



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**PATOGENIA DEL VIRUS DE LA NECROSIS PANCREÁTICA INFECCIOSA**

**TESINA**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**PRESENTA**

**ALBA ASTRIL PÉREZ LOZANO**

**ASESORES:**

**Dra. en C. CELENE SALGADO MIRANDA**

**Dr. en C. EDGARDO SORIANO VARGAS**

**Dr. en C. MARTÍN TALAVERA ROJAS**



**TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO, AGOSTO 2018.**

## **DEDICATORIA**

Este trabajo está dedicado especialmente a mis padres, a mis hermanos y a todas esas personas que siempre creyeron y nunca perdieron la fe en que yo lo podría lograr, gracias por todo el apoyo que me han brindado a lo largo de todos estos años; a pesar de los problemas y las dudas que se me presentaron, sin importar nada he salido adelante y ahora soy o que soy por ustedes, gracias a su apoyo incondicional. Ahora soy una profesionalista lista para seguir superándome día a día.

Muchas gracias por todo, los amo.

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias a mis asesores Dr. en C. Edgardo Soriano Vargas, Dr. en C. Martín Talavera Rojas por toda la ayuda brindada hacia mí y mi trabajo, por sus conocimientos y su tiempo, pero en especial a Dra. en C. Celene Salgado Miranda que me aguantó todo este tiempo, por la gran ayuda, todos los conocimientos que me brindó con mucha paciencia para poder elaborar este trabajo, por todas las atenciones que tuvo conmigo en cada momento sin importar la situación.

Gracias a la Universidad Autónoma del Estado de México por haberme permitido formar parte de ella, por su atención brindada durante mi vida en la licenciatura.

Gracias a mi hermosa Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por todos los conocimientos transmitidos durante cinco largos años, a pesar de las piedras en el camino pude salir adelante con mucho esfuerzo y perseverancia.

## TÍTULO

Patogenia del virus de la necrosis pancreática infecciosa.



## **FINANCIAMIENTO**

La presente tesina forma parte del proyecto “Serotificación y virulencia de aislados mexicanos del virus de la necrosis pancreática infecciosa”, financiado por CONACYT, CB-257781, con registro interno 4226/2016C; responsable técnico Dra. en C. Celene Salgado Miranda.

## ABREVIATURAS Y SIGLAS

A	Año
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNds	ARN bicatenario
ARNm	ARN mensajero
AS	<i>Atlantic salmon</i>
BB	<i>Bullhead Brown</i>
BCR	Receptor de la linfocito B
BF	<i>Bluegill Fry</i>
BSNV	<i>Blotched snakehead virus</i>
CCT	<i>Cyprinus Carpio Testis</i>
CHSE	<i>Chinook Salmon Embryo</i>
CL	<i>Channa Lucius</i>
cm	Centímetro
CSE	<i>Coho Salmon Embryo</i>
D	Día
Da	Dalton
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EPC	<i>Epithelioma Papulosum Cyprini</i>
EUA	Estados Unidos de América
FHM	<i>Fathead Minnow</i>
GMP	Guanosín monofosfato
HO	Hora
IBD	<i>Infectious Bursal Disease</i>
IgM	Inmunoglobulina M
IL	Interleuquinas
INEM-1	<i>INconnu EMbryonic-1</i>
INF	Interferón

INM	Inmersión
IP	Intraperitoneal
kDa	kiloDalton
KO-6	<i>Kokanee Ovary-6</i>
ME	Mes
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MK	<i>Menhaden Kidney</i>
ml	Mililitro
mm	Milímetro
Nm	Nanómetro
NOM	Norma Oficial Mexicana
NPI	Necrosis pancreática infecciosa
NR	No reportado
°C	Grado Celsius
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
OMAKA	Línea procedente de larvas del pez marino <i>Caranx mate</i> , comúnmente conocido en Hawái como el Omaka
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
Pb	Pares de bases
PESC	Pesca
pfu/ml	Unidades formadoras de placa por mililitro de muestra
PG	<i>Fibroblastic line from ovaries of juvenile pike (Esox lucius)</i>
Pr	Sujetas a protección especial
PROY	Proyecto
RdRp	ARN polimerasa dependiente de ARN
RF	Radiofrecuencia
RT-PCR	<i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>
RTG-2	<i>Rainbow Trout Gonad</i>
S	<i>svedbergs</i>

SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SC	Subcutáneo
SE	Semana
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
SJU-1	Línea continua de células somáticas de <i>Carassius auratus</i>
Sp	<i>Spjarup</i>
SSE-5	<i>Sockeye Salmon Embryo-5</i>
STE-137	<i>Steelhead Embryo-137</i>
T	Triangulación
TCR	Receptor de linfocitos T
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
TO-2	Línea celular epiteliode de ovario de una tilapia adulta híbrida ( <i>Tilapia mossambica</i> $\times$ <i>T. nilotica</i> )
UFT	Ultrafiltración de flujo tangencial
UMA	Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre
VCSM	Virus cabeza de serpiente manchado
VDX	Virus Drosophila X
VEIB	Virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa
VMT	Virus del mosaico del tabaco
VNPI	Virus de la necrosis pancreática infecciosa
VP	Viral protein
VP1	Viral protein 1
VP2	Viral protein 2
VP3	Viral protein 3
VPg	Proteína viral ligada al genoma
VSMB	Virus del síndrome de la mancha blanca
WC-1	<i>Walleye, cancer cell line</i>

