNV que cumpla por sí solo con las condiciones requeridas para el diagnóstico del agente viral. Es por ello que el objetivo de la presente tesis es desarrollar un método de detección para el virus de la necrosis pancreática infecciosa, rápido y sensible, que permita, en sólo unas pocas horas, identificar en forma específica al agente viral directamente a partir de los tejidos infectados, para así evitar la propagación previa del agente viral por cultivo celular (Saiki et al., 1989, Erlich, 1991). Se decidió desarrollar un método de detección para el IPNV, que pudiese ser implementado en laboratorios ictiopatológicos como técnica de diagnóstico

3. MATERIALES Y METODOS.

3.1. MATERIALES.

3.1.2. Reactivos :

American Radiolabeled Chemical Inc. : [α - ^{32}P] dCTP.

BIO RAD : Tris, acrilamida, Temed, APS, xilencianol, azul de bromofenol, sacarosa, N,N'- metilén-bis- acrilamida.

Dupont : Membrana de hibridación y transferencia Gene Screen Plus.

Fisher Scientific Company : Molibdato de amonio.

GIBCO - BRL : SFB, HEPES, nistatina, marcador de peso molecular (1Kb DNA ladder), Taq DNA Polimerasa, DTT, cloruro de magnesio, inhibidor de ribonucleasas de placenta humana, transcriptasa reversa M-MLV (Moloney murine leukemia virus), sistema de marcación partidores múltiples (random primers DNA labeling system \otimes), Eco-RI, bolsas de revelado, sistema de purificación de DNA (Glass Max DNA isolation Spin Cartridge System \otimes), sistema de detección de ácidos nucleicos no radiactivo (BluGENE $^{\text{TM}}$).

Kodak : Placas X-OMAT K, XK-1.

Laboratorio Chile : Penicilina, estreptomycin.

Merck : Cloroformo, fenol, etanol , hidróxido de sodio, cloruro de sodio, glicerol, ácido clorhídrico, acetato de amonio, formamida , ficoll tipo 400, Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , SDS, citrato de sodio, sulfato de magnesio, EDTA, cloruro de magnesio.

Perkin Elmer Cetus : Aceite mineral.

Sigma Chemical Company : DNA de espermio de salmón denaturado, nitrato de plata , polietilenglicol, actinomicina D, MEM, desoxinucleótidos, dietilpirocarbonato, BSA fracción V, sulfato dextran, proteasa (proteínasa K), agarosa, bromuro de etidio, sec-butanol.

Sudelab : Formaldehido, ácido bórico, ácido acético.

3.1.3. Material Biológico :

3.1.3.1. Virus:

a) Virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) : Se utilizó tres cepas de IPNV, la cepa VR - 299 donada por el Dr. J. L. Fryer, del Departamento de

Microbiología de la Universidad del Estado de Oregon, Corvallis Oregon, E.E.U.U., la cepa SP, y la cepa Jasper donadas por el Dr. Siba Samal, Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad de Maryland, College Park, MD, E.E.U.U.. La selección de las cepas se realizó considerando que : Sp y VR-299 corresponden a las cepas de mayor incidencia en Europa y Estados Unidos respectivamente (McAllister, 1988), además la cepa VR-299 ha sido aislado desde pisciculturas nacionales (McAllister y Reyes, 1984, Espinosa et al., 1985).

b) Rotavirus: Se utilizó la cepa SA11 de rotavirus, donada por el Dr. Eugenio Spencer, Unidad de Virología del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, INTA, Universidad de Chile.

c) Virus de la necrosis hematopoiética infecciosa (IHNV) : Se utilizó la cepa RB-76 de IHNV, donada por el Dr. J. L. Fryer, del Departamento de Microbiología de la Universidad del Estado de Oregon, Corvallis Oregon, E.E.U.U..

3.1.3.2. Bacterias :

a) *Renibacterium salmoninarum* : Donada por el Prof. Guillermo Figueroa, Unidad de Microbiología del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), Universidad de Chile.

b) *Piscirickettsia salmonis* : Donada por el Dr. Pedro Smith, Unidad de Medicina Preventiva de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

c) *Yersinia ruckeri* : Donada por el Prof. Guillermo Figueroa, Unidad de Microbiología del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), Universidad de Chile.

3.1.3.3. Células : Se utilizó la línea celular, de embrión de salmón Chinook (CHSE - 214), donada por el Dr. J. L. Fryer, del Departamento de Microbiología de la Universidad del Estado de Oregon, Corvallis Oregon, E.E.U.U., y por el Dr. Juan Kuznar del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile.

3.1.3.4. Peces : Los peces empleados en este estudio corresponden a las especies salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) y trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). Las muestras de peces infectadas con IPNV se recolectaron entre los años 1991-1993 desde pisciculturas nacionales y norteamericanas, estas últimas

muestras fueron donadas por el Dr. Siba Samal, de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad de Maryland, College Park, MD, E.E.U.U.. Los peces sanos, utilizados como controles negativos de infección, se obtuvieron desde la piscicultura experimental de la Universidad de Chile, ubicada en Castro, Chiloé.

3.1.3.5. Ovas : Las ovas empleadas en este estudio corresponden a la especie salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) y fueron donadas por la piscicultura experimental de la Universidad de Chile, ubicada en Castro, Chiloé.

3.1.4. Oligonucleótido :

3.1.4.1. Partidores : Se seleccionaron siete oligonucleótidos específicos a partir de la secuencia publicada del segmento A (figura 2), correspondiente a la cepa Jasper de IPNV (Duncan y Dobos 1986), cuya secuencia, longitud y posición en el segmento A se indican en la tabla I. Los oligonucleótidos designados como P1 y P2, fueron sintetizados por el Dr. Siba Samal, de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad de Maryland, College Park, MD, E.E.U.U. y los oligonucleótidos designados como I, II, III, IV y V fueron sintetizados por el Dr. David Valenzuela, de Regeneron Pharmaceuticals Inc., Tarrytown, NY, E.E.U.U., donados posteriormente a la Unidad de Virología del INTA.

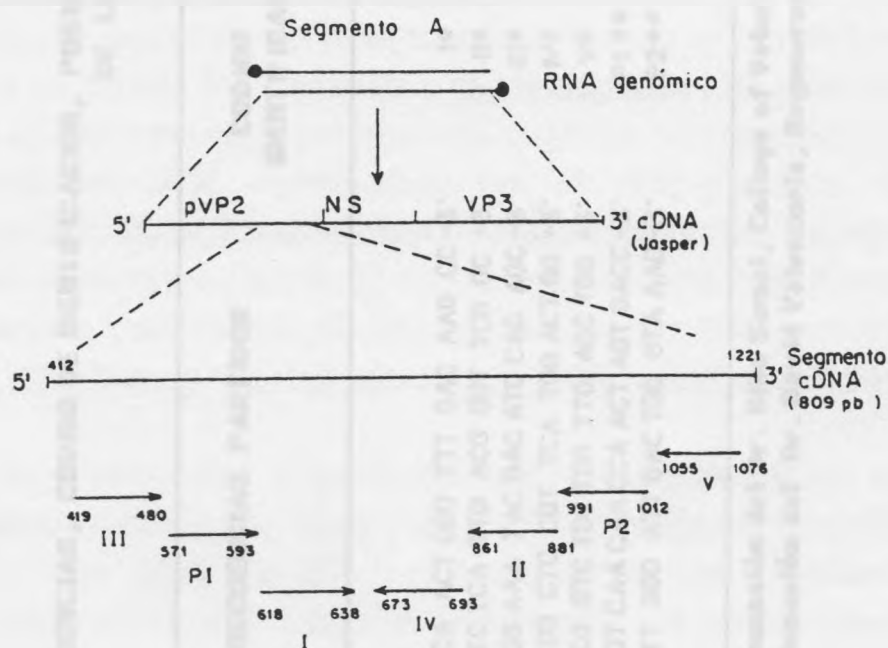


Figura 2 : Ubicación de las secuencias partidoras en el segmento A del genoma de IPNV.

TABLA I

SECUENCIAS, CODIGO DE IDENTIFICACION, POSICION EN EL MAPA DE VP2, LONGITUD Y ORIENTACION DE LOS PARTIDORES

SECUENCIAS PARTIDOR	CODIGO DE IDENTIFICACION	POSICION EN LA SECUENCIA PUBLICADA DE VP2.	LONGITUD (mer)	ORIENTACION DEL PARTIDOR
5'- CCA ACT GGG TTT GAC AAG CC -3'	I*	618 - 638	20	PARALELO
5'- GTC TCA TTG ACG GGT TCG GC -3'	II*	861 - 881	20	ANTIPARALELO
5'- CGG AAA TAC GAC ATC CAG AGC -3'	III*	419 - 430	21	PARALELO
5'- TGG CTC CGT TCA TGG ACT GG -3'	IV*	673 - 693	20	ANTIPARALELO
5'- GCG GTC TGC TGG TTG AGC TGG -3'	V*	1055 - 1076	21	ANTIPARALELO
5'- GGT CAA CAA CCA ACT AGT GACC -3'	P1**	571 - 593	22	PARALELO
5'- GTT GGG ATT GAC TGC GTA AAC -3'	P2**	991 - 1012	21	ANTIPARALELO

**** Donación del Dr. Siba Samal, College of Veterinary Medicine, University of Maryland, College Park, MD, E.E.U.U..**

*** Donación del Dr. David Valenzuela, Regeneron Ph. INC., Tarrytown, NY, E.E.U.U..**

3.1.5. Sonda :

3.1.5.1. cDNA del segmento A : Se utilizó como sonda de reconocimiento un segmento sintético (cDNA) de 809 pares de bases, complementaria a la región comprendida entre los nucleótidos 412 y 1221 de la región que codifica para la proteína VP2 (cepa Jasper). El segmento clonado en el plasmidio pVLN fue donado a la Unidad de Virología del INTA por el Dr. Siba Samal, de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad de Maryland, College Park, MD, E.E.U.U..

3.2. METODOS.

3.2.1. Obtención y caracterización de las partículas virales :

3.2.1.1. Propagación y purificación viral :

La propagación de las cepas de IPNV, VR-299 y Sp, se llevó a cabo en células CHSE-214, cultivadas en botellas de 175 cm², hasta un 90% de confluencia en medio mínimo esencial Eagle (MEM) a pH 7,3 suplementado con 10% suero fetal bovino, 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y 10 mM HEPES. Para la inoculación con el virus, a la monocapa celular se le retiró el medio de mantención y se infectó con virus IPN a una multiplicidad de infección igual a 1. La adsorción del virus se realizó por una hora a 15°C en 5 ml de medio de infección, el cual consiste en MEM suplementado con 2% SFB, penicilina 100 UI/ml, estreptomycin 100 UI/ml, HEPES 10 mM. Posteriormente se agregó medio de infección hasta un volumen final de 25 ml. El cultivo infectado se mantuvo a 15°C, hasta el tercer día postinfección, cuando se observó un 100% de efecto citopático. (Dobos et al. 1979, Dixon y Hill, 1983, Hsu et al., 1989, Hattori et al., 1994).

El virus se purificó a partir del sobrenadante de células infectadas a través del método descrito por Chang y col. (1978) con algunas modificaciones. El cultivo celular con 100% de ECP fue sometido a tres congelamientos y descongelamientos sucesivos. Luego, la suspensión de células infectadas fue centrifugada a 5000 xg por 20 min.. Al sobrenadante obtenido se le agregó polietilenglicol a una concentración final de 5% (p/v) y NaCl a una concentración final de 2,2% (p/v). La mezcla se agitó constantemente durante 12 h a 4°C, siendo

posteriormente centrifugada a 10.000 x g por 1 h. El sedimento se resuspendió en tampón 1x TNE (10mM Tris-HCl pH8, 10mM NaCl, 1mM EDTA) y se centrifugó en una gradiente discontinua de sacarosa (Chang et al., 1978, Ganga et al., 1993) a 75.110 x g durante 2 h. El sedimento final se resuspendió en 600 µl de tampón 1x TNE, se alicuotó y se almacenó a -20°C. Finalmente, la verificación de la presencia viral se realizó a través de electroforesis del RNA genómico viral en geles de poliacrilamida al 6%, (MacDonald y Gower, 1981, Dobos y Roberts, 1982, Hetrick et al., 1983, Kusuda et al., 1993, Ganga et al. 1993), teñidos posteriormente con nitrato de plata usando el método descrito por Herring et al.. (1982).

3.2.1.2. Caracterización de las partículas virales por microscopía electrónica.

Sobre grillas de 200 mesh, cubiertas con formvar y carbón, se depositó 5 µl de la fracción viral parcialmente purificada. La grilla se secó y se tiñó con molibdato de amonio al 3%, pH 7,0 por 1 min. Posteriormente, las muestras se observaron en un microscopio electrónico Phillips EM 300 con un aumento de 84.100 x.

3.2.2. Extracción del RNA genómico de IPNV.

El RNA genómico viral se extrajo a partir del virus parcialmente purificado desde células CHSE-214 previamente inoculadas con IPNV (método 3.2.1.1). Al virus parcialmente purificado, resuspendido en tampón TNE 1x, se le agregó un volumen de solución de digestión que consiste en 200 µg/ml de proteinasa K, 0.2M Tris-HCl pH8, 1% SDS y 10mM EDTA, y luego la mezcla se incubó a 50°C por 1 h.. El RNA se extrajo con un volumen de una solución cloroformo/fenol (1:1) y posteriormente se precipitó a -20°C por 30 min con 2,5 volúmenes de etanol y acetato de sodio pH 5.2 a una concentración final de 0,25 M (Maniatis et al, 1982). Los ácidos nucleicos se colectaron por centrifugación a 15.000 x g durante 30 min a 4°C. Finalmente, el precipitado se secó y se resuspendió en 50-200 µl de tampón TE (10mM Tris -HCl, pH 8; 1 mM EDTA , pH 8).

3.2.3. Determinación de la concentración del (ds)RNA viral extraído.

Diferentes volúmenes (50 - 200 μ l) del ácido nucleico resuspendido en tampón TE pH 8,0 obtenido a partir de virus parcialmente purificado, se llevaron a un volumen final de 1 ml con tampón TE y se procedió a determinar su absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160. Se calculó la concentración del dsRNA, basándose en la relación que establece que 1 OD a una longitud de onda de 260 nm equivale a 60 μ g de (ds)RNA (Berry y Samuel 1982). También se determinó la absorbancia del ácido nucleico extraído a las siguientes longitudes de onda : 325 nm, 280 nm y 230 nm. Las longitudes de 325 y 230 se utilizaron como indicadores de la limpieza de las cubetas y reflejo de la contaminación producida debido a residuos orgánicos, respectivamente. La relación de absorbancias 260/280 se utilizó como índice de pureza respecto a proteínas presentes (Ausubel et al., 1991).

3.2.4. Análisis de las muestras de peces mediante cultivo celular.

Con el fin de seleccionar las muestras de tejidos infectados en forma natural con IPNV, una serie de peces de cultivo que presentaban signos clínicos asociables a la enfermedad producida por este virus, fueron procesados según está descrito en "Procedimientos para la detección e identificación de ciertos patógenos de peces de la sociedad americana de piscicultores" (Amos, 1985). Los homogeneizados de los tejidos, previamente tratados con antibióticos, fueron inoculados en monocapas de células CHSE-214 cultivadas en placas de 6 pocillos de 2cm² de superficie (método 3.2.1.1).

La evolución de la infección se siguió por 14 días. En el momento de observar efecto citopático, se confirmó la presencia del virus mediante electroforesis del RNA genómico viral (método 3.2.1.1). Si dentro de los 14 días no se observaba efecto citopático, se realizaba otro pasaje inoculando una nueva monocapa de células CHSE-214, con el sobrenadante celular, siguiendo el mismo procedimiento antes descrito.

3.2.5. Infección experimental de ovas de salmón Coho.

Ovas de salmón Coho al estado de ojo se infectaron con IPNV en forma experimental según el protocolo descrito por Brown et al. (1990). Cada ova se microinyectó con aproximadamente 2ng de virus IPN parcialmente purificado (metodo 3.2.1.1.) y posteriormente se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

3.2.6. Tratamiento del tejido para ser utilizado directamente en la reacción de amplificación.

Las muestras de tejido de trucha arcoiris y salmón Coho se sometieron a tres sucesivos congelamientos y descongelamientos. El tejido, luego se homogenizó en un volumen mínimo de 0,2 M Tris-HCl (pH8.5) y 0,1 M EDTA, y se centrifugó a 8000 x g por 5 min.. El sobrenadante obtenido se trató con 0,2 volúmenes de una solución de digestión modificada que contiene 0,75 M KCl, 30mM MgCl₂, 100 mM DTT, 1 mg/ml de proteinasa K y 4,5 % (v/v) Tween 20. La mezcla se incubó primero a 55°C por 1 h y luego, con el objeto de denaturar la proteasa, se incubó a 95°C por 15 min. La mezcla de reacción final fue concentrada al volumen deseado por lavados sucesivos con sec-butanol y finalmente, la mezcla se incubó a 40°C por 10 min con el objeto de eliminar el exceso de sec-butanol.

3.2.7. Método general de transcripción reversa y amplificación génica por la reacción de la polimerasa en cadena (RT-PCR).

Como templado de la reacción RT-PCR se utilizó RNA genómico de IPNV extraído a partir de cultivo celular y resuspendido en tampón TE pH 8,0 (método 3.2.3). Para el caso de las muestras de tejido, se utilizó en forma directa el tejido tratado según el método descrito en 3.2.4. Un volumen de 2 µl de templado se mezcló directamente con ambos partidores (paralelo y antiparalelo), 0,5 µM de cada uno y la mezcla se cubrió con 2-3 gotas de aceite mineral. La denaturación del (ds)RNA se realizó llevando la mezcla a 104 °C por 5 min (Stephens y Hetrick, 1983) y luego se enfrió en forma rápida a 0 °C en hielo (Cohen et al., 1973). A la mezcla fría se le agregó la solución de transcripción inversa que contiene 10mM Tris-HCl pH8, 3,75 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 1mM de cada desoxinucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 2,5 U/µl de transcriptasa inversa MMLV (virus de la leucemia murínica de Moloney) y 1 U/µl de inhibidor de RNAsas de placenta humana. La

síntesis de cDNA se llevó a cabo a 45°C por 15 min., seguidos por una incubación a 99°C por 5 min, con el objeto de inactivar la enzima y liberar el cDNA. La mezcla se enfrió a 37°C, temperatura a la cual se le agregó la solución tampón de PCR que contiene 10mM Tris-HCl pH8, 2mM MgCl₂ y 50mM KCl en un volumen final de 100 µl. Luego, la mezcla se incubó a una temperatura de 94°C por 5 min, y finalmente se le agregó 2,5 U de Taq DNA polimerasa. El protocolo general de la reacción de amplificación consistió en 30 ciclos, de tres etapas cada uno, las que corresponden a la etapa de denaturación del templado, 1 min a 92°C, la etapa de apareamiento de los partidores a las hebras de DNA denaturadas, 2 min a 55°C y la etapa de extensión de la hebra en formación, 3 min a 72°C. Una vez concluida la reacción de amplificación, con el fin de invertir la fase acuosa respecto a la fase orgánica (aceite mineral), se agregó a cada tubo de reacción 1 volumen de cloroformo y se centrifugó a 1000 x g por 2min..

3.2.8. Análisis de los productos de amplificación.

3.2.8.1. Identificación de los productos de amplificación por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%.

Una alícuota de 10 µl de la fase superior acuosa obtenida al finalizar la reacción de amplificación RT-PCR, se mezcló directamente con el tampón de muestra (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xilencianol, 2,5% ficoll tipo 400, en agua destilada y se sometió a una electroforesis en geles de poliacrilamida (Sarkar et al., 1992). La electroforesis se llevó a cabo utilizando el sistema de Laemmli (Laemmli 1970), en un gel poliacrilamida al 12 % de 20 cm x 16 cm a 150 V durante 5 h a temperatura ambiente o bien en un mini-gel de poliacrilamida al 12 % de 5 cm x 5 cm a 100 V por 1 h., omitiendo el uso SDS en todas las soluciones. Una vez concluida la electroforesis, el gel se tiñó con nitrato de plata, siguiendo el protocolo descrito por Herring et al.. (1982).

3.2.8.2. Identificación de los productos de amplificación por hibridación.

Los productos de amplificación obtenidos a partir de la reacción RT-PCR para IPNV, fueron sometidos a una electroforesis en un gel de poliacrilamida 12 %

no denaturante, y luego se transfirieron a una membrana de nylon (GeneScreen Plus, Dupont) en una cámara de transferencia Bio-Rad, durante 12 h a 100mA, siguiendo los protocolos descritos por Maniatis et al (1982) y Ausubel et al. (1991). Al finalizar la transferencia, la membrana de nylon se sumergió en una solución 0,4 M NaOH durante 10 min., para así asegurar la completa denaturación del DNA inmovilizado. Para neutralizar el nylon, éste se lavó en una solución 2X SSPE (20 mM NaH₂PO₄ (pH7,4), 20 mM EDTA (pH7,4), 0,36 M NaCl) durante 10 min. Sin secar, la membrana se prehibridó y luego hibridó siguiendo los protocolos descritos por Ausubel et al. (1991). Como sonda de hibridación se utilizó el cDNA clonado en el plasmidio pVLN el que se recuperó por digestión enzimática con la enzima Eco RI (Maniatis et al, 1982). La mezcla de digestión se sometió a electroforesis en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1%, a 4°C durante 2 h y a 75V (80 mA), en tampón TAE 1x (40 mM Tris-acetato pH8, 2 mM EDTA). El segmento que correspondía al inserto fue cortado y se recuperó según el método descrito por Maniatis et al (1982).

Una fracción del inserto se marcó no radiactivamente con biotina a través de la reacción de marcación con la enzima TdT, la cual se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl que contenía 3µg del segmento de cDNA de 809 pares de bases utilizado como sonda, 1 X de tampón de marcación TdT (100 mM cacodilato de potasio pH 7,2, 2 mM de cloruro de cobalto II, 0,2 mM ditiotreitól), 100 µM dATP-7 biotina y 15 U de TdT. La mezcla de reacción se incubó por 4 h a 37°C. La reacción se detuvo con la adición de EDTA hasta una concentración final de 100 mM (Maniatis et al, 1982, Ausubel et al, 1991). La sonda marcada fue purificada utilizando el sistema de purificación de DNA GlassMax®. La sonda fue posteriormente almacenada a -20°C hasta su utilización. La otra fracción del inserto, se marcó radiactivamente a través del método de partidores múltiples, en un volumen final de 50 µl, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante del sistema de marcación. Finalmente la sonda marcada fue purificada utilizando el sistema de purificación de DNA Glass Max®.

Cuando se utilizó la sonda radiactiva para el ensayo de hibridación, el revelado se realizó mediante la técnica de autorradiografía y para el caso de la sonda biotinilada, la detección del híbrido biotinilado se realizó utilizando el sistema de revelado Bluegene®.

3.2.8.3. Reconocimiento de los productos de RT-PCR por amplificación anidada.

Los productos obtenidos en la reacción RT-PCR se utilizaron en forma directa como templados de otra reacción de PCR. Alícuotas de 2 μ l de los distintos productos de amplificación de la reacción RT-PCR se combinaron con diferentes partidores internos (0,5 μ M de cada uno), cuyas secuencias están contenidas en el producto utilizado como templado, y se le agregó luego la mezcla de PCR (1mM de dATP, 1mM de dTTP, 1mM de dCTP, 1mM de dGTP, 10mM Tris-HCl pH8, 50mM KCl, 5 mM MgCl₂). Esta solución se incubó 94°C por 5 min, al final de los cuales se agregó 2,5 U de Taq DNA polimerasa. La reacción de amplificación se llevó a cabo utilizando el protocolo descrito en el punto 3.2.7. Los productos de amplificación de la reacción de PCR anidado se visualizaron en geles de poliacrilamida al 12 % (método 3.2.8.1).

4. RESULTADOS :

4.1. Obtención y caracterización de las partículas virales.

Con el fin de establecer las condiciones de la reacción de transcripción inversa y posterior reacción de la polimerasa en cadena para obtener productos de amplificación específicos, se utilizó como templado inicial de la reacción RT-PCR el RNA genómico extraído a partir de la cepa Sp de IPNV propagada en células CHSE-214. La progenie viral obtenida de la infección celular se caracterizó tanto por la visualización del efecto citopático sobre las monocapas de células CHSE-214, como por microscopía electrónica, y por electroforesis de su genomio en geles de poliacrilamida.

El efecto citopático (ECP) característico producido por IPNV en células CHSE-214 comienza con un alargamiento celular generalizado en la monocapa, luego la célula pierde su forma, para finalmente adquirir una forma redondeada (Samil y Munro, 1989). Al cabo de 48 h post infección se observa un desprendimiento parcial de la monocapa celular, el cual se completa aproximadamente a las 72 h post infección, 100% de ECP. En el panel B de la figura 3, se observa una monocapa de células CHSE-214 con el ECP característico de IPNV, el cual se puede comparar con el control de células sin infectar mostrados en el panel A. Una vez reconocido el ECP producido por el virus IPN, éste se purificó parcialmente a partir del sobrenadante de las células infectadas y las partículas virales obtenidas se caracterizaron por microscopía electrónica. En la figura 4, se observa una fotografía obtenida al microscopio electrónico de las partículas virales parcialmente purificadas. Estas no poseen envoltura y presentan una sola cápside de estructura icosaédrica, con un diámetro promedio de 60 nm, lo que es característico del virus IPN. Finalmente, basándose en el hecho que el genoma viral de IPNV presenta un patrón de migración característico en geles de poliacrilamida al 6%, el cual es diferente para las distintas cepas virales, se caracterizó en estos geles el RNA de doble hebra bisegmentado de IPNV. El resultado se puede observar en la figura 5 donde el patrón de migración del RNA genómico de las cepas Sp y VR-299 se puede visualizar en los carriles 1 y 3 respectivamente, mientras que una coelectroforesis de ambas puede observarse en el carril 2. En la coelectroforesis (carril 2), se puede observar claramente la diferencia en la movilidad electroforética del genoma de ambas cepas virales. El

primer segmento de la cepa Sp presenta una mayor movilidad electroforética en relación al primer segmento de la cepa VR-299, mientras que para el segundo segmento la relación comparativa es inversa.

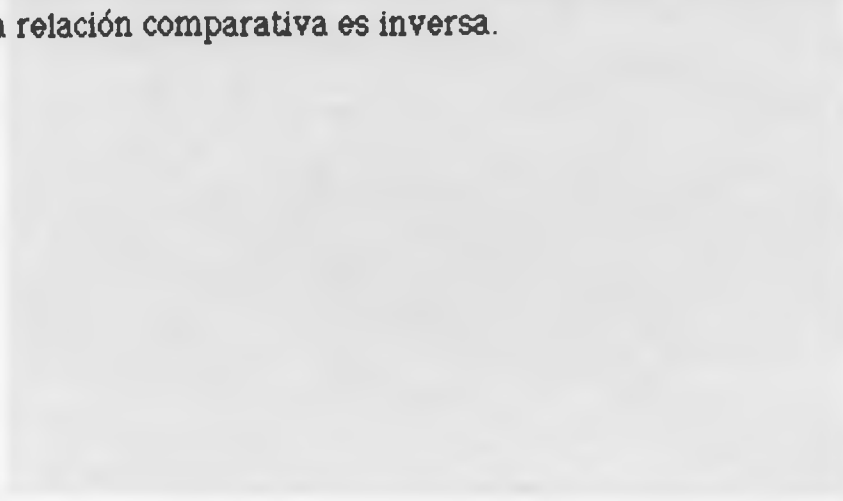


Figura 3. - Electrólisis. - Gel de agarose (1%) con buffer TBE 0.5 M y 89 mM de ácido bórico. - Corriente en pulso (100 V, 100 mA) en un sistema de flujo de agua de 4 a 6 litros por hora a 200 mA. - Las imágenes se tomaron inmediatamente después de haberse detenido el flujo de agua. - El gel (A) muestra el primer segmento de la cepa Sp y el primer segmento de la cepa VR-299. - El gel (B) muestra el segundo segmento de la cepa Sp y el segundo segmento de la cepa VR-299. - La movilidad electroforética de los segmentos de la cepa Sp es mayor que la de la cepa VR-299 en el primer segmento (A) y menor que la de la cepa VR-299 en el segundo segmento (B).

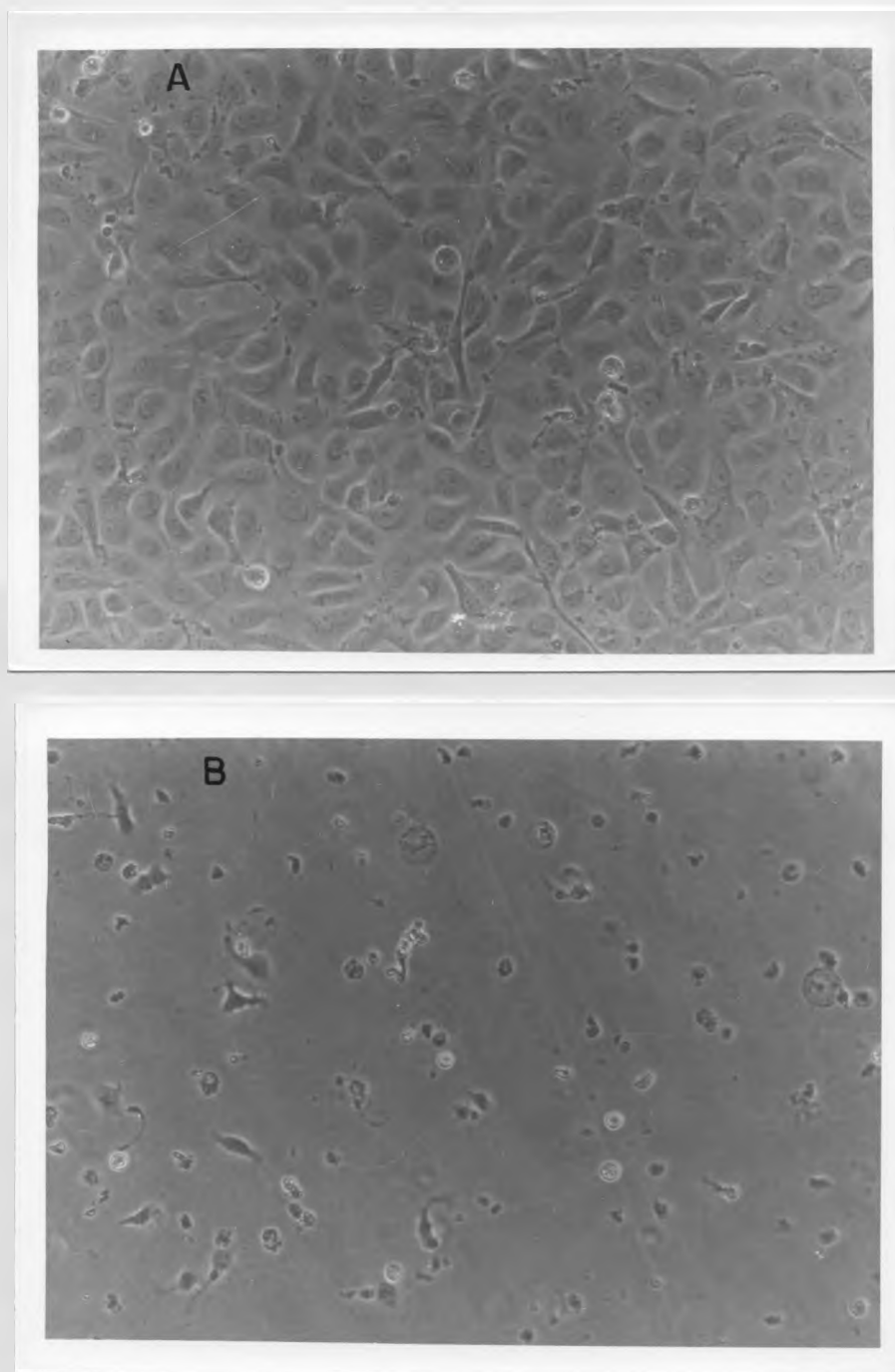


Figura 3 : Identificación del efecto citopático del virus IPNV en la línea celular CHSE-214. Monocapas de células CHSE-214 se infectaron con el virus IPN cepa Sp y se incubaron a 15°C durante 10 días. Las monocapas se observaron diariamente al microscopio óptico a fin de identificar el ECP viral. El **panel (A)** corresponde a una monocapa de células CHSE-214 sin infectar y el **panel (B)** a una monocapa de células CHSE-214 infectada con virus IPN, con aproximadamente un 90% ECP. Ambos paneles corresponden a una fotografía al microscopio óptico con un aumento de x 200.

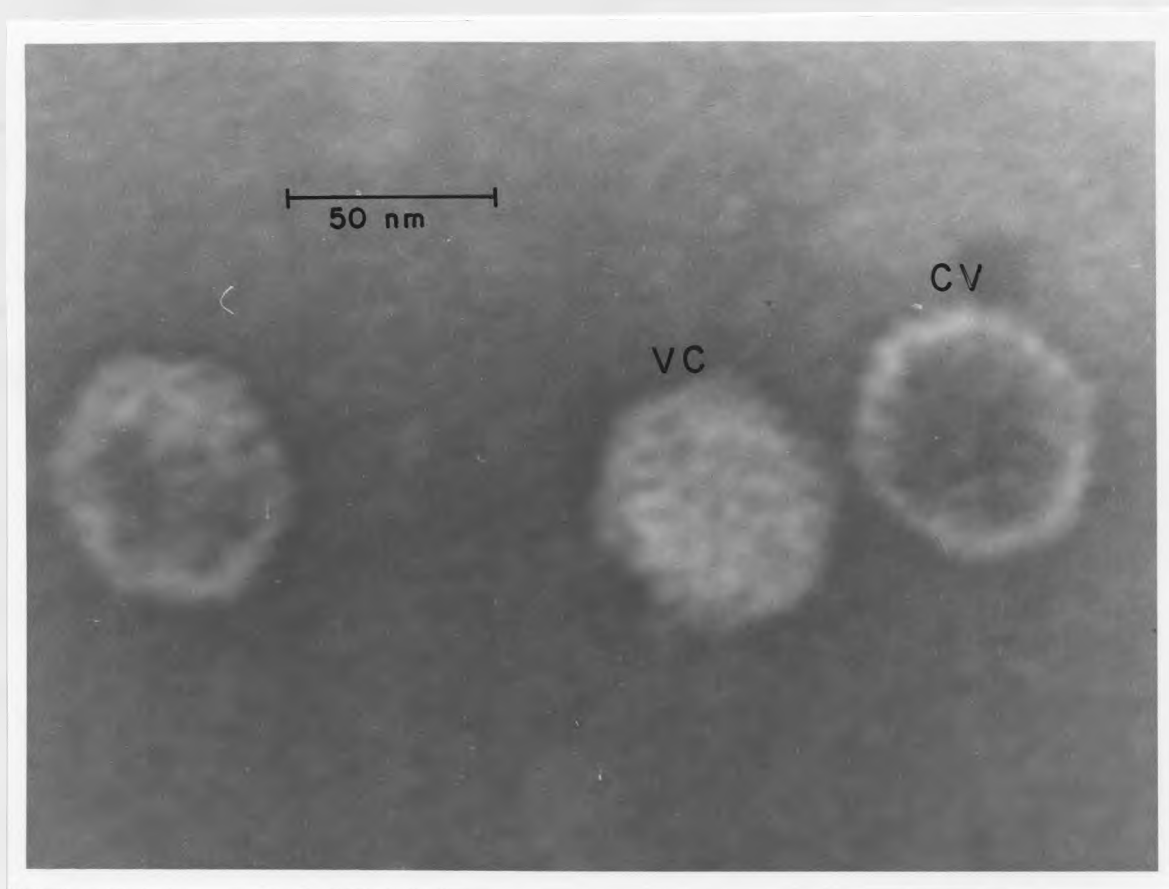


Figura 4 : Microfotografía de partículas virales de IPNV. Micrografía de una suspensión de partículas virales parcialmente purificadas teñidas con molibdato de amonio al 3% pH 7,0 (tinción negativa). Se observa cápsides vacías (CV) y virus completo (VC). La barra corresponde a 50 nm.