## RESUMEN

El virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI) es el agente causal de la enfermedad conocida como necrosis pancreática infecciosa (NPI). De manera natural los salmónidos son los peces más susceptibles. El curso agudo de la enfermedad puede provocar una mortalidad hasta del 100% en salmónidos jóvenes. En las truchas, la susceptibilidad a la enfermedad disminuye con la edad. Los peces infectados transmiten el virus por vía horizontal y vertical, esto promueve que el virus se encuentre de forma continua en el agua y que infecte a otros peces. Al alcanzar los 1500 grados-día (valor que se obtiene multiplicando los días de edad de los peces, por el promedio de la temperatura en grados Celsius durante su esperanza de vida), los peces resisten más a la enfermedad. Los signos clínicos que presentan los peces afectados por el VNPI son: anorexia, ataxia, hiperventilación, obscurecimiento de piel (hiperpigmentación), hemorragias en áreas ventrales y aletas. Con base en esto, un pez puede estar infectado mas no enfermo, y un pez enfermo sí está infectado. Por la complejidad del proceso salud - enfermedad, Casadevall y Pirofski propusieron una nueva teoría de la patogenia microbiana, empleando modelos de microorganismos patógenos en los humanos. Esto nos lleva a revisar los conceptos propuestos por estos autores, haciendo énfasis en modelos de patógenos importantes en el área de la Medicina Veterinaria. En nuestro país, el virus de la necrosis pancreática infecciosa fue reportado en 2002 y afecta principalmente a truchas jóvenes de unidades de producción intensiva. El virus ha sido aislado en unidades de producción trutícola de las siguientes entidades: México, Hidalgo, Morelos, Michoacán, Puebla, Chihuahua, Durango y Veracruz. Conocer la patogenia microbiana del único virus identificado y confirmado hasta ahora en la truticultura nacional es de vital importancia.

Palabras clave: patogenia microbiana, VNPI, trucha arcoíris.

## ABSTRACT

The infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) is the causative agent of the disease known as infectious pancreatic necrosis (IPN). Naturally, salmonids are the most susceptible fish. The acute course of the disease can cause a 100% mortality in young salmonids. In trout, susceptibility to disease decreases with age. The infected fish transmit the virus horizontally and vertically, this causes the virus to be continuously in the water and to infect other fish. At 1500 degrees-day (value that can be multiplied by life expectancy), fish resist disease. The signs shown by the fish affected by IPNV are anorexia, ataxia, hyperventilation, skin darkening, hemorrhages in ventral areas and fins. Based on this information, a person may be infected without a single child and a sick person sick of being infected. Due to the complexity of the health process, Casadevall and Pirofski proposed a new theory of microbial pathogenesis, using models of pathogenic microorganisms in humans. This leads us to review the concepts proposed by these authors, emphasizing models of important pathogens in the area of Veterinary Medicine. In particular, the infectious pancreatic necrosis virus causes an infectious disease that mainly affects young salmonids from intensive production units. This virus has been reported in our country since 2002 and has production units in: State of Mexico: Hidalgo, Morelos, Michoacán, Puebla, Chihuahua, Durango and Veracruz; therefore, know the microbial pathogenesis of the single virus confirmed so far at the mexican culture fish production, is of vital importance.

Key words: damage-response framework, IPNV, rainbow trout.

## ÍNDICE

	Página
INTRODUCCIÓN.....	1
JUSTIFICACIÓN.....	4
OBJETIVO.....	5
MATERIAL.....	6
MÉTODO.....	7
LÍMITE DE ESPACIO.....	9
LÍMITE DE TIEMPO.....	10
REVISIÓN DE LITERATURA.....	11
I. PATOGENIA MICROBIANA.....	11
1.1 INFECCIÓN.....	12
1.2 PATOGÉNESIS O PATOGENIA.....	12
1.3 VIRULENCIA.....	12
II. INTERACCIÓN HOSPEDERO Y MICROORGANISMO.....	14
2.1 HOSPEDEROS DEL VIRUS DE LA NECROSIS PANCREÁTICA INFECCIOSA.....	14
2.2 VIRUS DE LA NECROSIS PANCREÁTICA INFECCIOSA.....	21
III. RESULTADO PATOLÓGICO EN EL HOSPEDERO.....	36
3.1 SIGNOS CLÍNICOS.....	36
3.2 HALLAZGOS MACROSCÓPICOS.....	40
3.3 HALLAZGOS MICROSCÓPICOS.....	41
3.4 DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DE LA NECROSIS PANCREÁTICA INFECCIOSA.....	42
3.5 MEDIDAS DE CONTROL DEL VIRUS DE LA NECROSIS PANCREÁTICA INFECCIOSA.....	44
IV. FACTORES MICROBIANOS Y RESPUESTA INMUNE DEL HOSPEDERO.....	45
4.1 FACTORES DE VIRULENCIA DEL VIRUS DE LA NECROSIS PANCREÁTICA INFECCIOSA.....	45
4.2 NATURALEZA DEL DAÑO: RESPUESTA INMUNE DEL HOSPEDERO.....	52

V. TRUTÍCULTURA MEXICANA .....	62
5.1. LA PRODUCCIÓN DE TRUCHA ARCOÍRIS.....	62
5.2. EL VIRUS DE LA NECROSIS PANCREÁTICA INFECCIOSA EN MÉXICO.....	63
CONCLUSIONES .....	65
LITERATURA CITADA .....	67



## ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

	Página
<b>FIGURAS</b>	
Figura 1. Diagrama de un birnavirus. . . . .	24
Figura 2. Mapa genómico del virus de la necrosis pancreática infecciosa. .	25
Figura 3. Microfotografía de la línea celular CHSE-214. . . . .	29
Figura 4. Microfotografía de la línea celular CHSE-214 con efecto citopático.	32
Figura 5. Hiperpigmentación en trucha arcoíris al día ocho posterior a la infección con el VNPI. . . . .	39
Figura 6. Exoftalmia en cría de trucha arcoíris al día ocho posterior a la infección con el VNPI. . . . .	39
Figura 7. Hígado pálido en trucha arcoíris al día ocho posterior a la infección con el VNPI. . . . .	40
Figura 8. Microfotografía de las células de los acinos del páncreas. . . . .	42
Figura 9. Inmunofluorescencia indirecta del VNPI a las 24 horas posteriores a la inoculación de un monocultivo de células CHSE-214. . . . .	43
Figura 10. Identificación del virus de la necrosis pancreática infecciosa en países y continentes. . . . .	50
Figura 11. Órganos linfoides de un pez teleósteo. . . . .	53
<b>CUADROS</b>	
Cuadro 1. Organismos acuáticos de los que se han aislado birnavirus. . . . .	14
Cuadro 2. Líneas celulares continuas de peces teleósteos en las cuales se han propagado los birnavirus. . . . .	27
Cuadro 3. Clasificación serológica de los VNPI. . . . .	33
Cuadro 4. Virulencia de birnavirus acuáticos en infecciones experimentales realizadas en hospederos homólogos y heterólogos . . . . .	36



## INTRODUCCIÓN

La comprensión de la interacción de un microorganismo con un hospedero en el proceso salud-enfermedad, es determinante para la implementación de medidas de prevención y control eficaces. El virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI) es el agente etiológico de una enfermedad de distribución mundial, la cual causa grandes pérdidas económicas particularmente en los salmónidos (Wolf, 1988; OIE, 2006). El VNPI pertenece a la familia *Birnaviridae* (Fauquet *et al.*, 2005). Es un virus de ARN (ácido ribonucleico), en forma de icosaedro, sin envoltura y tienen un diámetro aproximado de 60 a 64 nm. La cápside consta de 180 subunidades estructurales compartidas entre 132 capsómeros en la superficie del virión con un número de triangulación (T) de 13 (Ozel y Gelderblom, 1985; Rodríguez *et al.*, 2003).

La trucha de fontana (*Salvelinus fontinalis*) es la más susceptible a los efectos letales del VNPI, seguida por la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y el salmón del Atlántico (*Salmo salar*), también se ha visto que el virus afecta a otras especies marinas predisponiendo a otras enfermedades (Salgado-Miranda, 2006). Otros organismos son llamados reservorios del virus y pueden cohabitar con los peces en cultivo susceptibles al VNPI, entre estos podemos encontrar a: peces silvestres, ectoparásitos, moluscos, plancton, crustáceos, aves y mamíferos (Evensen *et al.*, 2003). La susceptibilidad de los peces, al efecto del virus, disminuye con la edad; resistiendo a la enfermedad clínica al alcanzar aproximadamente 1500 grados-día (valor que se obtiene multiplicando los días de edad de los peces, por el promedio de la temperatura en grados Celsius durante su esperanza de vida) (Dorson y Torchy, 1981). Los alevines son los principales afectados por el virus, los sobrevivientes a la enfermedad de la necrosis pancreática infecciosa, se convierten en portadores del virus de por vida (Dobos, 2001). Los peces infectados pueden transmitir el virus de manera horizontal y vertical. Los virus entran a la célula por endocitosis (Couve *et al.*, 1992). Los virus se replican en el citoplasma de las

células, produciendo efecto citopático (Rodríguez *et al.*, 2003). Los signos que muestran los peces afectados por el VNPI son: anorexia, ataxia, hiperventilación, obscurecimiento de piel (hiperpigmentación), hemorragias en áreas ventrales y aletas (Wolf, 1988; Rodríguez *et al.*, 2003; Roberts y Pearson, 2005). También se observa comportamiento natatorio horizontal, el pez se encuentra en la parte inferior del estanque, respiración acelerada, exoftalmia moderada, distención abdominal, branquias pálidas y heces blanquecinas (Dobos, 2001). La enfermedad produce mortalidades acumuladas que varían de menos del 10% a más del 90%, dependiendo de la combinación de diversos factores (incluyendo la cepa y la cantidad de virus, el hospedero y el ambiente) (Wolf, 1988). Se conoce una amplia variedad de líneas celulares tanto de peces salmónidos como no salmónidos, en las cuales el VNPI tienen la capacidad de replicarse y provocar un efecto citopático característico (Malsberger y Cerini, 1965; Kelly *et al.*, 1978; Nicholson *et al.*, 1979; Dorson, 1983). El VNPI resiste un amplio rango de salinidad y temperatura, incluso puede permanecer viable durante varias semanas a 40 °C en agua dulce y hasta cuatro meses en agua salada. Esto explica su capacidad de transmisión tanto por reservorios vivos como inanimados (Mortensen *et al.*, 1998). La respuesta inmune en los peces se ve afectada por factores que dependen del propio organismo (factores intrínsecos) y factores ambientales (extrínsecos). A la fecha, no hay una estrategia de control específica para el VNPI. Ha funcionado la eliminación de todos los peces infectados con el virus, así como vaciar y desinfectar los estanques de cultivo (Dobos, 2001). La infectividad del virus puede reducirse en contacto con algunos agentes desinfectantes: yodo, cloro, ozono y formalina (Economon, 1973).

En México, el cultivo de trucha arcoíris inició a finales del siglo XIX en el primer vivero natural en Chimela, Lerma, Estado de México. En 1937, se formalizó la reproducción de la especie con la creación de un centro piscícola en Salazar, Lerma, el cual en 1943 se convirtió en el centro acuícola El Zarco (SAGARPA, 2013). En México, el VNPI fue aislado por primera vez en el 2001 a partir de crías de trucha arcoíris (*O. mykiss*) importadas de los Estados Unidos de América (EUA)

(Ortega *et al.*, 2002). A la fecha, el VNPI se ha reportado en las siguientes entidades: México, Hidalgo, Morelos, Michoacán, Puebla, Chihuahua, Durango y Veracruz (Ortega *et al.*, 2013).