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que el virus de la gripe A (H3N2) se encuentra en Chile durante los meses de invierno (1977) con un patrón de migración del RNA genómico similar al observado en otros países de América del Sur.

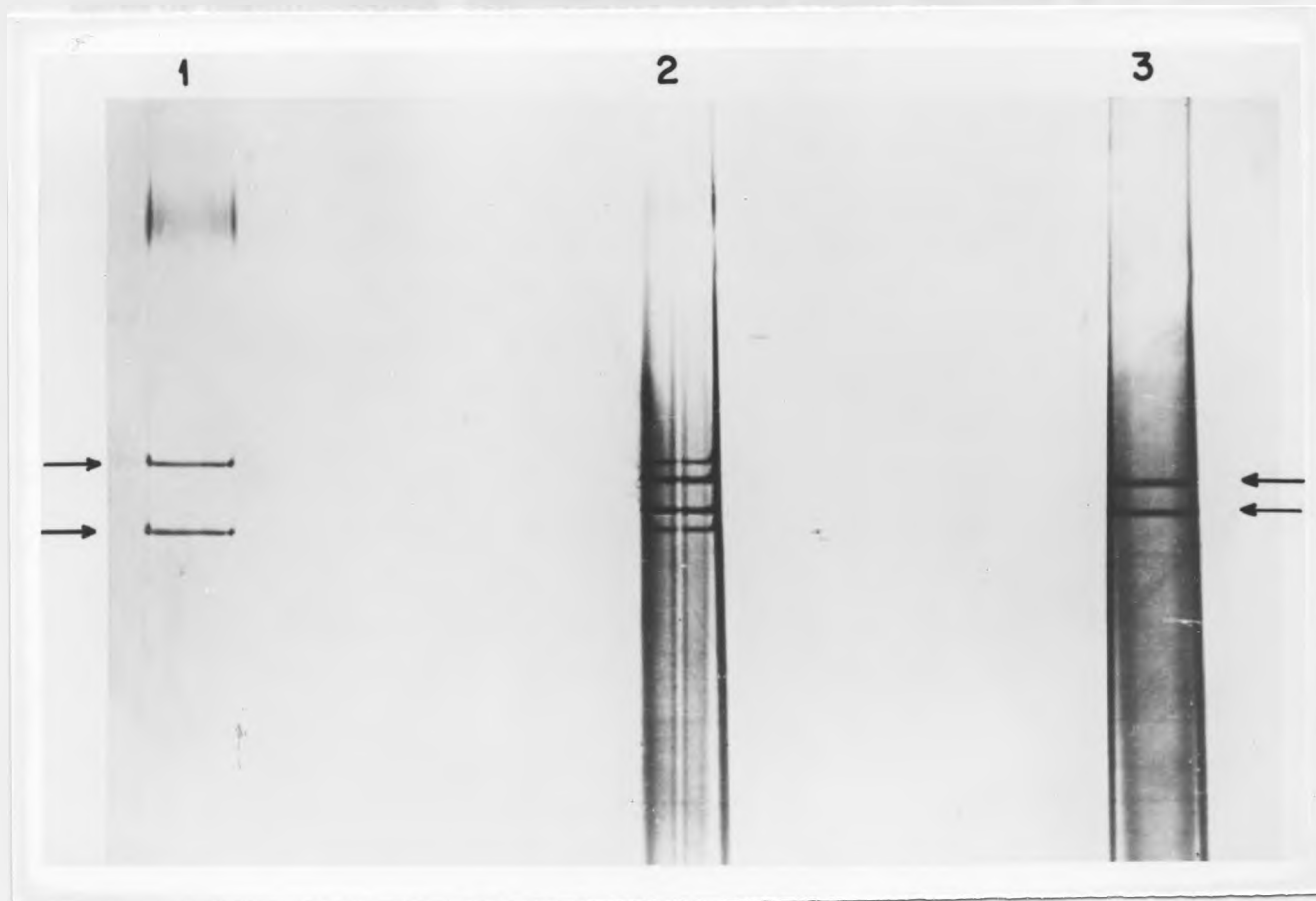


Figura 5 : Caracterización del genómico viral en geles de poliacrilamida. Patrón de migración del RNA genómico de dos cepas de IPNV observado en geles de poliacrilamida al 6%, teñidos con nitrato de plata. El carril 1 corresponde a aproximadamente 2ng de RNA genómico de IPNV cepa VR-299. El carril 3 corresponde a aproximadamente 2ng RNA genómico de IPNV cepa Sp. El carril 2 corresponde a una coelectroforesis de RNA genómico de ambas cepas (2 ng de dsRNA cada una). Las flechas indican ambos segmentos genómicos de IPNV.

4.2. Reacción de RT-PCR.

Una vez caracterizada la progenie viral obtenida de la infección de las células CHSE-214, se utilizó el RNA genómico de estas partículas de IPNV como templado inicial de la reacción RT-PCR. Se procedió a determinar si los distintos pares de oligonucleótidos, seleccionados desde la región codificante de la proteína viral VP2, al ser utilizados como partidores de la reacción de transcripción inversa y posteriormente como partidores de la reacción de PCR daban origen a los productos de amplificación esperados (Tabla II). Como templado de la reacción de amplificación se utilizó RNA extraído de virus parcialmente purificado a partir de células CHSE-214 infectadas con virus IPN de la cepa Sp. Como control negativo de la reacción de transcripción inversa y posterior amplificación, se utilizó los ácidos nucleicos totales extraídos a partir de células CHSE-214 sin infectar. Los productos de amplificación obtenidos en la reacción RT-PCR se sometieron a una electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%, los cuales posteriormente se tñieron con nitrato de plata. Como se puede observar en el gel de la figura 6, al utilizar los pares de oligonucleótidos (I-II), (III-IV), (P1-II), (P1-P2) y (III-V) como partidores de la reacción de RT-PCR (carriles 2 al 6 respectivamente), se obtiene una sola banda claramente identificable, que presenta el tamaño esperado para el producto de amplificación en cada uno de los casos.

TABLA II

COMBINACION DE PARTIDORES, LONGITUD DEL PRODUCTO ESPERADO,
POSICION DEL PRODUCTO EN LA REGION QUE CODIFICA PARA VP2.

COMBINACION DE PARTIDORES	LONGITUD (pb) DEL PRODUCTO ESPERADO	UBICACION DEL PRODUCTO EN LA REGION CODIFICANTE DE VP2
I - II	263	618 - 881
III - IV	274	419 - 693
P1 - II	310	571 - 881
P1 - P2	441	571 - 1012
III - V	657	419 - 1076

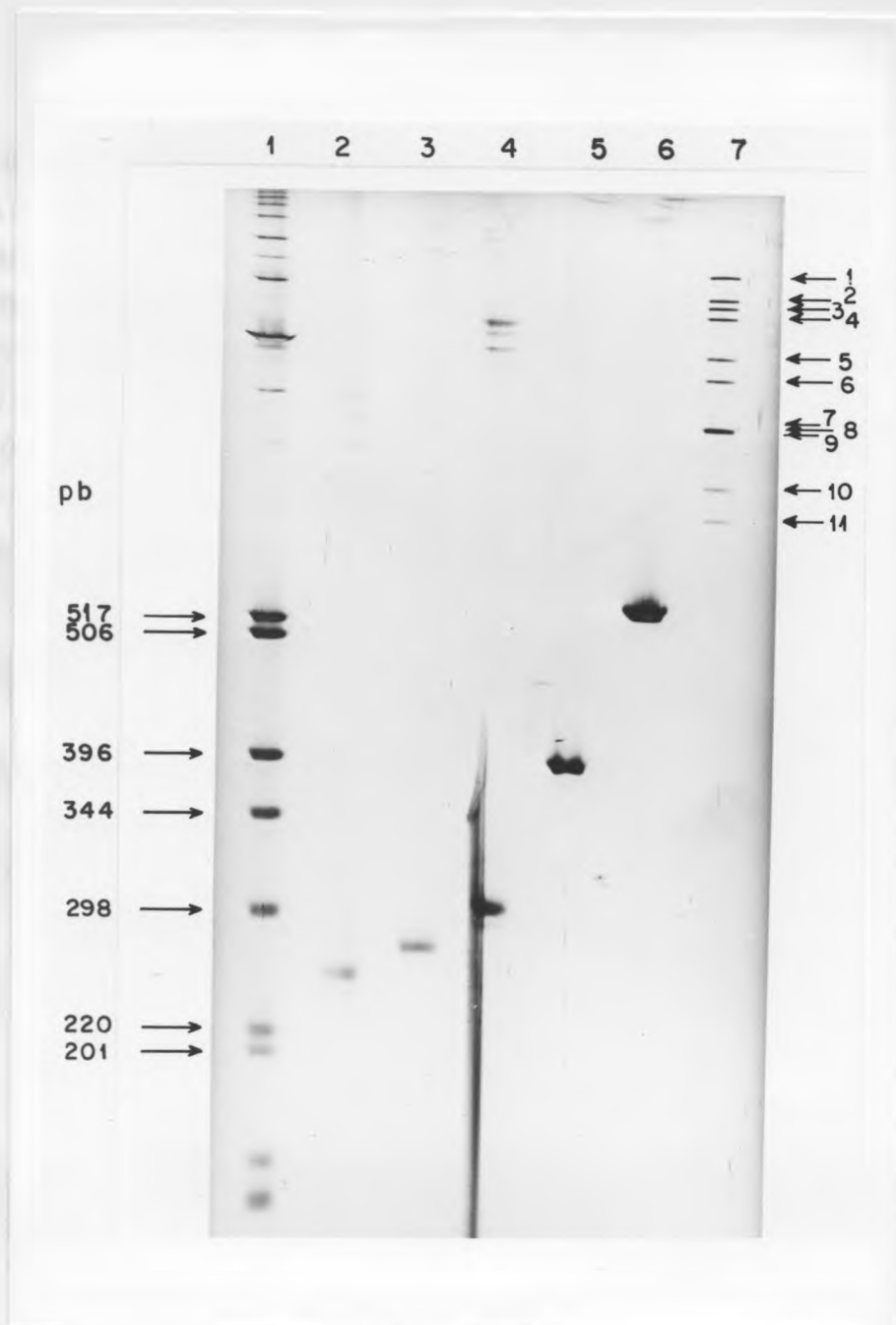


Figura 6 : Caracterización de los productos de amplificación RT-PCR en geles de poliacrilamida. Los productos de amplificación RT-PCR obtenidos al utilizar los distintos pares de partidores, fueron sometidos a una electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% y posteriormente visualizados por tinción con nitrato de plata. El carril 1 corresponde al marcador de tamaño molecular (1 Kb DNA ladder). Los carriles 2 al 6 corresponden al producto de amplificación originado al utilizar como partidores de la reacción los oligonucleótidos (I-II), (III-IV), (P1-II), (P1-P2) y (III-V) respectivamente. En cada carril se cargó un decimo del volumen final de reacción. El carril 7 corresponde al dsRNA genómico de la cepa SA 11 de rotavirus utilizado como segundo marcador de peso molecular.

Con el fin de mejorar la visualización del producto de amplificación se efectuó un ensayo de PCR utilizando cantidades variables de ciclos de amplificación que van desde 0 a 50 ciclos. La figura 7 muestra el resultado obtenido al amplificar 1,5 ng del RNA genómico de IPNV. Se seleccionó 30 ciclos como el número máximo de ciclos de amplificación para este ensayo. En los carriles 8 al 14 de la figura 7 se puede observar un aumento progresivo cualitativo del producto de amplificación por ello cabe esperar que el carril 10 represente el número de ciclos con la mayor formación de producto de amplificación esperado obtenido durante la fase exponencial de amplificación con la menor formación de producto inespecífico.

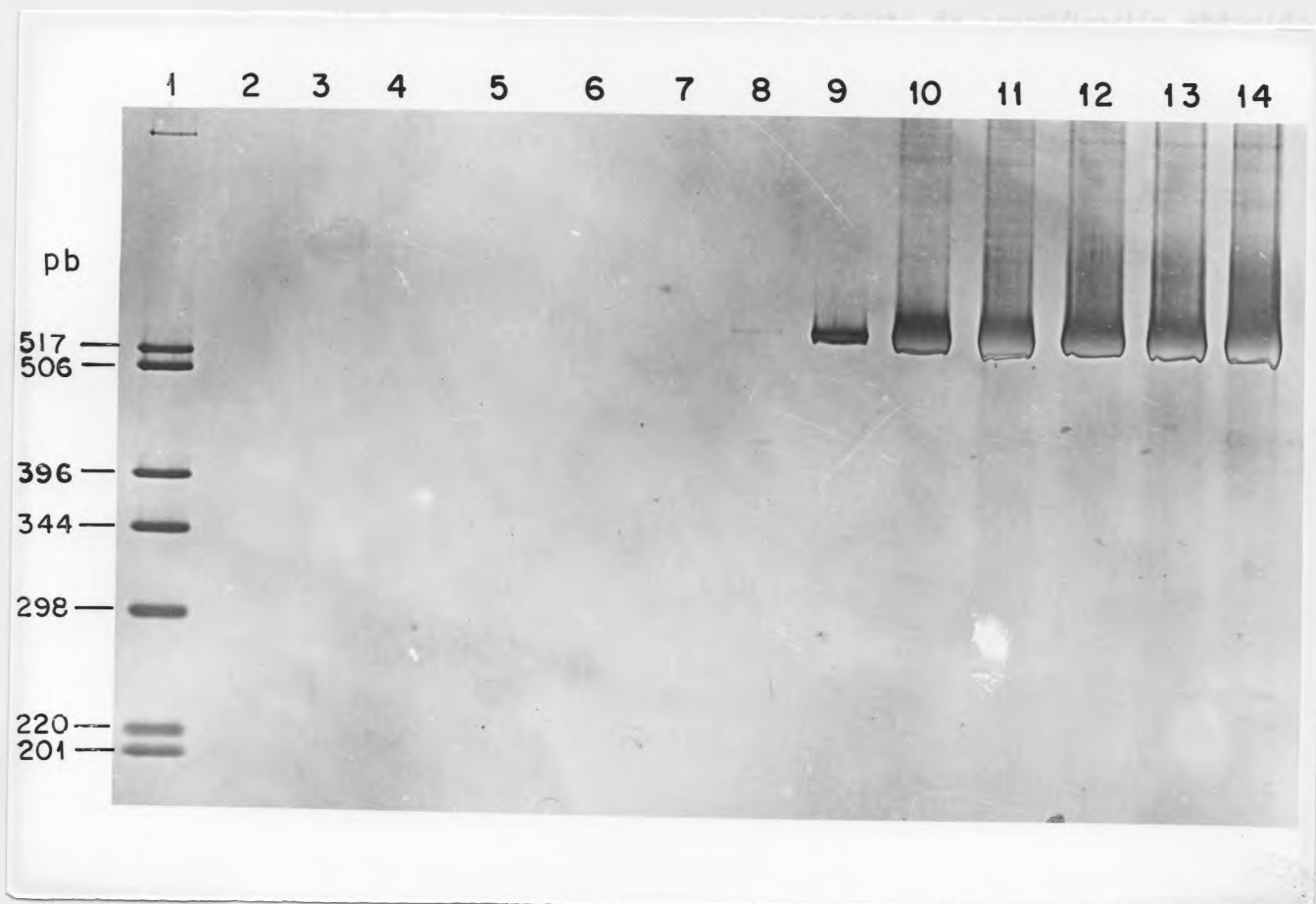


Figura 7 : Optimización del número de ciclos de amplificación para la reacción RT-PCR. Electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12 % de los productos de amplificación obtenidos al realizar el ensayo de PCR con diferente número de ciclos, utilizando como partidores los oligonucleótidos (III-V). El carril 1 corresponde al marcador de tamaño molecular. El carril 2 corresponde al control negativo de amplificación, 2 ng de ácido nucleico extraído de células CHSE-214 sin infectar. Los carriles 3 al 14 corresponden al producto de amplificación originado a partir de 1,5 ng de dsRNA viral al cabo de 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 ciclos de amplificación.

4.3. Identificación de los productos de amplificación de la reacción RT-PCR mediante hibridación y PCR anidado.

El resultado anterior sugiere que el producto de amplificación obtenido con cada par de partidores, podría corresponder, para cada caso, al producto de amplificación esperado. Sin embargo, a continuación se efectuaron experimentos de hibridación y PCR anidado para comprobar si el producto obtenido efectivamente correspondía a la amplificación de la zona delimitada por los partidores.

4.3.1. Identificación de los productos de amplificación mediante hibridación.

La hibridación se realizó utilizando una sonda de 809 pb que contiene la secuencia nucleotídica de la zona del genoma viral, de la cual se seleccionaron los partidores. Ya que la sonda, correspondiente al cDNA de la proteína VP2, estaba inserta en el plasmidio VLN, previo a su uso ésta debió ser aislada, purificada y luego marcada (figuras 8 y 9). Para ello el plasmidio se sometió a una digestión enzimática con Eco RI y posteriormente el inserto se recuperó purificándolo a partir de un gel de agarosa al 1% de bajo punto de fusión. En la figura 8 se muestra el resultado final de estos experimentos. A continuación, una fracción del cDNA aislado fue marcada en forma radiactiva con dCTP-[³²P] y posteriormente purificado. La figura 9, corresponde a una autorradiografía de un gel de agarosa al 1%, en el que se sometió a una electroforesis tanto el inserto marcado radiactivamente (carril 3) como el inserto no marcado (carril 2).

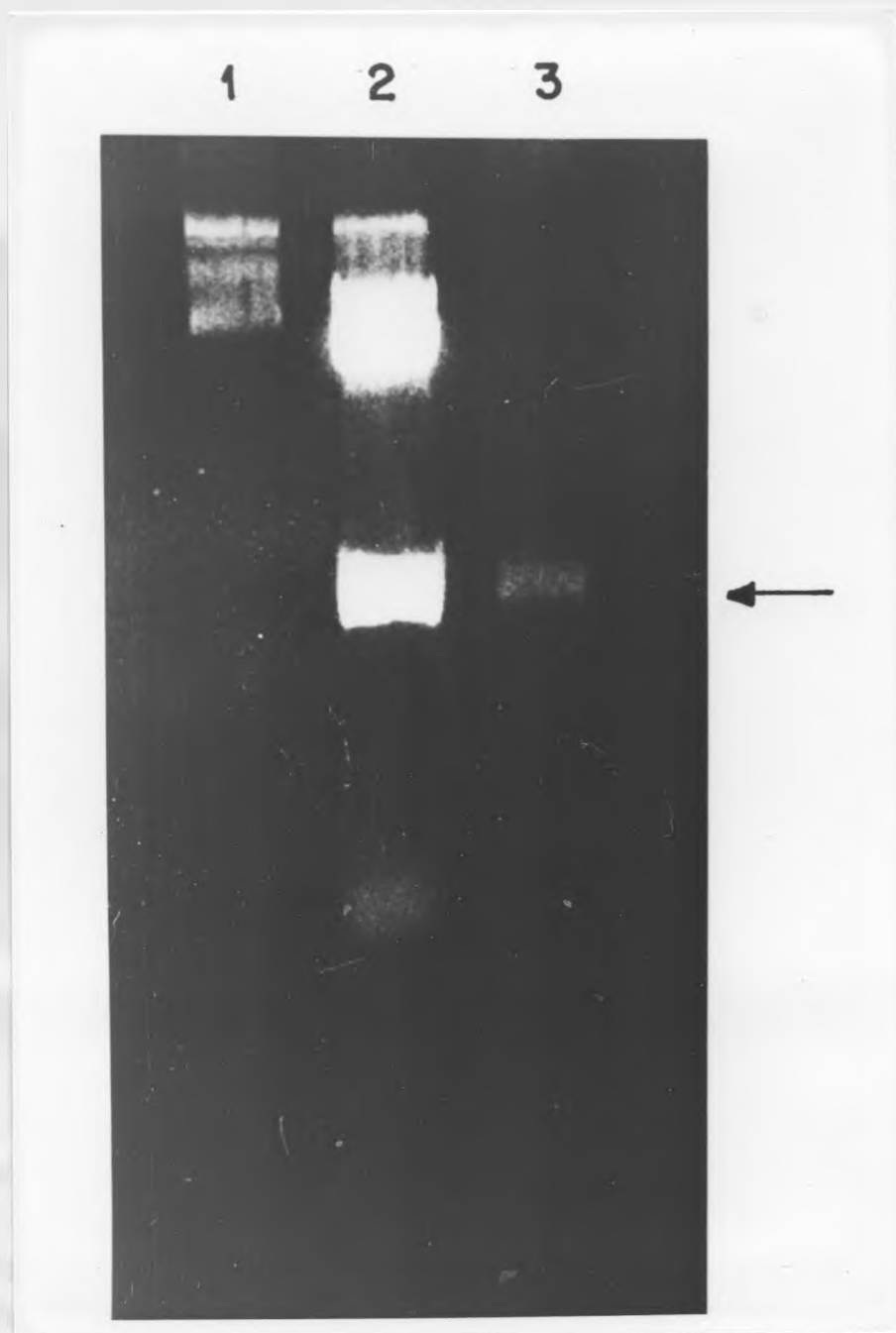


Figura 8 : Electroforesis en gel de agarosa del segmento de cDNA aislado a partir del plasmidio VLN. Se efectuó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% , cargándose como muestras en el carril 1: 300 ng de DNA del plasmidio VLN sin digerir, en el carril 2: 2 µg del DNA del plasmidio recombinante digerido con Eco RI, y en el carril 3: 100 ng del inserto aislado. La electroforesis se realizó a 100 V por 3 h. Posteriormente el gel se tiñó con bromuro de etidio (0.5 µg/ml). La flecha indica la posición de la sonda.

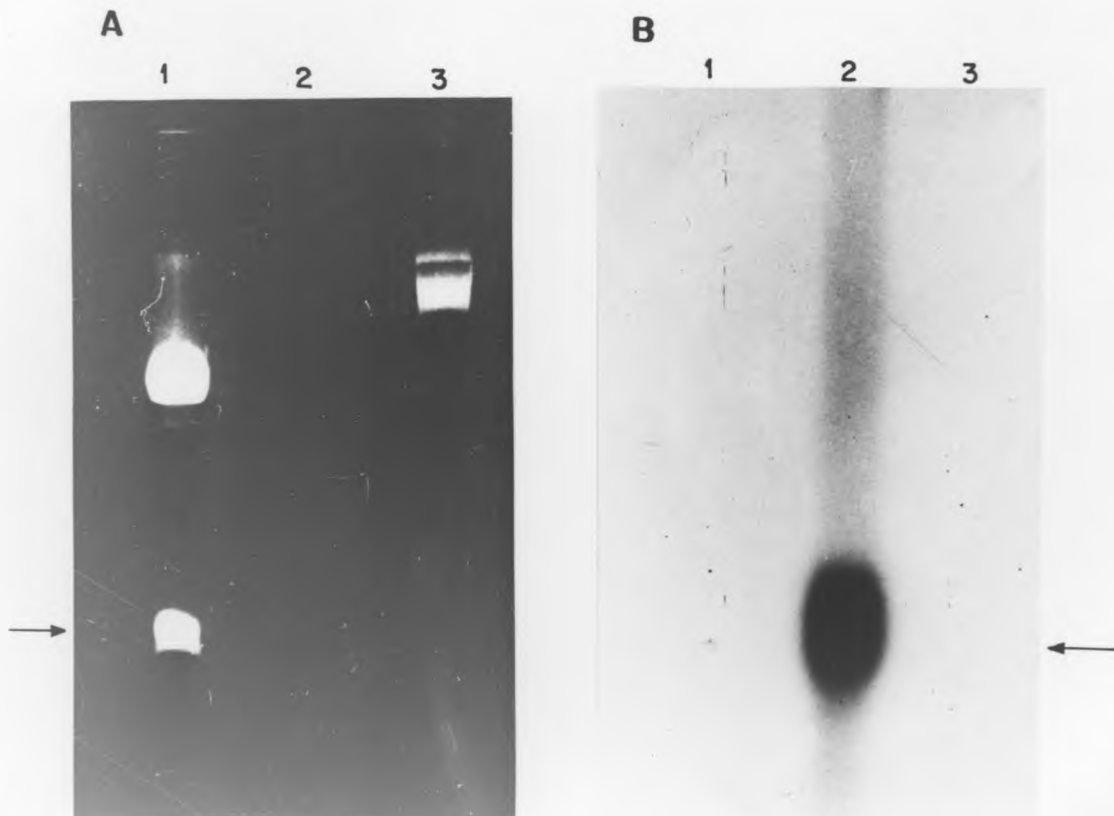


Figura 9 : Detección de la marca radiactiva de la sonda de cDNA por autorradiografía. La sonda de cDNA de 809 pb se marcó radiactivamente con ^{32}P por el método de partidores múltiples. Posteriormente, para verificar la marcación, la sonda se sometió a una electroforesis en geles de agarosa al 1% y luego a una autorradiografía. El **Panel A** muestra el gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, el carril 1 corresponde a 2 μg de DNA del plasmidio recombinante digerido con Eco RI en donde el inserto está sin marca; el carril 2 corresponde a aproximadamente 1 ng de la sonda aislada y marcada radiactivamente; el carril 3 corresponde a 1 μg de DNA del plasmidio sin digerir. El **Panel B** ; corresponde a una autorradiografía de tres horas de exposición, del gel de agarosa al 1% presentado en el panel A. Las flechas indican la posición de la sonda.

Finalmente se efectuó la hibridación de los productos amplificados utilizando la sonda radiactiva. Para esto, los productos de amplificación obtenidos al utilizar los distintos pares de partidores en la reacción RT-PCR se sometieron a una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12 % (figura 10, panel A), y posteriormente se transfirieron desde el gel a una membrana de nylon la que se incubó con la sonda marcada radiactivamente. Como se muestra en el panel B de la figura 10, que corresponde a una autorradiografía de la membrana hibridada, la sonda hibridó con cada uno de los productos obtenidos en el ensayo de amplificación. Este resultado permite establecer que los productos de amplificación contienen secuencias complementarias a la sonda de cDNA utilizada en la hibridación.

Figura 10. Hibridación de los productos de amplificación RT-PCR por sonda cDNA. Los productos de amplificación RT-PCR obtenidos al utilizar los distintos pares de partidores como iniciadores en una reacción de amplificación en 100 μ l de tampón de reacción de PCR con 100 μ M de dNTPs y 100 μ M de MgCl₂ se transfirieron a una membrana de nylon y se hibridaron con la sonda cDNA marcada radiactivamente. El panel A muestra la electroforesis de los productos de amplificación en un gel de poliacrilamida al 12 % y el panel B muestra la autorradiografía de la membrana hibridada. Los productos de amplificación obtenidos en el ensayo de amplificación hibridaron con la sonda cDNA marcada radiactivamente. Este resultado permite establecer que los productos de amplificación contienen secuencias complementarias a la sonda de cDNA utilizada en la hibridación.

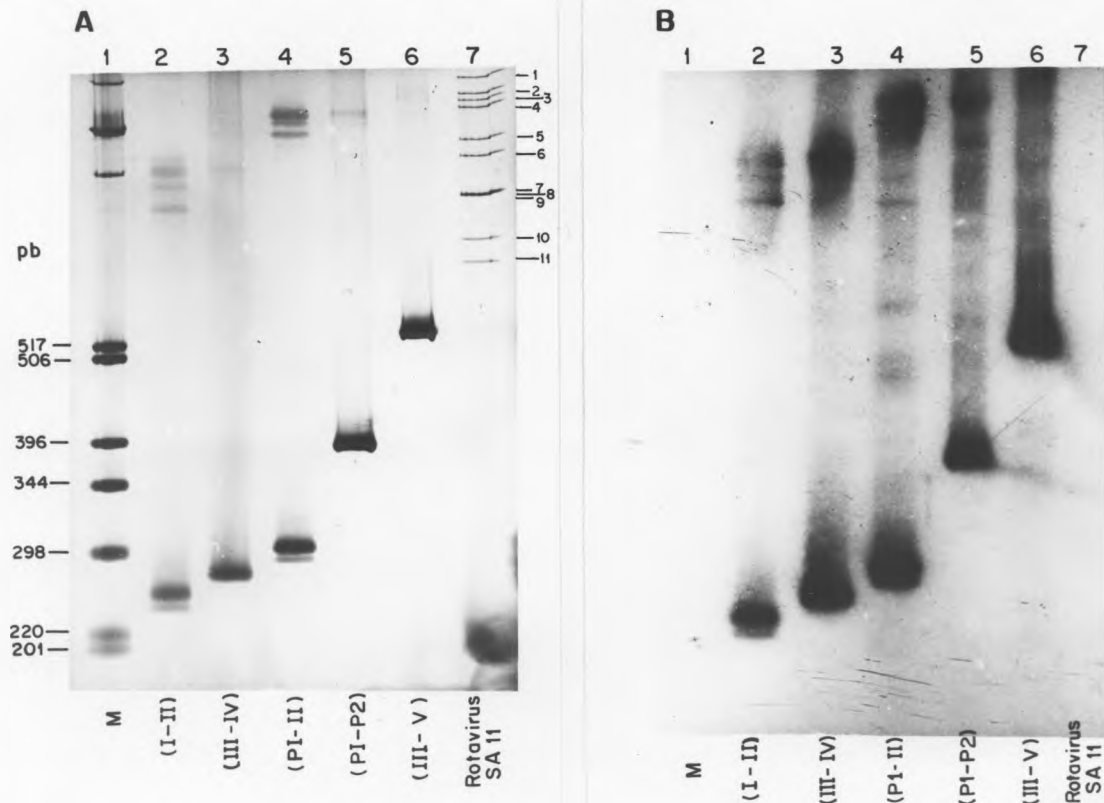


Figura 10 : Identificación de los productos de amplificación RT-PCR por hibridación. Los productos de amplificación RT-PCR obtenidos al utilizar los distintos pares de partidores fueron sometidos a una electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%, posteriormente se transfirieron desde el gel a una membrana de nylon y se hibridaron con la sonda marcada radiactivamente. El **Panel A** muestra el gel de poliacrilamida al 12% teñido con nitrato de plata: el carril 1 corresponde al marcador de tamaño molecular (1 Kb DNA ladder), los carriles 2 al 6 corresponden al producto de amplificación originado al utilizar los oligonucleótidos (I-II), (III-IV), (P1-II), (P1-P2) y (III-V) como partidores de la reacción de amplificación RT-PCR y el carril 7 corresponde al dsRNA genómico de la cepa SA 11 de rotavirus. El **Panel B** muestra la autorradiografía de la hibridación Southern del gel del panel A.

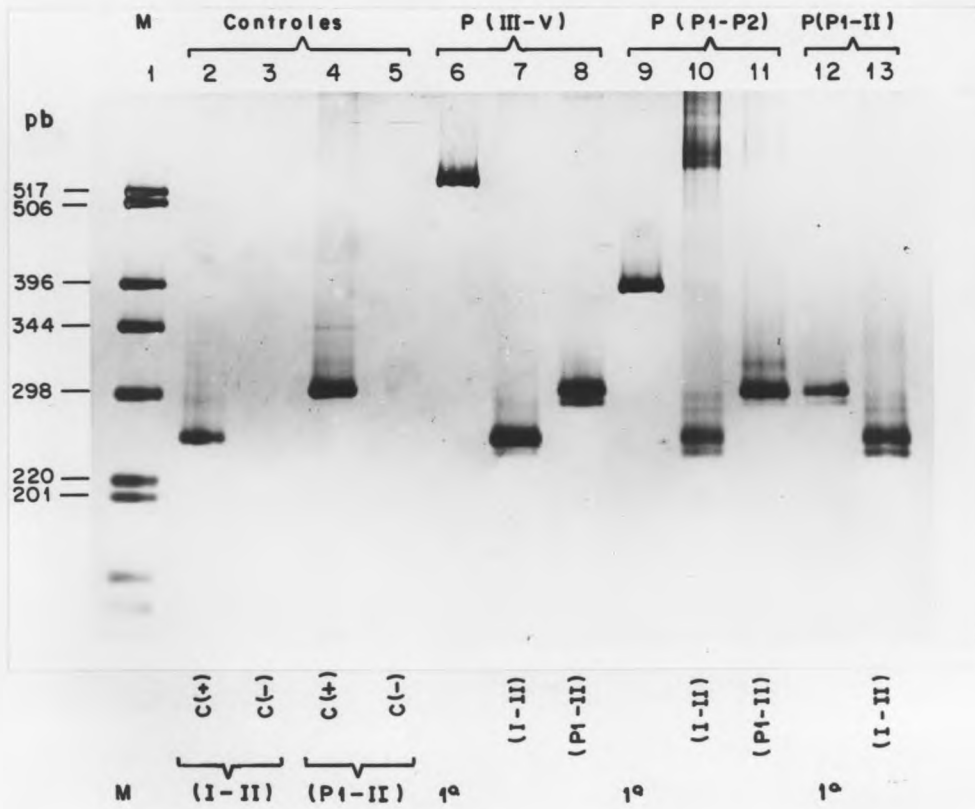
4.3.2. Identificación de los productos de amplificación por medio de la reacción de PCR anidado.

Como una segunda aproximación para comprobar que los productos de amplificación presentan un secuencia igual a la esperada se procedió a efectuar un ensayo de PCR anidado. Este experimento consistió en efectuar una primera ronda de amplificación usando como templado el RNA genómico de IPNV y como partidores los oligonucleótidos (III-V), (P1-P2) y (P1-II). En seguida, el producto de esta primera reacción se utilizó como templado en una segunda ronda de amplificaciones, usando ahora como partidores internos los oligonucleótidos (I-II) y (P1-II), que delimitan una región de amplificación que debiera estar contenida en los productos originados en la primera ronda de amplificación. Como control negativo de este ensayo, se utilizó el ácido nucleico total extraído a partir de células CHSE-214 sin infectar. En la figura 11 se muestra una comparación entre los productos obtenidos en la reacción de PCR anidado (carriles 6 al 13) y los productos que se obtienen en un ensayo RT-PCR, al utilizar como partidores los oligonucleótidos (I-II) y (P1-II) y como templado de la reacción, el RNA genómico de IPNV. Se observa que los productos generados en ambos ensayos presentan igual tamaño, esto sugiere que los productos originados en la primera ronda de amplificación contienen al menos algunas de las secuencias comprendidas en el templado genómico original.

Figura 11 : Identificación de los productos por medio de PCR anidado. Electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12% en que se muestran los productos originados al utilizar como partidores los oligonucleótidos (III-V), (P1-P2) y (P1-II) y como templado el RNA genómico viral. Además, se observan los productos de reamplificación respectivos, originados al utilizar como partidores internos los oligonucleótidos (I-II) y (P1-II). El carril 1 corresponde al marcador de tamaño molecular. Los carriles 2 y 4 corresponden a los controles positivos, productos de la amplificación de 2 ng de RNA viral, utilizando como partidores los oligonucleótidos (I-II) y (P1-II), respectivamente. Los carriles 3 y 5 corresponden a los controles negativos, productos de amplificación de 2 ng de ácido nucleico total extraído de células CHSE-214 sin infectar, utilizando como partidores los oligonucleótidos (I-II) y (P1-II) respectivamente. Los carriles 6, 9 y 12 corresponden a los productos de amplificación (P) al utilizar como templado 2 ng de RNA viral y como partidores los oligonucleótidos (III-V), (P1-P2) y (P1-II) respectivamente. Los carriles 7 y 8 corresponden a productos de reamplificación al utilizar como templado el producto P(III-V) y como partidores los oligonucleótidos (I-II) y (P1-II) respectivamente. Los carriles 10 y 11 corresponden a los productos de reamplificación al utilizar como templado el producto P(P1-P2) y como partidores los oligonucleótidos (I-II) y (P1-II) respectivamente. El carril 13 corresponde al producto de reamplificación al utilizar como templado el producto P(P1-II) y como partidores los oligonucleótidos (I-II).

1.1. *Streptococcus pneumoniae* (S) 496 de 1975 genotipo de 1972 tipo 24 3987

En este estudio se investigó la presencia de genes de resistencia a la penicilina en cepas de *S. pneumoniae* de diferentes genotipos. Se utilizó un sistema de hibridación de ADN que permitió detectar la presencia de genes de resistencia a la penicilina en cepas de diferentes genotipos.