Es importante resaltar que en ambientes silvestres, la trucha arcoíris (*O. mykiss*) se encuentra incluida en la NOM-059-SEMARNAT-2010, como especie “sujeta a protección especial” (Pr), regulación a cargo de la SEMARNAT, a través de la Dirección General de Vida Silvestre, y su manejo y aprovechamiento sustentable sólo puede ser a través de Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) y deberá sujetarse a lo dispuesto en la Ley General de Vida Silvestre y su Reglamento (SAGARPA, 2012b), por lo que es primordial su protección. A partir de un análisis sobre el desarrollo de la producción de trucha arcoíris en la zona centro de México, se concluye que la producción de trucha es un caso de éxito, proporciona un producto de alto valor económico y nutricional, y permite diversificar las actividades productivas de comunidades rurales (García-Mondragón *et al.*, 2013). Por lo antes mencionado, conocer la patogenia microbiana del único virus reportado hasta ahora en la truticultura de México, es de vital importancia.

## JUSTIFICACIÓN

El virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI) es un agente de gran importancia en la truticultura nacional e internacional; ya que este virus afecta principalmente a los alevines y crías, provocando la muerte de éstos e impacta en la producción con grandes pérdidas económicas. En el 2001, se identificó en México la presencia del VNPI, a partir de crías de trucha arcoíris importadas de los Estados Unidos de América, las cuales fueron movilizadas a unidades de producción trutícola, localizadas en varias entidades federativas del país. A partir de entonces, el VNPI ha sido aislado de truchas arcoíris procedentes de varias unidades de producción acuícola de las principales entidades federales en las que se cultiva la especie. Una de las mayores pérdidas registradas en México, fue la eutanasia del total de los organismos reproductores de trucha arcoíris del centro acuícola El Zarco. A un total de 16,339 especímenes se les practicó la eutanasia, significando una biomasa de 12,437 kilogramos. Asimismo, con el objetivo de eliminar el VNPI del centro acuícola, se realizó la limpieza, desinfección y remodelación de sus instalaciones, ya que el VNPI, se disemina por medio de las heces y gametos sexuales. Por todo lo mencionado, abordar, conocer y describir la patogenia del virus de la necrosis pancreática infecciosa, con base en la teoría respuesta – daño; propuesta por Casadevall y Pirofski, permitirá comprender la interacción entre el hospedero y el agente causal, en el establecimiento de la infección y el desarrollo de la enfermedad. Esta información puede servir de base para establecer el tipo de diagnóstico a realizar, así como contribuir en las estrategias de prevención y control de la enfermedad en la truticultura nacional.

## **OBJETIVO**

Describir la patogenia del virus de la necrosis pancreática infecciosa, con base en la teoría respuesta – daño, propuesta por Casadevall y Pirofski.

## **MATERIAL**

Para la escritura del documento la información fue obtenida de: artículos científicos publicados en revistas indexadas en JCR (por sus siglas en inglés: *Journal Citation Report*), en SciELO, en el índice de revistas mexicanas de ciencia y tecnología de CONACYT, y en libros especializados.

El documento fue capturado en una aplicación informática orientada al procesamiento de textos y posteriormente impreso.



## MÉTODO

Se realizó una búsqueda bibliográfica y hemerográfica sistemática de la información publicada sobre la teoría respuesta – daño del virus de la necrosis pancreática infecciosa, con base en la siguiente metodología:

### **Bases de datos**

Las bases de datos que se consultaron para la búsqueda de la información fueron: Web of Science, con acceso a la base de datos Science Citation Index e Index Chemicus, PubMed con acceso a la base de datos MEDLINE y SciELO (*Scientific Electronic Library Online*).

### **Descriptores o palabras clave**

La búsqueda de artículos fue por medio de las siguientes palabras clave en inglés: *virus, infectious pancreatic necrosis, fish, salmonid, rainbow trout, microbial pathogenesis, pathogen, host, disease, IPNV, pathogenesis y virulence*, en español: virus, necrosis pancreática infecciosa, peces, salmónidos, trucha arcoíris, agente infeccioso, patogenia microbiana, patógeno, hospedero, enfermedad, VNPI, patogénesis y virulencia.

### **Operadores booleanos**

Para definir la interacción entre las palabras clave y determinar las condiciones de la búsqueda de información en las bases de datos, se utilizaron los operadores booleanos en inglés y en español: and (y), or (o) y not (no), respectivamente.

### **Recolección, clasificación, lectura y análisis de la bibliografía**

Para la escritura del documento, la bibliografía recopilada fue clasificada, ordenada, leída y analizada. La información publicada, se ordenó de la siguiente manera: virus de la necrosis pancreática infecciosa, daño reportado en los

hospederos, así como la respuesta del hospedero ante el agente.

**Contenido de la tesina, con base en la teoría respuesta – daño del virus de la necrosis pancreática infecciosa**

Con base en que la teoría de la respuesta – daño de la patogenia microbiana, que se basa en: a) la patogenia microbiana es resultado de la interacción entre un hospedero y un microorganismo, b) el resultado patológico en el hospedero, debido a la interacción hospedero-microorganismo, se determina por la cantidad de daño producida en el hospedero, y c) el daño en el hospedero resulta de factores microbianos y de la respuesta inmune del hospedero (Casadevall y Pirofski, 2003); la información recabada, fue ordenada y presentada bajo la siguiente estructura:

Capítulo I. Patogenia microbiana.

Capítulo II. Interacción hospedero y microorganismo.

Capítulo III. Resultado patológico en el hospedero.

Capítulo IV. Factores microbianos y respuesta inmune del hospedero.

Capítulo V. Truficultura mexicana.

## **LÍMITE DE ESPACIO**

El trabajo se llevó a cabo, en los espacios académicos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México y en la biblioteca y hemeroteca de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.