4.4. Amplificación mediante RT-PCR del RNA genómico de tres cepas de IPNV.

Ya que los oligonucleótidos utilizados como partidores en la reacción RT-PCR se seleccionaron desde una región del genomio viral de IPNV establecida como conservada, se podría esperar que este método de identificación RT-PCR desarrollado para este agente viral permitiera reconocer diferentes cepas virales. Con el fin de confirmar este supuesto, se realizó un ensayo de amplificación usando como templado de la reacción el RNA genómico viral extraído desde tres cepas de IPNV de diferentes serotipos y genotipos : Sp, VR-299 y Jasper. Como control negativo del ensayo se utilizó el ácido nucleico total extraído a partir de células CHSE-214 sin infectar. Los productos resultantes de este experimento se ordenaron en cinco grupos, dependiendo del par de oligonucleótidos utilizado como partidador en la reacción, y se sometieron a una electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%. En la figura 12, se puede observar que para cada par de partidores se obtiene un producto de amplificación único y del tamaño esperado y cuya movilidad electroforética es idéntica para las tres cepas de IPNV. Este resultado sugiere que para las tres cepas virales se obtiene el mismo producto de amplificación al utilizar un mismo par de partidores. A continuación, con el fin de comprobar que los productos obtenidos al amplificar los distintos templados presentaban semejanza con la zona originalmente amplificada se efectuaron experimentos de hibridación, en forma similar a lo descrito en el punto 4.3.1.. Se utilizó en este caso la sonda de cDNA sintética de 809 pb marcada con biotina, marcación que se verificó como se muestra en la figura 13.

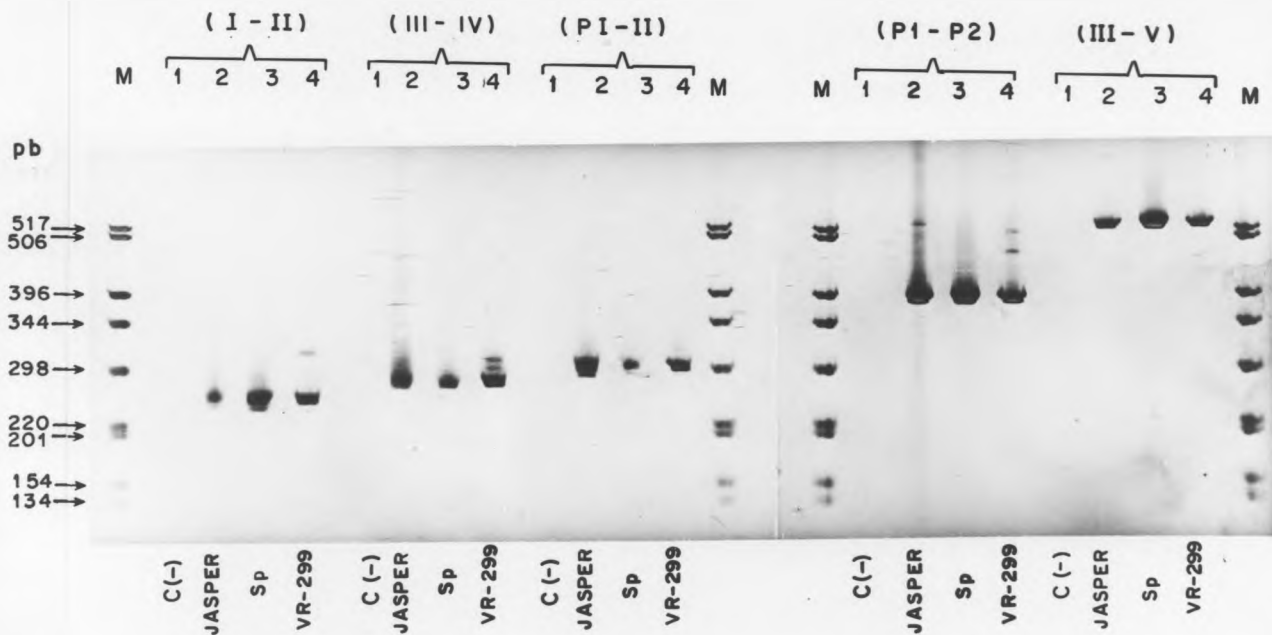


Figura 12: Amplificación del RNA genómico de tres cepas de IPNV mediante RT-PCR. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% de los productos de amplificación generados al utilizar como templado 2ng de RNA viral proveniente de tres cepas distintas de IPNV y como partidores de la reacción RT-PCR los cinco pares de oligonucleótidos. Para los 5 grupos el carril M corresponde al marcador de tamaño molecular, el carril 1 corresponde al control negativo de amplificación (ácido nucleico total extraído a partir de células CHSE-214 sin infectar). Los carriles 2, 3 y 4 corresponden al producto de amplificación obtenido al utilizar como templado, en la reacción de amplificación, el RNA genómico de IPNV de las cepas Jasper, Sp y VR-299 respectivamente. Posteriormente los geles se tiñeron con nitrato de plata.

El sistema de detección que se usó consistió en una película de autorrevelado (Kodak SBX) que se fijó a la membrana de nylon con un pegamento especial. La película se reveló con un revelador de autorrevelado (Kodak D19) durante 24 horas. El sistema de detección que se usó consistió en una película de autorrevelado (Kodak SBX) que se fijó a la membrana de nylon con un pegamento especial. La película se reveló con un revelador de autorrevelado (Kodak D19) durante 24 horas. El sistema de detección que se usó consistió en una película de autorrevelado (Kodak SBX) que se fijó a la membrana de nylon con un pegamento especial. La película se reveló con un revelador de autorrevelado (Kodak D19) durante 24 horas.

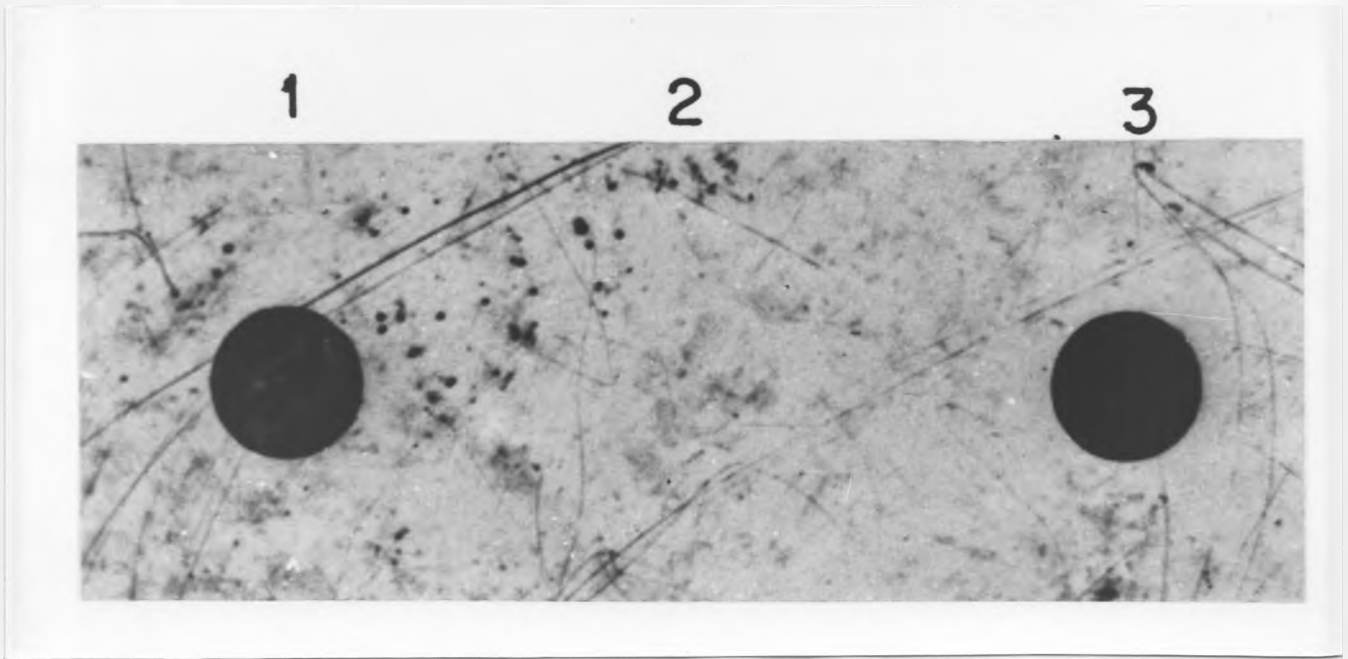


Figura 13 : Verificación de la marcación no radiactiva de la sonda de cDNA. Membrana de nylon en la que se fijó aproximadamente 2 ng de cDNA marcado con biotina (pocillo 1); 2 ng del cDNA sin marcar (pocillo 2) y en el pocillo 3, se cargó DNA control positivo del sistema comercial de detección de ácidos nucleicos utilizado (BluGENE™).

El producto de amplificación que se obtiene utilizando el RNA genómico de las cepas Sp, VR-299 y Jasper como templado de la reacción, se sometió a una electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% (Figura 14, panel A) y posteriormente los productos se transfirieron desde el gel a una membrana de nylon, la que luego se incubó con la sonda marcada con biotina. Como se muestra en el panel B de la figura 14, la sonda hibridó con cada uno de los productos obtenidos en el ensayo de amplificación, resultado que permite establecer que los productos de amplificación contienen secuencias complementarias a la sonda de cDNA utilizada en la hibridación.



Figura 14. A) Imagen de un gel de electroforesis de los productos de amplificación obtenidos a partir del RNA genómico de las cepas Sp, VR-299 y Jasper. Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12% y se transfirieron a una membrana de nylon. B) Imagen de la misma membrana de nylon después de haber sido incubada con una sonda marcada con biotina. La sonda hibridó con cada uno de los productos obtenidos en el ensayo de amplificación, resultado que permite establecer que los productos de amplificación contienen secuencias complementarias a la sonda de cDNA utilizada en la hibridación.

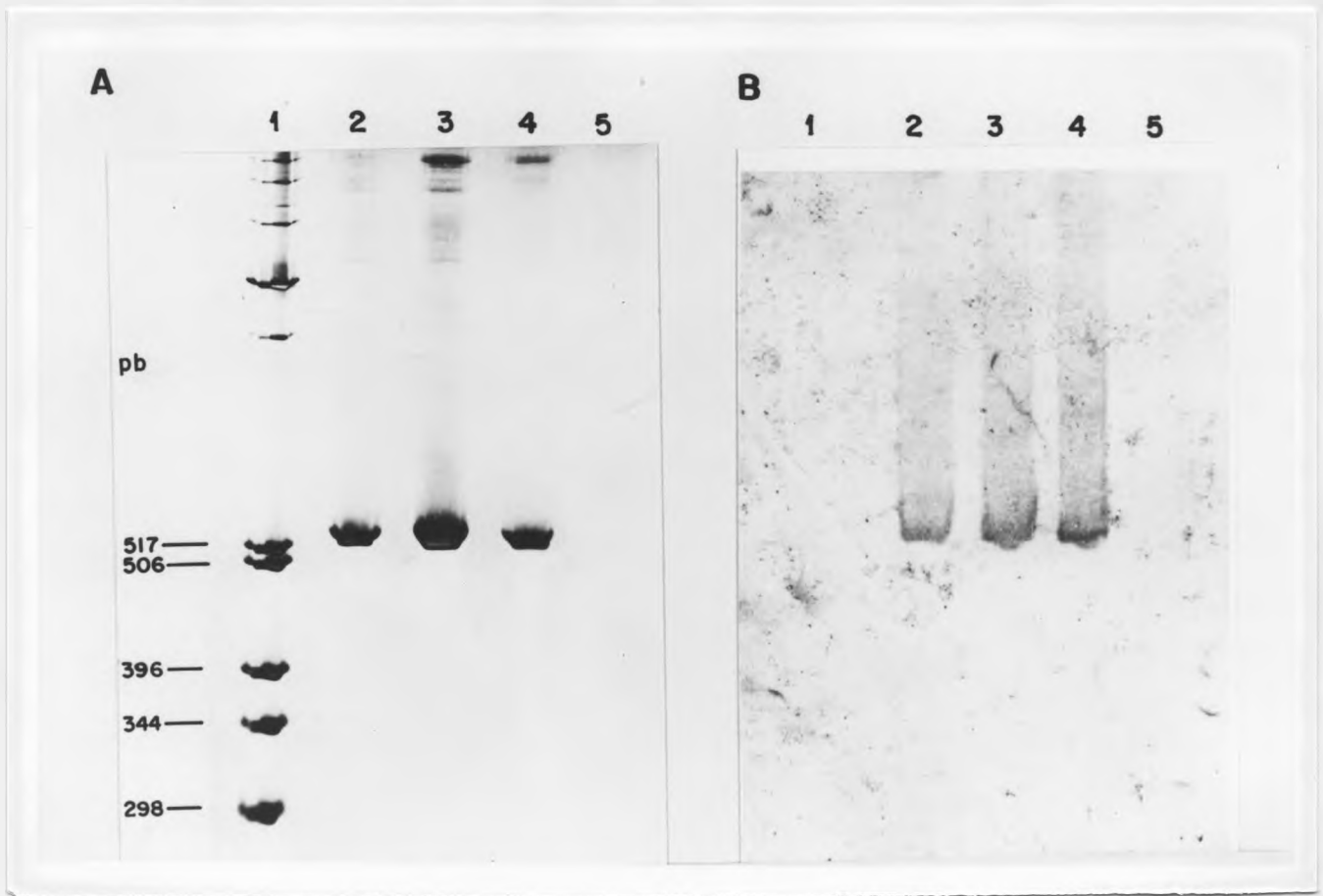
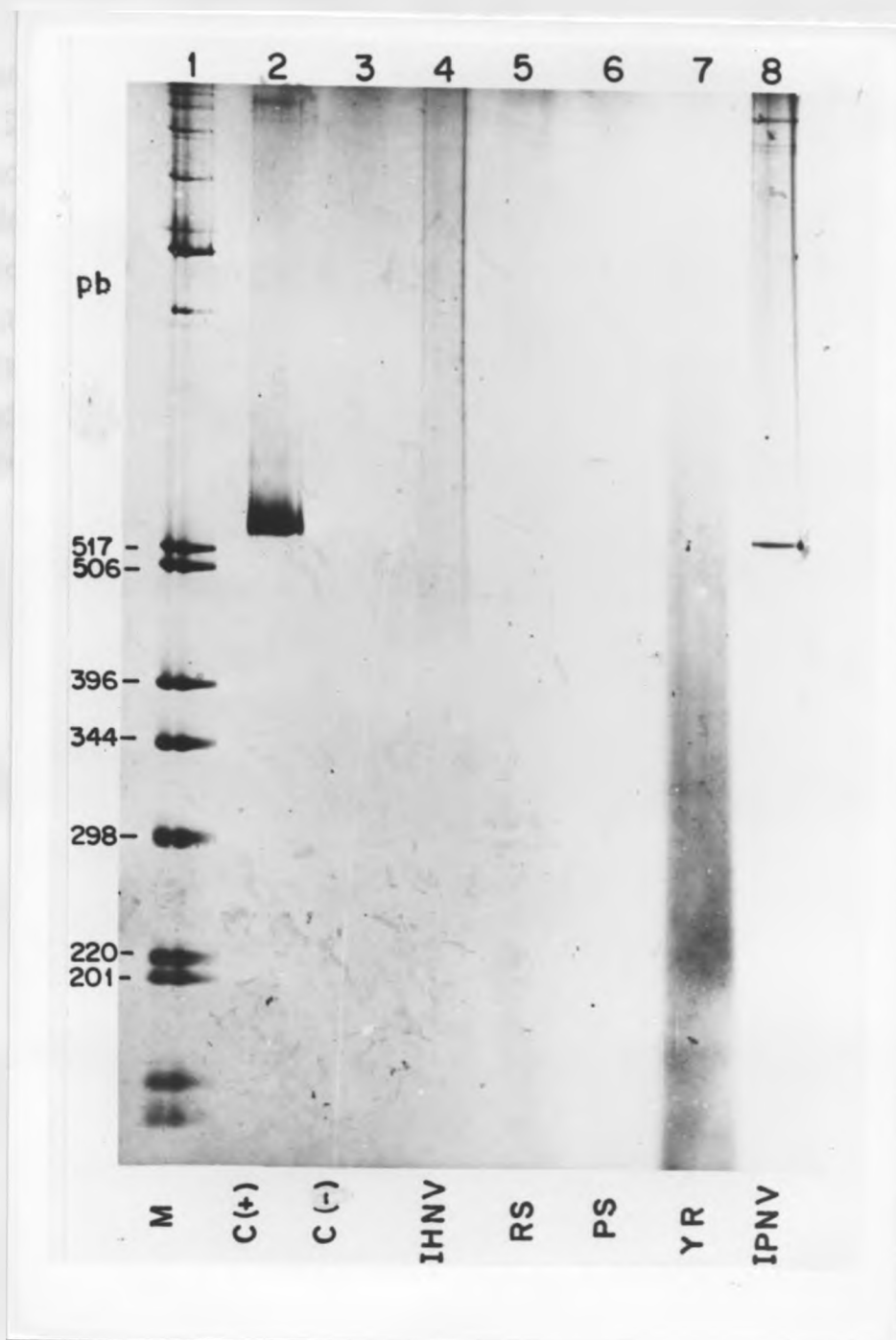


Figura 14 : Ensayo de hibridación de los productos de amplificación obtenidos a partir de RNA genómico de tres cepas de IPNV diferentes. Los productos de amplificación RT-PCR obtenidos al utilizar los ácidos nucleicos de diferentes cepas de IPNV como templado y los oligonucleótidos (III-V) como partidores, fueron sometidos a una electroforesis en geles de poliacrilamida. Posteriormente los productos se transfirieron a una membrana de nylon y se hibridaron con la sonda biotinilada. **Panel A** ; Corresponde a la electroforesis de los productos de amplificación en un gel de poliacrilamida al 12 % teñido con plata. El carril 1 corresponde al marcador de tamaño molecular (1 Kb DNA ladder). Los carriles 2 al 4 corresponden al producto de amplificación originado al utilizar los ácidos nucleicos de las cepas Jasper, Sp y VR-299 como templados de la reacción. El **Panel B** ; corresponde a la hibridación de los productos de amplificación mostrados en el panel A. El ensayo de hibridación con la sonda marcada con biotina se reveló por medio de una reacción colorimétrica.