## LÍMITE DE TIEMPO

El presente trabajo se llevó a cabo a partir del mes de febrero de 2017 a agosto de 2018. A continuación el cronograma de actividades.

### CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

<b>ACTIVIDAD</b>	<b>FECHA</b>
Búsqueda de información bibliográfica y hemerográfica	Febrero 2017 a abril 2018
Lectura y análisis de la información	Marzo 2017 a abril 2018
Elaboración de protocolo	Mayo a julio 2017
Revisión y aceptación de protocolo	Agosto y septiembre 2017
Escritura de documento final	Octubre 2017 a mayo 2018
Aceptación de documento final	Junio a agosto 2018

## REVISIÓN DE LITERATURA

### I. PATOGENIA MICROBIANA

En 2003, Casadevall y Pirofski propusieron una nueva teoría de la respuesta - daño de la patogenia microbiana, empleando modelos de microorganismos patógenos en los humanos (Casadevall y Pirofski, 2003).

Un patógeno se describe como el microorganismo que tiene la capacidad de producir un daño en el hospedero (Casadevall y Pirofski, 2002). En 1958, Harry Wain, definió el significado de virulencia; que deriva del latín *virulentus* y que significa lleno de veneno, *virus* (veneno) y *lentus* (plenitud) (Casadevall y Pirofski, 2001). De forma constante, ha habido confusión para definir con exactitud el significado de virulencia y actualmente se considera una propiedad microbiana, pero que se expresa sólo en hospederos susceptibles (Casadevall y Pirofski, 2001). Los patógenos tienen diferente grado de virulencia; por lo que la virulencia, es la capacidad relativa de un microorganismo de causar daño en un hospedero (Soriano-Vargas *et al.*, 2006).

Las características microbianas incluyen la patogenicidad del microorganismo, la capacidad de superar el sistema inmunológico del hospedero, la severidad de la enfermedad que causa, el porcentaje de muertes inducidas, su infectividad o daño inducido y su capacidad para crecer y multiplicarse en el hospedero (Casadevall y Pirofski, 2001).

La teoría de la respuesta - daño de la patogenia microbiana, se basa en: a) la patogenia microbiana es resultado de la interacción entre un hospedero y un microorganismo, b) el resultado patológico en el hospedero, debido a la interacción hospedero-microorganismo, se determina por la cantidad de daño producida en el hospedero, y c) el daño en el hospedero resulta de factores microbianos y de la

respuesta inmune del hospedero (Casadevall y Pirofski, 2003). De acuerdo con las evidencias clínicas y experimentales en la relación hospedero-microorganismo, Casadevall y Pirofski (2003), ponen a prueba esta teoría, que debe ser considerada también en el campo de las ciencias veterinarias (Soriano-Vargas *et al.*, 2006).

### **1.1 INFECCIÓN**

De acuerdo con las definiciones propuestas por Casadevall y Pirofski, la infección es el establecimiento de un microorganismo (virus, bacteria, hongo o parásito) en un hospedero (Casadevall y Pirofski, 1999; Casadevall y Pirofski, 2003).

### **1.2 PATOGÉNESIS O PATOGENIA**

Etimológicamente, la palabra patogénesis se deriva de dos palabras griegas: *πάθος*, *páthos*, sufrimiento y *γένεσις*, *génesis*, origen, y se pueden traducir como “el origen de la enfermedad”. Por lo tanto la patogénesis viral implica el proceso por el que un virus ocasiona una enfermedad en el hospedero. Es importante recordar que un virus ingresa y se replica en un hospedador, induce una respuesta inmune, y posteriormente, se observan signos clínicos en el organismo afectado. Para muchos virus, la mayoría de las infecciones, bajo circunstancias normales, son asintomáticas. La infección puede ser de corta duración y autolimitada (aguda), puede ser de duración prolongada (crónica), o persistir durante toda la vida del hospedador (Nathanson y Tyler, 2005).

Casadevall y Pirofski proponen la definición de microorganismo patógeno como aquél con la capacidad de producir daño en un hospedero. Esta capacidad es la patogénicidad (Soriano-Vargas *et al.*, 2006). Para Casadevall y Pirofski (2003), el daño lo clasifica en cinco niveles: molecular, celular, tisular, órgano y organismo.

### **1.3 VIRULENCIA**

La virulencia se define como la capacidad relativa de un microorganismo de causar daño en un hospedero. La virulencia no puede ser considerada variable

independiente, ya que sólo se expresa en un hospedero susceptible (Casadevall y Pirofski, 2002; Casadevall y Pirofski, 2003). La virulencia microbiana resulta de la interacción entre el hospedero y el microorganismo (Casadevall y Pirofski, 2003). Este último puede ser altamente virulento en un hospedero susceptible, pero de baja virulencia en un hospedero inmunizado contra ese microorganismo. Desde el punto de vista centrado en el patógeno dentro de la patogenia microbiana, las características del microorganismo, de manera particular, explican la virulencia (Casadevall y Pirofski, 1999). Sin embargo, en hospederos susceptibles se pueden observar diferencias en la virulencia de microorganismos de una misma especie o cepa (Soriano-Vargas *et al.*, 2006). Estas diferencias se deben a la expresión de diferentes factores de virulencia, que se definen como los componentes microbianos que pueden causar daño al hospedero (Casadevall y Pirofski, 2001). Un gen microbiano que codifica para estos componentes se llama gen de virulencia (Casadevall y Pirofski, 2003). El uso de una terminología precisa en la patogenia microbiana y en las enfermedades infecciosas favorece la comprensión de patogenicidad y virulencia, su aplicación en las enfermedades que afectan a los animales es esencial para establecer las medidas o estrategias para la prevención y control adecuadas ante la interacción del microorganismo con su hospedero (Soriano-Vargas *et al.*, 2006).