4.5. Especificidad del ensayo RT-PCR.

Para determinar la especificidad del ensayo se realizó la reacción de RT-PCR utilizando como templado aproximadamente 2ng del ácido nucleico total de *Renibacterium salmoninarum*, del Virus de la necrosis hematopoiética infecciosa, de *Piscirickettsia salmonis* y de *Fersinia ruckeri*, extraídos según el método descrito en Métodos 3.2.2.. Como partidores de la reacción se utilizó el par de oligonucleótidos (III-V) y como control negativo en la amplificación se utilizó el ácido nucleico total extraído a partir de células CHSE-214 sin infectar. El resultado del ensayo se muestra en la figura 15. Se puede observar que no existe producto de amplificación al utilizar como templado de la reacción de amplificación RT-PCR el ácido nucleico de *Renibacterium salmoninarum* (carril 4), del Virus de la necrosis hematopoiética infecciosa (carril 5), de *Piscirickettsia salmonis* (carril 6) y de *Fersinia ruckeri* (carril 7). Sin embargo, al utilizar ácido nucleico de IPNV, ya sea extraído a partir de virus parcialmente purificado o bien utilizando directamente el ácido nucleico de células CHSE-214 inoculadas con el virus IPN con un 90% de ECP, se puede observar una clara banda que corresponde al producto de amplificación esperado en el ensayo (carriles 2 y 8 respectivamente). Este resultado permite establecer que el método reconoce en forma específica el genomio de IPNV, sin que interfieran en la reacción los otros patógenos ensayados

Figura 15 : Especificidad del método RT-PCR para la identificación de IPNV. Electroforesis en un gel de poliacrilamida de los productos de amplificación generados al utilizar como templados en la reacción de amplificación los genomas de cinco patógenos marinos. Como partidores de la reacción se utilizó el par de oligonucleótidos (III-V). El carril 1 corresponde al marcador de tamaño molecular. Los carriles siguientes corresponden a los productos de amplificación generados a partir de 2ng del ácido nucleico extraído desde : carril 2; IPNV parcialmente purificado, carril 3; células CHSE-214 sin infectar, carril 4; Virus de la necrosis hematopoiética infecciosa, carril 5; *Renibacterium salmoninarum*, carril 6; *Piscirickettsia salmonis*, carril 7; *Yersinia ruckeri*, y el carril 8 corresponde al producto de amplificación al utilizar como templado 2 ng de ácido nucleico total extraído de células CHSE-214 infectadas con IPNV. El gel fue teñido con nitrato de plata.



4.6. Sensibilidad del ensayo RT-PCR.

Para evaluar la sensibilidad del método se realizó la reacción de RT-PCR utilizando como templado concentraciones crecientes del RNA genómico viral (cepa Sp) y como partidores de la reacción de amplificación el par de oligonucleótidos (III-V). El rango de concentración de RNA genómico viral utilizado en el ensayo fue desde 250 fg a 1 ng, la que se determinó espectrofotométricamente. Como control negativo de amplificación se utilizó el ácido nucleico total extraído a partir de células CHSE-214 sin infectar. Como se muestra en la figura 16, el límite de detección de la reacción RT-PCR, al visualizar el producto por electroforesis en acrilamida (Material y métodos 3.2.8.1), corresponde a una cantidad inicial de templado de 1 pg de RNA genómico.

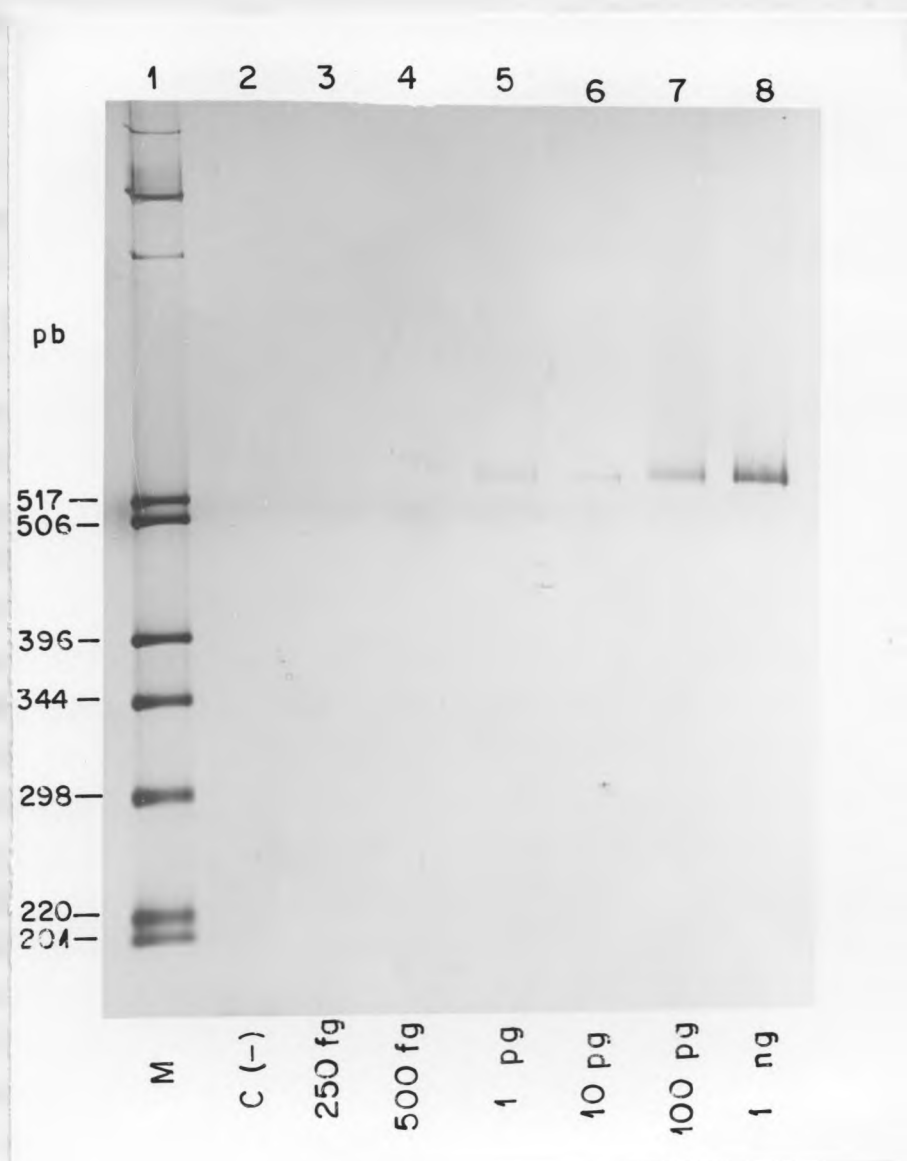


Figura 16 : Sensibilidad del ensayo RT-PCR. Electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12% de los productos de amplificación originados al utilizar como templado distintas concentraciones de RNA genómico de IPNV (cepa Sp), y como partidores los oligonucleótidos (III-V). El carril 1 corresponde al marcador de tamaño molecular. El carril 2 corresponde al producto de amplificación de 2 ng de ácido nucleico total extraído de células CHSE-214 sin infectar. Los carriles 3 al 8 corresponden al producto de amplificación originado al utilizar 250 fg, 500 fg, 1pg, 10 pg, 100 pg y 1 ng de RNA genómico viral como templado inicial de la reacción. En cada carril se cargó un décimo del volumen final de la reacción de amplificación. El gel fue teñido con nitrato de plata.

4.7. Detección de IPNV directamente de tejidos infectados utilizando el ensayo RT-PCR.

Una vez obtenidas las condiciones de especificidad y sensibilidad en el ensayo de amplificación RT-PCR se procedió a realizar un estudio de campo utilizando el método desarrollado para la detección de IPNV, directamente en el tejido de peces infectados. En estos experimentos se utilizó como muestras los riñones y los bazo, de dos especies de salmónidos : trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), cuyas edades fluctuaban entre las dos semanas y los tres meses. Para seleccionar los peces infectados, éstos se sometieron a un reconocimiento viral a través de la técnica de cultivo celular. En algunos casos el ECP se visualizó al realizar dos pasajes celulares sucesivos. La presencia del virus se confirmó mediante la visualización del genoma de IPNV utilizando la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% teñidos con nitrato de plata. Posteriormente, las muestras se dividieron, de acuerdo a su origen, en tres grupos que corresponden a peces sanos, peces sintomáticos y peces asintomáticos para la enfermedad. Las muestras fueron entonces homogeneizadas, digeridas y posteriormente se realizó la identificación viral aplicando el ensayo RT-PCR en forma directa, sin previa extracción del ácido nucleico, utilizando los partidores (III-V). Como control positivo de amplificación se utilizó el RNA genómico de IPNV, extraído desde virus parcialmente purificado de la cepa viral Sp. Los resultados de este ensayo se muestran en la figuras 17 y 18. En la figura 17 se observa que no se obtienen productos de amplificación a partir del tejido de los peces sanos (carriles 3 y 4). Sin embargo, en los peces que presentaban signos clínicos claros de la enfermedad, así como, en aquellos peces portadores del virus se pudo confirmar claramente la presencia del agente, al visualizar en forma clara la banda correspondiente al producto de amplificación. Los resultados obtenidos sugieren que la reacción de amplificación RT-PCR permite detectar IPNV directamente a partir de tejidos infectados, y además se establece que el tejido blanco del virus no interfiere con el resultado final del ensayo de amplificación.

En forma adicional y como una aproximación preliminar a posibles aplicaciones futuras del método de detección, se microinyectaron ovas obtenidas de un reproductor certificado libre de IPNV, con aproximadamente 2 ng del virus IPN parcialmente purificado (Brown et al., 1990). Estas ovas fueron homogeneizadas, digeridas y posteriormente se extrajo el ácido nucleico total, el que

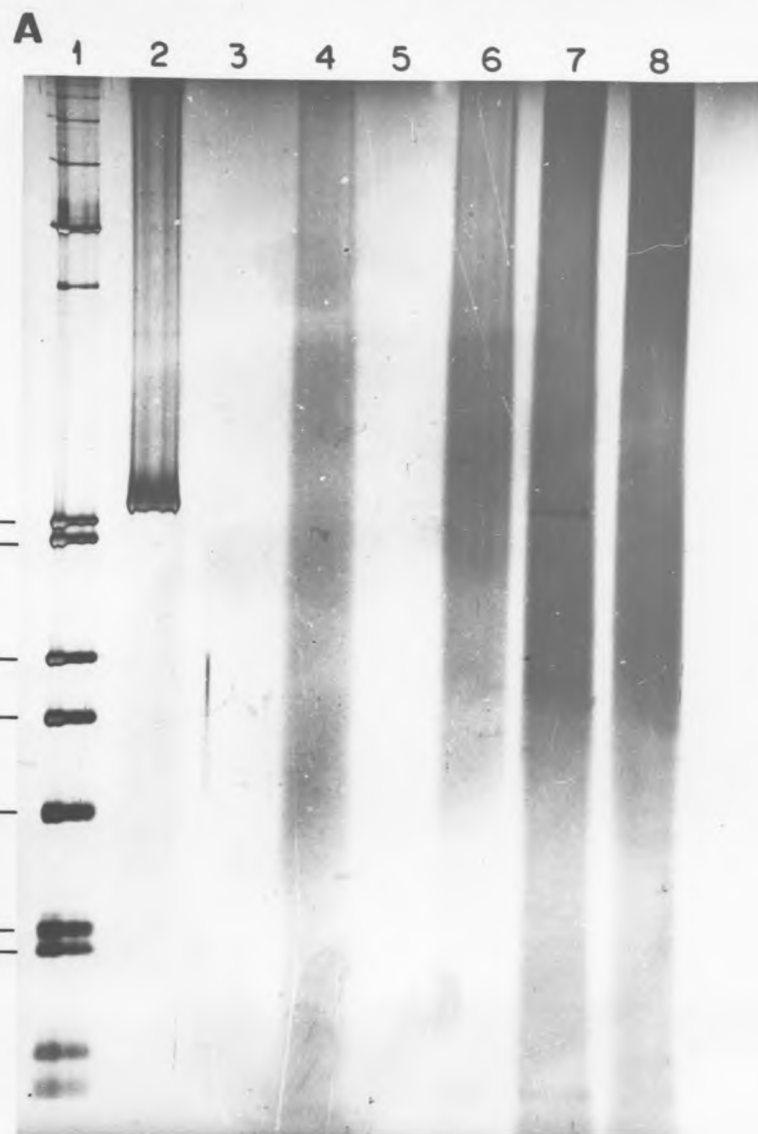
se sometió al ensayo RT-PCR. Como control negativo de amplificación del ensayo, se utilizaron ovas sin microinyectar provenientes del mismo lote de ovas certificadas, la que fueron procesadas en igual forma. Los resultados de este ensayo preliminar se muestran en la figura 17, en donde el carril 12 corresponde al producto de amplificación obtenido al utilizar como templado el ácido nucleico de las ovas infectadas experimentalmente. Se puede observar que aparece la banda correspondiente al producto esperado, tal como se obtiene al usar como templado el RNA genómico de IPNV (carril 2). No se observa banda alguna en el carril 11 que corresponde a las ovas sin infectar, sugiriendo que este método permitiría detectar IPNV directamente desde las ovas infectadas.

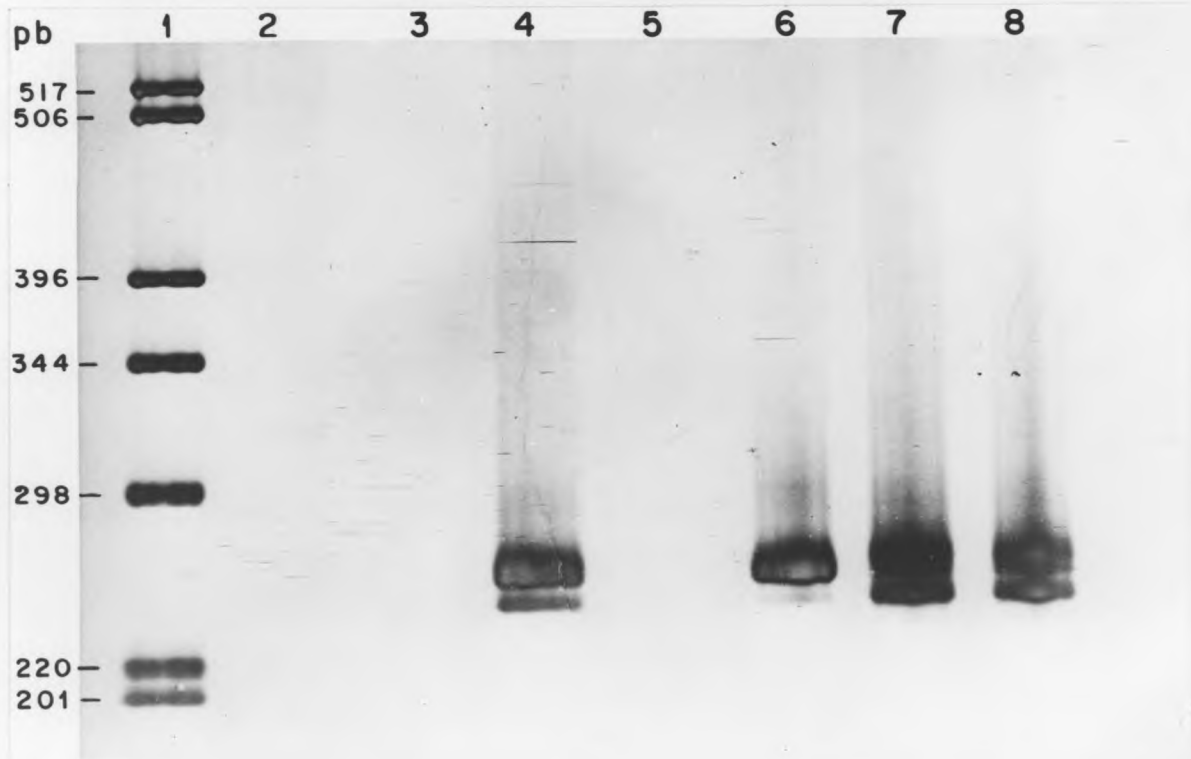
Posteriormente se sometieron a este ensayo un grupo adicional de peces asintomáticos. Este grupo se caracterizó por presentar una baja carga viral, pues sólo fue posible aislar el virus IPN al propagarlo en cuatro pasajes celulares sucesivos. La figura 18 muestra los resultados de este ensayo, en donde sólo se observó una banda de amplificación clara en el carril 7, probablemente debido a que la concentración del producto generado en el ensayo no era detectable por medio de geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata. Con el objeto de verificar la existencia de una baja concentración de producto de amplificación, estos posible productos se reamplificaron utilizando como partidores internos los oligonucleótidos (I-II). Los resultados del ensayo de PCR anidado se muestran en el panel B de la figura 18. Se puede observar que al reamplificar el posible producto originado a partir de la reacción RT-PCR, se obtiene el producto de amplificación esperado para los partidores (I-II). Este resultado indica que la concentración de producto obtenido en la primera ronda de amplificación era inferior al límite de detección de la técnica utilizada. Esto se debe a la relación directa que existe entre la concentración del templado inicial y la concentración final del producto de amplificación. El resultado obtenido permite además demostrar que la sensibilidad de la técnica desarrollada para identificar IPNV directamente a partir de tejidos infectados, puede ser mejorada al acoplar a la reacción RT-PCR una segunda ronda de amplificación. Esto facilitaría la detección del agente viral en peces portadores de IPNV permitiendo que el método desarrollado pueda ser aplicado al control epidemiológico de la enfermedad.

Figura 17: Análisis directo de tejidos infectados. Electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12 % de los productos de amplificación obtenidos al someter directamente muestras de riñón y bazo de salmón Coho y trucha arcoiris, sintomáticas y asintomáticas para la enfermedad a una amplificación RT-PCR. Se utilizó el par de partidores (III-V) en la reacción. El carril 1 corresponde al marcador de tamaño molecular. El carril 2 corresponde al control positivo, 2 ng de RNA genómico viral. Los carriles 3 y 4 corresponden a muestras de riñón de trucha arcoiris y bazo de salmón Coho sanos y libres de IPNV respectivamente. Los carriles 5 al 7 corresponden a muestras de riñón de trucha arcoiris, riñón de salmón Coho y bazo de trucha arcoiris de peces sintomáticos para la enfermedad IPN, respectivamente. Los carriles del 8 al 10 corresponden a muestras de bazo de salmón Coho, bazo de trucha arcoiris y riñón de trucha arcoiris de peces asintomáticos para la enfermedad IPN, respectivamente.

El método de identificación de IPNV por la reacción RT-PCR, se utilizó también para analizar ácidos nucleicos totales extraídos de ovas infectadas experimentalmente. El carril 11 corresponde a muestras de ovas sin infectar. El carril 12 corresponde a muestras de ovas infectadas experimentalmente con el virus.

Figura 18: Ensayo RT-PCR en muestras de tejidos provenientes de peces portadores del virus IPN. Electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12 % de los productos de amplificación obtenidos al utilizar los partidores (III - V) en muestras de riñón y bazo de trucha arcoiris y de salmón Coho portadores del virus. **Panel A:** el carril 1 corresponde al marcador del tamaño molecular. Los carriles 2 al 8 corresponden al producto de amplificación originado al utilizar como templado de la reacción de amplificación : ácido nucleico total extraído de células CHSE-214 previamente inoculadas con la cepa Sp de IPNV (control positivo), carril 2; ácido nucleico total extraído a partir de células CHSE-214 sin infectar (control negativo), carril 3; homogeneizado de bazo de salmón Coho y riñón de una trucha arcoiris libres de IPNV, carriles 4 y 5 respectivamente. Los carriles 6 al 8 corresponden a muestras de bazo de una trucha arcoiris, de riñón de una trucha arcoiris y de riñón de un salmón Coho portadores de IPNV. El gel fue teñido con nitrato de plata.



B

Panel B: Muestra los productos de reamplificación del ensayo anterior (panel A) utilizando los partidores (I-II). El carril 1 corresponde al marcador del tamaño molecular, los carriles 2 y 3 corresponden a la reamplificación de los controles negativos de pez sano, bazo de salmón Coho y riñón de trucha arcoiris. Los carriles 4 y 5 corresponden a la reamplificación de los controles de amplificación, positivo y negativo, respectivamente. Los carriles 6,7 y 8 del panel corresponden a los productos de reamplificación de los peces portadores de IPNV, bazo de trucha arcoiris, riñón de trucha arcoiris y a riñón de salmón Coho, respectivamente.

5. DISCUSION.

El virus de la necrosis pancreática infecciosa es el agente etiológico de una enfermedad altamente contagiosa que produce grandes mortalidades, especialmente en salmones jóvenes en cultivo (McAllister, 1988, Pilcher y Fryer, 1980, Wolf, 1988). En la actualidad la prevención de esta enfermedad se basa en un diagnóstico precoz de aquellos peces infectados con el virus (Pilcher y Fryer, 1980, Wolf, 1988). Sin embargo, los métodos actualmente utilizados para la identificación del IPNV requieren que el agente viral sea previamente propagado en cultivo celular, por lo tanto son métodos de alto costo, demorosos, y además la sensibilidad que ellos presentan, no posibilita la detección del virus en los peces sanos portadores de éste (Sanz y Coll, 1992). En la presente tesis se describe el desarrollo del método RT-PCR para la identificación del virus IPN cuya alta sensibilidad y especificidad permitirá detectar el virus, directamente desde los tejidos de peces infectados, incluso en aquellos peces sanos portadores del agente viral.

La reacción de la polimerasa en cadena (PCR) ha sido calificada como un proceso nuevo y revolucionario que permite replicar en poco tiempo trazas de DNA. De hecho, desde que surgió la idea que dio origen a la técnica en 1983 (Nash 1991, Edginton 1992) se ha convertido en el método más revolucionario de la biología molecular, el cual actualmente se aplica en el diagnóstico de una gran variedad de enfermedades infecciosas (Sardelli 1993, Erlich et al. 1991, Caas et al., 1991, Gouvea et al., 1991, Belák y Ballagi-Pordány, 1993, Oberst et al., 1993).

El desarrollo del método de identificación del IPNV a través de la reacción RT-PCR consistió en primer lugar en la selección de los partidores de la reacción de amplificación, desde una región del segmento A del genomio viral que codifica para una zona de la proteína VP2 (Duncan y Dobos, 1986), la que se ha establecido como una región conservada entre las distintas cepas de IPNV (Barrie et al 1992). Una vez seleccionados los partidores se procedió a adaptar la reacción de PCR, con el propósito de utilizar como templado inicial el RNA genómico del virus IPN. Como la técnica de PCR requiere un templado inicial de DNA, la primera adaptación consistió en acoplarle una reacción previa de transcripción inversa (RT), con el objeto de obtener cDNA complementario al RNA genómico viral (Doherty et al., 1989, Mahbubani, 1991). Durante la etapa de transcripción inversa,

hubo que considerar la resistencia natural a la denaturación térmica que presenta el RNA genómico de IPNV. Esta resistencia, debida principalmente a la estabilidad conferida por las proteínas VPg covalentemente unidas a cada extremo 5' del genomio y a la estabilidad natural de una estructura nucleotídica de doble hebra, hizo del proceso de denaturación del RNA genómico un paso crítico para la síntesis de cDNA (Davis y Boyle, 1990). Es por esto que previo a la denaturación térmica, el genomio viral fue sometido a una proteólisis (Calvert et al., 1991). Se ha descrito que posterior al tratamiento con proteasa es posible desnaturar el dsRNA a 89°C en un medio conteniendo hidroximetilmercurio o a 95,5°C en un medio conteniendo una alta concentración salina (Cohen et al., 1973, Stephens y Hetrick, 1982, Davis y Boyle, 1990). Como esta tesis consistía en desarrollar una técnica para la detección rutinaria del IPNV en laboratorios de diagnóstico ictiopatólogicos, se evitó introducir en el método elementos tóxicos que pudiesen perjudicar su uso. En consecuencia, se denaturó la doble hebra de RNA genómico de IPNV por calentamiento a más de 100°C (Stephens y Hetrick, 1983). Este estado de denaturación del RNA se mantuvo posteriormente enfriando rápidamente la solución a 0°C (Cohen et al., 1973). Para evitar la formación de productos de amplificación inespecíficos se realizó la reacción de transcripción reversa con los dos partidores específicos de reacción, permitiendo de esta forma obtener cDNA complementarios al RNA inicial acotados en los extremos 5' terminal por el partidore correspondiente, evitando el uso de partidores hexaméricos o partidores degenerados, los cuales aumentan la probabilidad de obtener productos inespecíficos amplificables en ciclos posteriores.

Una vez finalizada la etapa de transcripción inversa, la enzima transcriptasa inversa se denaturó para así liberar el cDNA que permanece asociado a ella y además para evitar la inhibición que esta enzima ejerce al estar activa, sobre la Taq DNA polimerasa (Mangan and Butcher, 1993). Por otro lado, para evitar toda manipulación innecesaria del producto, y así prevenir posible contaminación en las distintas etapas de la amplificación, la reacción de transcripción inversa y la reacción de PCR se realizaron en un mismo tubo. Esto fue posible por la semejanza existente entre los tampones descritos para ambas reacciones, semejanza que permitió realizar la reacción de amplificación por PCR en el tampón diluido de la reacción de RT, sin necesidad de purificar o extraer el cDNA previamente (Doherty et al., 1989, Fuqua et al., 1990). Posteriormente, durante la reacción de amplificación por PCR, se tomaron precauciones para

reducir la formación de productos inespecíficos, especialmente en el primer ciclo de amplificación. Para ello siempre se utilizó una estrategia térmica, la que consistió en agregar la enzima Taq DNA polimerasa en forma separada de los otros componentes necesarios para la amplificación a una temperatura de mezcla de 94°C (Ruano et al., 1991). A esta temperatura no existe ninguna interacción partidortemplado evitando así la generación de productos inespecíficos originados de una hibridación no selectiva de los partidores al templado, lo que puede ocurrir a temperaturas entre 30°C y 60°C, rango en la cual la Taq DNA polimerasa presenta una actividad parcial (Ruano et al., 1991). Este tipo de interacciones inespecíficas o bien aquéllas que involucran interacciones partidortemplado se ven favorecidas tanto por una muy baja concentración de templado como por efectuar la reacción en un rango de temperaturas no restrictiva, en la cual la hibridación partidortemplado pierde especificidad (Ruano, 1991, Hébert et al., 1993). De esta forma la cantidad de producto inespecífico generado en los ciclos iniciales de la reacción de amplificación se redujo, como se puede observar en las figuras 6 y 7, permitiendo obtener sólo un producto de amplificación mayoritario. Por otro lado, para evitar falsos positivos originados durante la reacción de amplificación, por causa de contaminación debida a productos de reacciones de amplificación previas, se tomaron una serie de precauciones, como por ejemplo, incluir controles positivos y controles negativos cuidadosamente seleccionados, de tal manera que fueran representativos y permitieran dar cuenta de los resultados finales (Kwok y Higuchi, 1989, Ou et al., 1992, Belák, 1992, Prince y Andrus, 1992).

Los productos de amplificación obtenidos por medio de la reacción de amplificación RT-PCR, se sometieron finalmente a electroforesis en geles de poliacrilamida al 12 % y se visualizaron con la técnica de tinción con nitrato de plata descrita por Herring (1982), la que tiene una sensibilidad mayor que los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (Sarkar et al., 1992). El tiempo total requerido para realizar esta técnica de amplificación y posterior identificación viral es de 8 a 12 h.

A pesar de haber obtenido un producto único de amplificación que además presenta el tamaño esperado, se realizaron experimentos de hibridación (figura 10) y PCR anidado (figura 11) para confirmar que estos productos finales de la reacción RT-PCR efectivamente correspondían a los productos de amplificación esperados. Los ensayos de hibridación (figura 10) permitieron

establecer que los productos tienen secuencias complementarias a la región del genoma de IPNV que codifica para la proteína VP2, secuencias que están presentes en la sonda de cDNA. Más aún, el ensayo de PCR anidado (figura 11) reafirma lo anterior, puesto que los productos de este ensayo presentan una migración electroforética idéntica a los productos originados al utilizar RNA genómico de IPNV como templado de reacción. Este resultado indica que la secuencia de los partidores internos está presente tanto en el genoma viral como también en los productos de amplificación, y además delimitan una zona que genera productos de igual tamaño que probablemente presenta la secuencia nucleotídica esperada para el producto de amplificación.

En consecuencia, se logró desarrollar un método de detección específico para el virus IPN, basado en la reacción RT-PCR y posterior reconocimiento del producto único de amplificación. Además, se obtiene el mismo producto de amplificación al usar como templado de la reacción el RNA genómico proveniente de tres cepas diferentes de IPNV, Sp, Jasper y VR-299, las cuales pertenecen a serotipos y genogrupos virales diferentes (figura 12 y 14). Este resultado es importante ya que confirma que la región genómica de la cual se seleccionaron los partidores, es una zona conservada entre las diferentes cepas virales. Más aún, permite suponer que la técnica de identificación viral desarrollada sería útil para detectar diferentes cepas de IPNV sin importar al serotipo o subgrupo al cual pertenecen. Por último, los resultados en la figura 15 demuestran que la reacción RT-PCR es específica para el IPNV, ya que al utilizar como templado de la reacción el material genómico de otros patógenos descritos como importantes para la industria acuícola, como son *Renibacterium salmoninarum*, el Virus de la necrosis hematopoiética infecciosa (IHNV), *Piscirickettsia salmonis* y *Yersinia ruckeri*, no se obtiene ningún producto de amplificación (Conley, 1985).

En cuanto a la sensibilidad de la técnica RT-PCR para IPNV, se logró detectar cantidades de RNA genómico viral del orden de los picogramos, superando la sensibilidad descrita para los métodos inmunológicos tradicionalmente utilizados para la confirmación de la presencia del agente viral. Mediante un ensayo de Elisa que utiliza anticuerpos monoclonales sólo se logra detectar 10 ng de virus parcialmente purificado, lo que equivale aproximadamente a 1×10^9 partículas virales o a 1×10^6 partículas infectivas (PFU) (Hattori et al., 1984, Domínguez et al., 1990) y al utilizar como método de detección viral una inmunotransferencia que

utiliza anticuerpos policlonales sólo se logra detectar 0,85 ng de virus parcialmente purificado lo que equivale aproximadamente a 1×10^8 partículas virales o bien a 1×10^5 PFU (Sanz y Coll, 1992). Otra técnica normalmente utilizada para la identificación del IPNV se basa en el reconocimiento del genoma viral por electroforesis en geles de poliacrilamida, la que permite detectar 1 ng de RNA genómico viral, lo que equivale aproximadamente a 1×10^8 partículas virales o bien a 1×10^5 PFU (Ganga et al, 1994). Sin embargo, el método RT-PCR que hemos desarrollado permite detectar el DNA producido al amplificar el cDNA originado a partir de 1 pg de RNA viral (figura 16), lo que es equivalente aproximadamente a 1×10^5 partículas virales o bien a 1×10^2 PFU, es decir que es por lo menos tres órdenes de magnitud más sensible que los métodos de diagnóstico de IPNV actualmente en uso. Mas aún, cabe hacer notar que el límite de sensibilidad de detección del método RT-PCR no sólo depende de la cantidad de producto final de amplificación obtenido, sino que también depende, en este caso, del límite de detección de la técnica de tinción de nitrato de plata en geles de poliacrilamida. Por esto una alternativa para aumentar la sensibilidad del método RT-PCR, sería optar por otro sistema de visualización de los productos de amplificación que tuviera una mayor sensibilidad que la presentada por electroforesis en geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata. Por ejemplo, mediante una reacción colorimétrica o bien de electroquimioluminiscencia se puede aumentar la sensibilidad de la técnica sin incrementar considerablemente el tiempo requerido para efectuar el ensayo (Reynolds y Sensabaugh, 1991, Wages et al, 1993). Otra alternativa para aumentar la sensibilidad del PCR, sin modificar el sistema para visualizar los productos, es someterlos a una segunda ronda de amplificaciones como se observa en la figura 18 (Severini et al., 1993). Hay que destacar, sin embargo, que aún sin las modificaciones propuestas, el método de RT-PCR sobrepasa la sensibilidad demostrada por todos los métodos hasta ahora descritos para la identificación y el diagnóstico del agente viral.

Una vez establecida la especificidad y la sensibilidad de la técnica de RT-PCR para la identificación del virus IPN, ésta se utilizó para detectar el virus directamente a partir de los tejidos de peces infectados. Para ello se sometieron al ensayo RT-PCR homogeneizados de tejidos infectados, los que fueron tratados con detergentes que no interfieren con la reacción (Weyant et al., 1990), permitiendo así realizar la amplificación sin la extracción previa de los ácidos nucleicos desde el homogeneizado. Esta modificación del método de tratamiento del tejido, evita

manipulación innecesaria de la muestra y disminuye el tiempo de realización del ensayo, permite además utilizar en cada ensayo órganos completos (riñón y/o bazo) evitando así, diluir la carga viral total del tejido. La alta sensibilidad de éste método de detección de IPNV permitió identificar el virus IPN directamente en tejido, tanto de peces sintomáticos como asintomáticos para la enfermedad (figura 17). Por otro lado se determinó que con un paso de reamplificación se aumenta la sensibilidad del ensayo sin afectar la especificidad de éste, permitiendo detectar el virus en peces con una carga viral muy baja en su tejido (figura 18). Finalmente, también se sugiere en este trabajo que es posible detectar el agente viral directamente desde las ovas infectadas en forma experimental, comprobándose que el material que las compone no interfiere con la reacción de amplificación (figura 17).

En la práctica el diagnóstico de IPNV se realiza en dos etapas, la primera consiste en propagar el agente viral en cultivo celular y observar la aparición del efecto citopático (ECP) esperado. La segunda etapa consiste en confirmar la presencia viral a través de pruebas inmunológicas moleculares con el objeto de determinar si el ECP corresponde al agente viral y no es producto del efecto citotóxico producido por el inóculo sobre la monocapa celular (Sanz y Coll, 1992). Esta dependencia de las técnicas de diagnóstico del IPNV del cultivo celular hacen que tengan un alto costo y requieren de una infraestructura adecuada para la mantención de las líneas celulares en uso. El alto costo junto con el difícil manejo de la técnica de cultivo celular ha impedido que estas técnicas se implementen en muchos laboratorios ictiopatólogicos. En consecuencia, un aporte relevante del método de detección RT-PCR para IPNV desarrollado en esta tesis es que independiza el diagnóstico de este agente patógeno de las complicaciones propias de la técnica de cultivo celular, por lo tanto disminuye los costos y permite reducir el tiempo de identificación del agente desde algunos días, a 8 h. Por otro lado, es una técnica fácil de realizar y que entrega resultados claramente interpretables, posibilitando su implementación sin requerir de una gran infraestructura ni personal tan especializado.

El método RT-PCR para la detección de IPNV presenta enormes proyecciones en el área del diagnóstico ictiopatólogico, puesto que al posibilitar el diagnóstico de IPN en 8 h., facilita la toma de medidas preventivas en caso de un brote infeccioso. Además puede aplicarse a otras especies marinas tales como

carpas, anguila y turbot. Finalmente, éste es un método altamente sensible que permite pesquisar la existencia de portadores virales sanos. En consecuencia esta técnica podrá utilizarse para controlar en forma periódica un plantel de peces y reproductores en cultivo que no presenten sintomatología de la enfermedad. Así, la reacción RT-PCR aquí descrita constituye una herramienta importante en el control de la diseminación del virus IPN.

Futuras modificaciones del método podrían permitir detectar el virus desde muestras sanguíneas del pez, evitando así su sacrificio (Rodriguez et al., 1991). Esto posibilitaría realizar estudios epidemiológicos rutinarios especialmente en los peces reproductores, sin afectar el número de ellos. Además, la técnica de RT-PCR podrá ser utilizada para identificar IPNV directamente en ovas infectadas y controlar de esta manera las ovas que ingresen al país, evitando así la introducción y posterior diseminación del virus IPN en las aguas nacionales.