## II. INTERACCIÓN HOSPEDERO Y MICROORGANISMO

### 2.1 HOSPEDEROS DEL VIRUS DE LA NECROSIS PANCREÁTICA INFECCIOSA

#### 2.1.1 Hospederos naturales

Los peces salmónidos son principalmente los más susceptibles de manera natural ante el virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI). La trucha de fontana (*Salvelinus fontinalis*) es la más susceptible a los efectos letales del VNPI, seguida por la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y el salmón del Atlántico (*Salmo salar*), también ha sido aislado a partir de la trucha alpina (*Salvelinus alpinus*), trucha café (*Salmo trutta*) y la trucha de lago (*Salvelinus namaycush*) (Salgado- Miranda, 2006).

También se han aislado a partir de peces no salmónidos importantes en la acuicultura marina, como: rodaballo (*Scophthalmus maximus*) (Mortensen *et al.*, 1993; Novoa *et al.*, 1995), lenguado (*Solea senegalensis*) (Perez-Priteo *et al.*, 2001) y fletán o halibut del Atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*) (Rodger y Frerichs, 1997; Gahlawat *et al.*, 2004), lucio (*Esox lucius*) (Ahne, 1977), pez dorado (*Carasius auratus*), pez disco (*Symphysodon discus*) y brema común (*Abramis brama*) (Adair y Ferguson, 1981), anguila americana y europea (*Anguilla anguilla*) entre otros (Salgado-Miranda, 2006). A la fecha, el aislamiento del VNPI abarca clases como: Monogonta, Mollusca, Crustacea, Agnatha y Teleostei (Cuadro 1).

Cuadro 1. Organismos acuáticos de los que se han aislado birnavirus.

Clase	Familia	Género y especie	Nombre común	Referencia
Monogonta	(Orden) Ploimida	<i>Brachionus plicatilis</i>	Rotífero	Comps <i>et al.</i> , 1991
Mollusca	Veneridae	<i>Meretrix lusoria</i>	Almeja asiática dura	Lo <i>et al.</i> , 1991
	Corbiculidae	<i>Corbicula fluminea</i>	Almeja asiática de agua dulce	Håstein, comunicación



				personal (CABI, 2018)
	Patellidae	<i>Patella vulgata</i>	Lapa común	Hill <i>et al.</i> , 1982
	Littorinidae	<i>Littorina littorea</i>	bígaro común o caracolillo	Hill <i>et al.</i> , 1982
	Mytilidae	<i>Mytilus edulis</i>	Mytiloidea o mejillón	Hill <i>et al.</i> , 1982
	Ostreidae	<i>Crassostrea virginica</i>	Ostión de Virginia	Hill <i>et al.</i> , 1982
	Ostreidae	<i>C. gigas</i>	Ostión u ostra japonesa	Hill <i>et al.</i> , 1982
	Ostreidae	<i>Ostrea edulis</i>	Ostra europea	Hill <i>et al.</i> , 1982
	Tellinidae	<i>Tellina tenuis</i>	Tellina o coquina	Hill, 1976
	Veneridae	<i>Mercenaria mercenaria</i>	Spisula solidissima	Hill <i>et al.</i> , 1982
Crustacea	Portunidae	<i>Carcinus maenas</i>	Cangrejo de mar común o cangrejo verde europeo	Hill <i>et al.</i> , 1982
	Portunidae	<i>Macropipus depurator</i>	Cangrejo de Puerto	Hill <i>et al.</i> , 1982
	Penaeidae	<i>Penaeus japonicus</i>	Camarón japonés	Bovo <i>et al.</i> , 1984
Agnatha	Petromyzontidae	<i>Lampetra fluviatilis</i>	Lamprea	Munro <i>et al.</i> , 1976
Teleostei	Clupeidae	<i>Brevoortia tyrannus</i>	Brevoortia o lachas	Stephens <i>et al.</i> , 1980
	Clupeidae	<i>Dorosoma cepedianum</i>	Sábalo molleja	McAllister <i>et al.</i> , 1984
	Anguillidae	<i>Anguilla japonica</i>	Anguila japonesa	Sano <i>et al.</i> , 1981
	Anguillidae	<i>A. rostrata</i>	Anguila americana	McAllister <i>et al.</i> , 1984
	Anguillidae	<i>A. anguilla</i>	Anguila europea	Hudson <i>et al.</i> , 1981
	Esocidae	<i>Esox lucius</i>	Lucio norteño	Ahne, 1979
	Esocidae	<i>E. niger</i>	Lucio Cadena de pickerel	Ahne <i>et al.</i> , 1989
	Salmonidae	<i>Hucho hucho</i>	Grayling	Ahne <i>et al.</i> , 1989
	Salmonidae	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Trucha arcoíris	Parisot <i>et al.</i> , 1963
	Salmonidae	<i>O. keta</i>	Keta o salmón chum	Wolf, 1988
	Salmonidae	<i>O. kisutch</i>	Salmón del Pacífico, salmón coho o salmón plateado	Wolf y Pettijohn, 1970
	Salmonidae	<i>O. clarki</i>	Trucha degollada	Wolf, 1988
	Salmonidae	<i>O. tshawytschka</i>	Salmón real, chinuc o chinook	Wolf, 1988
	Salmonidae	<i>O. gorbuscha</i>	Salmón rosado	Wolf, 1988
	Salmonidae	<i>O. rhodurus</i>	Trucha Amago	Sano y Yamazaki, 1973

	Salmonidae	<i>Salvelinus fontinalis</i>	Trucha de manantial o trucha de arroyo	Hedrick <i>et al.</i> , 1986
	Salmonidae	<i>S. naymacush</i>	Trucha de lago	Mackelvie y Artsob, 1969
	Salmonidae	<i>S. alpinus</i>	Salvelino, trucha alpina o trucha ártica	Wolf, 1988
	Salmonidae	<i>Salmo salar</i>	Salmón del Atlántico	Mackelvie y Artsob, 1969
	Salmonidae	<i>S. trutta</i>	Trucha marrón o reo	Wolf <i>et al.</i> , 1960
	Salmonidae	<i>Thymallus thymallus</i>	Tímalo común	Wattanavijarn <i>et al.</i> , 1988
	Salmonidae	<i>Prosopium williamsoni</i>	Pescado blanco	Yamamoto y Kilistoff, 1979
	Channidae	<i>Ophicephalus striatus</i>	Pez cabeza de serpiente	Wattanavijarn <i>et al.</i> , 1988
	Cyprinidae	<i>Abramis brama</i>	Brema o plática	Hill <i>et al.</i> , 1982
	Cyprinidae	<i>Barbodes schwanefeldi</i>	Lengüeta	Ahne <i>et al.</i> , 1989
	Cyprinidae	<i>Blicca bjoerkna</i>	Brema blanca	Wolf <i>et al.</i> , 1960
	Cyprinidae	<i>Carassius auratus</i>	Carpín dorado, carpa dorada o mejor conocido como pez dorado	Hill <i>et al.</i> , 1982
	Cyprinidae	<i>C. ceratitsinis</i>	Carpa	Ahne <i>et al.</i> , 1989
	Cyprinidae	<i>C. carassius</i>	Carpa	Hill <i>et al.</i> , 1982
	Cyprinidae	<i>Chondrostoma nasus</i>	Nase común	Ahne <i>et al.</i> , 1989
	Cyprinidae	<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa común	Hill <i>et al.</i> , 1982
	Cyprinidae	<i>Gobio gobio</i>	Gobio	Ahne <i>et al.</i> , 1989
	Cyprinidae	<i>Oxyeleotris marmoratus</i>	Gobio de arena	Bonami <i>et al.</i> , 1983
	Cyprinidae	<i>Hampala dispar</i>	Hampala	Wattanavijarn <i>et al.</i> , 1988
	Cyprinidae	<i>Phoxinus phoxinus</i>	Dace del vientre rojo	Munro <i>et al.</i> , 1976
	Cyprinidae	<i>Rutilus rutilus</i>	Rutilo	Hill <i>et al.</i> , 1982
	Cyprinidae	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	Gardí	Ahne <i>et al.</i> , 1989
	Cyprinidae	<i>Barbus barbus</i>	Barbo común europeo	Ahne <i>et al.</i> , 1989
	Cyprinidae	<i>Brachydanio rerio</i>	Pez cebra o danio cebra	Ahne <i>et al.</i> , 1989
	Cobitidae	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	Dojo	Hill <i>et al.</i> , 1982
	Atherinidae	<i>Menidia menidia</i>	Sardina atlántica o pez blanco	Sorimachi y Hara, 1985
	Sciaenidae	<i>Leiostomus xanthurus</i>	Tambor o corvine	Sorimachi y Hara, 1985

	Carangidae	<i>Seriola quinqueradiata</i>	Cola amarilla	Chen <i>et al.</i> , 1984
	Cichlidae	<i>Symphysodon discus</i>	Pez disco	Sorimachi y Hara, 1985
	Cichlidae	<i>Tilapia mossambica</i>	Tilapia	Ahne <i>et al.</i> , 1989
	Percidae	<i>Perca fluviatilis</i>	Perca amarilla	Munro <i>et al.</i> , 1976
	Percichthyidae	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Lubina, lobina, róbalo, o robalo	Bonami <i>et al.</i> , 1983
	Percichthyidae	<i>Morone saxatilis</i>	Bajo rayado	Wechsler <i>et al.</i> , 1986
	Poeciliidae	<i>Xiphophorus xiphidium</i>	Platy	Ahne <i>et al.</i> , 1989
	Gadidae	<i>Gadus morhua</i>	Bacalao	Hill <i>et al.</i> , 1982
	Pleuronectidae	<i>Limanda limanda</i>	Lenguado común	Castric <i>et al.</i> , 1987
	Pleuronectidae	<i>Paralichthys lethostigma</i>	Lenguado del sur	McAllister <i>et al.</i> , 1984
	Pleuronectidae	<i>Pleuronectes fluviatis</i>	Suela	Hill <i>et al.</i> , 1982
	Pleuronectidae	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Fletán, hipogloso, paltus o halibut	Bonami <i>et al.</i> , 1983
	Pleuronectidae	<i>Scophthalmus maximus</i>	Rodaballo	McAllister <i>et al.</i> , 1984

Fuente: Modificado de CABI, 2018.

### 2.1.2 Hospederos experimentales

De manera experimental, el VNPI fue inoculado y aislado en las ovas del pez cebra (*Brachydanio rerio*). El experimento consistió en inocular peces cebra con el VNPI, posteriormente se determinó la transmisión del virus a las ovas. Se realizaron variaciones de apareamiento, se incluyeron padres que recibieron una o dos inoculaciones del virus, y dentro de estas categorías se realizaron apareamientos en los que ambos padres fueron tratados o solo uno de ellos. Los resultados mostraron la transmisión del VNPI al huevo, y que esta transmisión fue a través de la hembra. Sin embargo, cuando la hembra recibió dos inoculaciones del VNPI produjo anticuerpos contra el virus, y transmitió el virus a los huevos por un corto período de tiempo. Además, cuando el virus se transmitió al huevo, se identificó el virus en el F1 durante un período de al menos cinco meses (Seeley *et al.*, 1977). Lo anterior, indica que el VNPI tiene la capacidad de infectar al pez cebra.