En resumen, este método permitirá asegurar una vigilancia epidemiológica continua y así controlar la diseminación e ingreso de este agente patógeno en cualquier lugar del mundo y especialmente en países como Chile, cuya producción de especies cultivables depende en gran medida de la importación de ovas desde países donde la enfermedad tiene carácter de endémica (Mardones, 1993).

5.1. CONCLUSIONES.

1- Cada uno de los pares de partidores seleccionados a partir desde una región conservada de la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína mayoritaria de la cápside, VP2, dieron origen a un producto único de amplificación, el cual, en cada caso, hibridó con una sonda de cDNA marcada radiactivamente específica para VP2.

2- El método es específico para IPNV, permitiendo identificarlo de otros patógenos importantes para la acuicultura nacional, ya que sólo se obtiene producto de amplificación cuando se utiliza RNA del virus IPN como templado.

3- El método permitió identificar IPNV de tres diferentes cepas virales SP, VR-299 y Jasper, las cuales pertenecen a serotipos y genotipos diferentes.

4- La técnica de amplificación desarrollada sobrepasa la sensibilidad y rapidez de los métodos hasta ahora descritos para el diagnóstico de IPNV. El límite de detección para el RNA genómico viral es del orden de los picogramos y su uso reduce el tiempo de identificación del patógeno desde algunos días (cultivo celular) a 8 h.

5- El método permite identificar el virus IPN directamente desde tejido infectado, tanto de peces sintomáticos como asintomáticos para la enfermedad, evitando la propagación viral por cultivos celulares.

6- Con futuras adaptaciones, este método podrá ser utilizado para identificar IPNV directamente de ovas infectadas, permitiendo de esta manera la certificación de ellas.

7- La posibilidad de contar con el método RT-PCR para detectar IPNV, en pocas horas, directamente desde tejidos y ovas infectadas, permitirá controlar la diseminación del virus la cual se ve favorecida por el movimiento de peces y ovas, característicos en las industrias acuícolas.

6. AGRADECIMIENTOS.

En este momento tan importante para mi carrera profesional quiero agradecer a todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron en mi desarrollo científico.

Agradezco a todos los miembros de la Unidad de Virología del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, INTA. Admiro la paciencia que han demostrado al soportar mi carácter y forma de ser. Aprecio su constante y desinteresado apoyo tanto en lo científico como en lo personal. Quiero que sepan que realmente he encontrado a buenos amigos en ustedes y por sobretodo agradezco que me hayan hecho sentir como parte de un equipo.

- Dr. Ana Maria Sandino, gracias por guiar mis primeros pasos con tanta paciencia y darme la libertad para cometer mis propios errores y ayudarme a aprender de ellos.

- Gracias Dr. Eugenio Spencer por su amistad, guía y constantes consejos, los cuales espero nunca olvidar y siempre tener presentes. Gracias por interesarse por mi futuro y encaminarme hacia el cumplimiento de mis metas profesionales.

- Macu quiero que sepas que sin tu apoyo no habría podido superar tan fácilmente los momentos de desilusión. Gracias por haber dedicado tu tiempo, en forma desinteresada, para enseñarme a ser mejor.

- Gracias Maritza, Marcela, Jorge, Marianne, Marisol, Eliecer, Teresa, Patricio y Don Oscar por tantos momentos de amistad compartidos, gracias amigos, por su constante apoyo y comprensión.

- Gracias Ricardo y Leo por su gran ayuda y disposición, especialmente en aquellos momentos cuando el factor tiempo era fundamental.

- Quiero agradecer a Eduardo Espejo y Milena Cotorás por apoyarme en los momentos de escasez y por brindarme su sincera amistad.

- Agradezco a mis profesores de la Universidad Austral de Chile, por darme bases científicas sólidas sobre las cuales construir. En forma muy especial agradezco al Dr. Manuel Krauskopf, por ser mi amigo y profesor patrocinante.

Esta tesis fue financiada por los proyectos FONDECYT 1065-92 e IFS A/1844-2F.

7. LITERATURA CITADA.

Amos, Kevin H., editor (1985) Procedures for the detection and identification of certain fish pathogens. 3d ed. Fish Health Section, American Fisheries Society. Corvallis, Oregon.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J. G., Smith, J.A., and Struhl, K. (1991) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York.

Barrie, R.J., Mason, C.L., and Leong, J.C. (1992) Identification of a conserved antigenic domain in the major capsid protein of infectious pancreatic necrosis virus. NOAA Technical Reports NHFS, 111, 15-19.

Belák, S., and Ballagi-Pordány, A. (1993) Experience on the application of the polymerase chain reaction in a diagnostic laboratory. Molec. Cell. Probes, 7, 241-248.

Berry, M., and Samuel, C. (1982) Detection of subnanogram amounts of RNA in polyacrylamide gel in the presence and absence of protein by staining with silver. Anal. Biochem., 124, 180-184.

Brown, L. L., Ricks, R., Evelyn, T. P. T. and Albright, L. J. (1990) Experimental intra-ovum infection of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) eggs with *Renibacterium salmoninarum* using a microinjection technique. Dis. Aquat. Org., 8, 7-11.

Calvert, J. G., Nagy, E., Soler, M. and Dobos, P. (1991) Characterization of the VPg-dsRNA linkage of infectious pancreatic necrosis virus. J. Gen. Virol., 72 2563-2567.

Chang, N., MacDonald, R. D. and Yamamoto, T. (1978) Purification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and comparison of polipeptide composition of different isolates. Can. J. Microbiol., 24, 19-27.

Cohen, J., Poinsard, A. and Scherrer, R. (1973) Physico-chemical and morphological features of infectious pancreatic necrosis virus. *J.Gen.Virol.*, 21,485-498.

Conley, C. (1985) Aspectos legales y de control en la acuicultura en Chile. Servicio nacional de pesca, Biblioteca del servicio nacional de pesca.

Davis, V. S. and Boyle, J. A. (1990) Adapting the polimerase chain reaction to a double-stranded RNA genome. *Anal. Biochem.*,189, 30-34.

Dea, S. and Elazhary, M. A. S. Y. (1983) Counterimmunoelectrophoresis for identification of infectious pancreatic necrosis virus after isolation in cell culture. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 40, 2200-2203.

Dixon, P. F. and Hill. B.J. (1983) Inactivation of infectious pancreatic necrosis virus for vaccine use. *J. Fish Dis.*, 6, 399-409.

Dixon, P. F. and Hill. B.J. (1983) Rapid detections of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) by enzyme- linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Gen. Virol.*, 64, 321-330.

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

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

Dobos, P. and Rowe, D. (1977) Peptide map comparison of infectious pancreatic necrosis-specific polipeptides. *J.Virol.*, 24,805-820.

Dobos, P. and Roberts, T. E. (1982) The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus: a review. *Can. J. Microbiol.*, 29, 377-384.

Doherty, P. J., Huesca-Contreras, M., Dosch, H. M., and Pan, S. (1989) Rapid amplification of complementary DNA from small amounts of unfractionated RNA. *Anal. Biochem.*, 177, 7-10.

Domínguez, J., Babín, M., Sánchez, C., and Hedrick, R. P. (1991) Rapid serotyping of infectious pancreatic necrosis virus by one-step enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. *J. Virol. Methods*, 31, 93-104.

Duncan, R. and Dobos, P. (1986) The nucleotide sequence of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) dsRNA segment A reveals one large ORF encoding a precursor polyprotein. *Nucl. Acids Res.* 14, 5934.

Duncan, R., Mason, C. L., Nagy, E., Leong, J. and Dobos, P. (1991) Sequence analysis of infectious pancreatic necrosis virus genome segment B and its encoded VP1 protein : A putative RNA dependent RNA polimerase lacking the Gly-Asp-Asp motif. *Virol.*, 181, 541-552.

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

Edgington, S. M. (1992) PCR : Catching the next wave. *Bio/technology* 10, 137-139.

Erllich, H. A., Gelfand, D. and Sninsky, J. J. (1991) Recent advances in the polimerase chain reaction. *Science* 252, 1643-1650.

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

Fuqua, S. A. W., Fitzgerald, S. D., and McGuire, W. L. (1990) A simple polymerase chain reaction method for detection and cloning of low-abundance transcripts. *BioTechniques*, 2, 206-210.

Ganga, M.A., Gonzalez, M., López-Lastra, M. , and Sandino, A.M. (1994) Polyacrylamide gel electrophoresis of viral genomic RNA as a diagnostic method for infectious pancreatic necrosis virus. *J. Virol. Methods* (en prensa).

Gouvea, V., Allen, J. R., Glass, R. I., Fang, Z., Bermont, M., Cohen, J., McCrae, M. A., Salf, L. J., Sinarachatanant, P., and Caul, E. O. (1991) Detection of group B and C rotaviruses by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 26, 519-523.

Hattori, M., Kodama, H., Ishiguro, S., Honda, A., Mikami, T., Izawa, H. (1984) In vitro and in vivo detection of infectious pancreatic necrosis virus in fish by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Vet. Res.* 9, 1876-1879.

Havarstein, L. S., Kalland, K. H., Chistie, K. E. and Enderesen, C. (1990) Sequence of the large double-stranded RNA segment of the N1 strain of infectious pancreatic necrosis virus : A comparison with other Birnaviridae. *J. Gen. Virol.* 71, 299-308.

Hébert, B., Bergeron, J., Potworowski, E. F., and Tijssen, P. (1993) Increased PCR sensitivity by using paraffin wax as a reaction mix overlay. *Molec. Cell. Probes* 7, 249-252.

Hedrick, R. P., Eaton, W. D., Fryer, J. L., Hah, Y. C., Park, J.W., and Hong, S. W. (1985) Biochemical and serological properties of birnaviruses isolated from fish in Korea. *Fish pathol.*, 20, 463-468.

Hedrick, R. P., Fryer, J. L., Chen, S. N., and Kou, G. H. (1983) Characteristics of four birnaviruses isolated from fish in Taiwan. *Fish Pathol.* 18, 91-97.

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

Herring, A.J., Inglis, N.F., Ojeh, C.K., Snodgrass, D.R., Menzies, J.D. (1982) Rapid diagnosis of viral nucleic acid in silver stained polyacrylamide gels, *J. Clin. Microbiol.*, 18, 473-477.

Hsu, Y. L., Chiang, S. Y., Lin, S. T. and Wu, J. L. (1989) The specific detection of infectious pancreatic necrosis virus in infected cells and fish by immuno dot blot method. *J. Fish Dis.*, 12, 561-571.

Hsu, Y. L., Chen, B. S., and Wu, J. L. (1993) Demonstration of infectious pancreatic necrosis virus strain VR-299 in Japanese eel, *Anguilla japonica* Temminck & Schlegel. J. Fish Dis., 16, 123-129.

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

Kwok, S., and Higuchi, R. (1989) Avoiding false positives with PCR. Nature (London) 339, 237-238.

Kudo, S., Kurosawa, D., Kunimeni, I., Nobusawa, K. and Kobayashi, S. (1973) Electron microscopic observation of pancreat and liver in fingerling rainbow trout with symptoms of IPN. Jpn. J. Ichthyol., 20, 163-177.

Kusuda, R., Nishi, Y., Hosono, N., Suzuki, S. (1993) Serological comparison of birnaviruses isolated from several species of marine fish in south west Japan. Gyobyo kenkyu, 28, 91-92.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London), 227, 680-685.

Lannan, C. N., Winton, J. R. and Fryer, J. L. (1984) Fish cell lines : Establishment and Characterization of nine cell lines from salmonids. In Vitro, 20, 671-676.

Li, H., Gyllensten, U.B., Cui, X., Saiki, R.K., Erlich, H.A., and Arnheim, N. (1988) Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. Nature (London), 335, 414-417.

Lawrence, W.R., Nagy, E., Duncan, R., Krell, P., and Dobos, P. (1989) Expression in *Escherichia coli* of the major outer capsid protein infectious pancreatic necrosis virus. Gene 79, 369-374.

MacDonald, R. D. and Gower, D. A. (1981) Genomic and phenotypic divergence among three serotypes of aquatic birnavirus (Infectious pancreatic necrosis virus). Virol., 114, 187-195.

MacDonald, R. D., Moore, A.R. and Souter, B. W. (1983) Three new strains of infectious pancreatic necrosis virus isolated in Canada. *Can. J. Microbiol.*, 29, 137-141.

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

MacDonald, R. and Yamamoto, T. (1977) The structure of infectious pancreatic necrosis virus RNA. *J. Gen. Virol.* 34, 235-247.

Mahbubani, M. H., Bej, A. K., Miller, R. D., Atlas, R. M., DiCesare, J. L., and Haff, L. A. (1991) Detection of bacterial mRNA using polymerase chain reaction. *BioTechniques*, 1, 48-49.

Mangan, J. A., and Butcher, P. D. (1993) Running AMOC with SuperScript™ II reverse transcriptase. *Focus* 3, 67-69.

Mangunwiryo, H., and Agius, C. (1988) Studies on the carrier state of infectious pancreatic necrosis virus infections in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Dis.*, 11, 125-132.

Maniatis, T., Sambrook, J., Fritsch, E.F. (1982) *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Mardones, A. (1993) Ovas, alevines y smolts de salmones: las necesidades de Chile. *Aquanoticias Internacional* 18, 6-15.

McAllister, P. E., (1988) Infecciones Víricas de peces cultivados. En : J. Espinosa de los Monteros, J. y Labarta, U. (ed) *Patología en Acuicultura* : 83-107. Industrias Gráficas España, S.L.

McAllister, P. E., and Owens, W. J. (1992) Recovery of infectious pancreatic necrosis virus from the faeces of wild piscivorous birds. *Aquaculture*, 106, 227-232.

McAllister, P. E. and Reyes, X. (1984) Infectious pancreatic necrosis virus: Isolation from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, imported into Chile. J. Fish Dis., 7,319-322.

Mertens, P. P. C., Jamieson, P.B. and Dobos, P. (1982) In vitro RNA synthesis by Infectious pancreatic necrosis virus-associated RNA polimerase. J. Gen. Virol. 59, 47-56.

Nash, M. (1991) Ultimate gene machine. Time, August 12, 54-56.

Nicholson, B., and Caswell, P. (1982) Enzyme- linked immunosorbent assay for identification of of infectious pancreatic necrosis virus., Journal of Clinical Microbiology, 16, 469-472.

Novoa, B., Figueras, A., Puentes, C.F., Ledo, A., and Toranzo, A.E. (1993) Characterization of a birnavirus isolated from diseased turbot cultured in Spain. Dis. Aquat. Org., 15, 163-169.

Novoa, B., Toranzo, A.E., Dopazo, C.P., Barja, J.L., and Figueras, A. (1993) Isolation of IPN virus serotype VR-299 from turbot in Europe. Dis. Aquat. Org., 17, 61-65.

Ortega, C., Planas, E., Docando, J., Múzquiz, J. L., Alonso, J. L., Simón, M. C. (1993) Epidemiological risk factors affecting the presentation of viral agents in freshwater aquaculture in north-eastern spain. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 13, 154-157.

Ou, C-Y., Moore, J.L., and Schochetman, G. (1992) Use of UV irradiation to reduce false positivity in polymerase chain reaction. BioTechniques 10, 442-444.

Pilcher, K. S. and Fryer J. L. (1980) The viral diseases of fish : A review th.ough 1978. CRC Critical Rev. Microbiol. , 7, 287-364.

Prince, M. A., and Andrus, L. (1992) PCR : How to kill unwanted DNA. BioTechniques 3, 358-360.

Reynolds, R., and Sensabaugh, G. (1991) Analysis of genetic markers in forensic DNA samples using the polymerase chain reaction. Anal. Chem. 1, 2-15.

Rivas, C., Cepeda, C., Dopazo, C.P., Novoa, B., Noya, M., and Barja, J.L. (1993) Marine environment as reservoir of birnaviruses from poikilothermic animals. *Aquaculture*, 115, 183-194.

Rodák, L., Pospíšil, Z., Tománek, J., Veselý, T., Obr, T. and Valíček, L. (1988) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in culture fluid and tissue homogenates of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Dis.*, 11, 225-235.

Rodríguez, S., Vilas, P., Palacios, M. A., and Pérez, S. (1991) Detection of infectious pancreatic necrosis in a carrier population of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Richardson), by flow cytometry. *J. Fish Dis.*, 14, 545-553.

Ruano, G., Brash, D. E., Kidd, K.K. (1991) PCR: The first few cycles. *Amplifications* 7, 1- 4.

Saiki, R. K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K.B., and Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487-491.

Samil, D. M., Munro, A. L. S. (1989) The virology of teleosts. En : Roberts R. J. (ed) *Fish Pathol.* : 153-241. Baillière Tindall.

Sanjuan, M.L., Yus, E., Simarro, I., Castro, J. M., Fernández, G., and Solana, A. (1993) The polypeptides of infectious pancreatic necrosis virus isolated from salmonid fish in Spain. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathool.* 13, 150-153.

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

Sarkar, F.H., Li, Y-W, Ball, D.E., and Crissman, J.D. (1992) Comparative method for detection of RNA-PCR-amplified signals. *BioTechniques*, 1, 23-26.

Severini, G.M., Mestroni, L., Falaschi, A., Camerini, F., and Giacca, M. (1993) Nested polymerase chain reaction for high-sensitivity detection of enteroviral RNA in biological samples. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 1345-1349.

Stephens, E. B. and Hetrick, F. M. (1983) Molecular characterization of infectious pancreatic necrosis virus isolated from a marine fish. En: Croso, J. H. (ed) *Bacterial and Viral Diseases of Fish* : 72-86. A Washington Sea Grant Publication.

Vogels, W. H. M., Van Voorst Vader, P. C., and Schöder, F. P. (1993) *Chlamidia trachomatis* infection in high-risk population : Comparison of polymerase chain reaction and cell culture for diagnosis and follow-up. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 1103-1107.

Wages, J. M., Dolenga, L., and Fowler, A. K. (1993) Electrochemiluminescent detection and quantitation of PCR-amplified DNA. *Amplifications* **10**, 1-9.

Weyant, R.S., Edmonds, P., Swaminathan, B. (1990) Effect of ionic and nonionic detergents on the Taq polymerase. *BioTechniques*, **3**, 308-309.

Wolf, K. (1988) Infectious Pancreatic Necrosis. En: Comstock Publishing Associate (ed) *Fish Viruses and Fish Viral Diseases* : 115-157. Cornell University Press.