### 2.1.3 Otros hospederos

Además de las especies de peces de cultivo en las que se ha aislado el VNPI, existen otras especies de organismos en las que el VNPI se ha identificado, sin que en ellos se presenten signos clínicos. En estos trabajos no se informa de daño tisular en los peces (Reno, 1999). Estos organismos han sido llamados reservorios del virus. Se ha demostrado que tanto animales homeotermos como ectotermos pueden actuar como vectores mecánicos del virus (Eskildsen y Vestergård-Jørgensen, 1973). Dichos organismos, pueden cohabitar con los peces de cultivo susceptibles al VNPI, entre estos se encuentran: peces silvestres, ectoparásitos, moluscos, plancton, crustáceos, aves y mamíferos (Evensen *et al.*, 2003).

### 2.1.4 Reservorios del VNPI

- a) Peces de cultivo: principalmente los miembros de los géneros *Salmo*, *Salvelinus* y *Oncorhynchus*. Entre ellos se encuentran la trucha arcoíris (*O. mykiss*), trucha café (*Salmo trutta*), trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*), entre otros. Los sobrevivientes de un brote de NPI, infectados con el VNPI quedan como portadores hasta por seis años (Reno, 1999). El virus está presente en las heces y la orina, exponiendo a la infección a los peces a su alrededor (Evensen *et al.*, 2003). Con base en los criterios de Casadevall y Pirofski (2003), estos peces de cultivo se infectan con el VNPI.
  
- b) Peces silvestres: el virus se ha identificado en una gran variedad de peces, como los planos: *Limanda limanda*, *Pleuronectes platessa*, *Microstomus kitt*, y en peces redondos como: *Eutrigla gumardus*, *Pollachius virens*, *Merluccius merluccius*, entre otros. En todos estos peces, el virus se ha identificado con baja prevalencia, con bajo título viral y los peces no muestran signos clínicos (Wallace *et al.*, 2008). Con base en los criterios de Casadevall y Pirofski (2003), estos peces silvestres se infectan con el VNPI.

- c) Invertebrados: se ha documentado infección por birnavirus acuáticos en invertebrados marinos, pero esto no asegura un riesgo para los salmónidos (Evensen *et al.*, 2003). Entre los grupos susceptibles están los ectoparásitos, el plancton y los bentos (comunidad formada por organismos que habitan el fondo de los ecosistemas acuáticos). Con base en los criterios de Casadevall y Pirofski (2003), estos invertebrados se infectan con el VNPI.
  
- d) Aves: se ha detectado el VNPI en las heces de las aves marinas piscívoras como el pato común y garza. Se piensa que estos adquieren al virus a partir del consumo de peces de cultivo infectados, pero se desconoce qué factores medioambientales pueden afectar la estabilidad del virus (McAllister y Owens, 1992). No existe evidencia de que este tipo de aves marinas se infecten con el VNPI.
  
- e) Mamíferos: mediante un experimento con vacas, donde se les proporcionó una dieta de ensilado de pescado que contenía el VNPI para posteriormente realizar un monitoreo durante siete días, se encontró que era posible detectar el virus hasta 72 horas después de la alimentación. Esto demostró que el virus es resistente a un pH entre 1.1 a 7.5, a las enzimas digestivas y a la temperatura corporal de la vaca de 39 °C (Smail *et al.*, 1993). No hay evidencia de que el VNPI infecte células de mamíferos.
  
- f) Agua y sedimentos: se ha reportado que el VNPI tiene una larga sobrevivencia en agua dulce, estuarina y salada entre los 15 y 20 °C (Toranzo y Hetrick, 1982). Su sobrevivencia fuera del hospedero es más larga a bajas temperaturas (Smail *et al.*, 1993). Por esa resistencia el virus tiene una vía de transmisión horizontal, ya que los peces infectados con

el VNPI constantemente eliminan en el agua partículas virales (Evensen *et al.*, 2003), y se ha comprobado que los virus pueden permanecer activos durante al menos tres semanas (Labraña *et al.*, 2008).

#### **2.1.5 Resistencia y susceptibilidad de los peces ante el VNPI**

Con base en estudios de infección realizados en truchas arcoíris, la susceptibilidad de los peces, disminuye con la edad; resistiendo los peces a la enfermedad clínica al alcanzar aproximadamente 1500 grados-día (valor que se obtiene multiplicando los días de edad de los peces, por el promedio de la temperatura en grados Celsius durante su esperanza de vida) (Dorson y Torchy, 1981). Los alevines son los principales afectados por el virus, los sobrevivientes infectados, se convierten en portadores del virus durante toda su vida (Dobos, 2001).

#### **2.1.6 Respuesta a la selección de organismos para la supervivencia y resistencia a la enfermedad de la NPI**

La mayoría de las estimaciones de respuesta a la selección, se han obtenido mediante experimentos que utilizan selección basada en la familia y pruebas de desafío controlado. Sin embargo, la primera selección masiva exitosa de resistencia a la enfermedad de la NPI, se llevó a cabo en Japón, después de un brote repentino del NPI en la trucha arcoíris en 1965 (Okamoto *et al.*, 1993). En este brote, se registró más del 90% de mortalidad en las crías afectadas, los peces sobrevivientes y su progenie se utilizaron para la reproducción hasta 1973. En este año ya no se registró mortalidad, a pesar de que el virus se detectó en los peces y en la granja. Con base en estos resultados, en 1973 se creó una línea altamente resistente utilizando un sólo par de reproductores, y durante cinco generaciones los especímenes mostraron resistencia al VNPI, en comparación con otras líneas de peces diferentes. Lo anterior mostró que la resistencia al VNPI es estable y tiene una fuerte base genética. Sin embargo, las generaciones de estos peces altamente consanguíneos, tuvieron consecuencias negativas. Se registró pérdida de

diversidad genética que condujo a la depresión endogámica para la aptitud, razón por la que se dificultó la diseminación y propagación de esta línea de peces.

### **2.1.7 Vías de entrada, mecanismo de infección y diseminación del virus de la necrosis pancreática infecciosa**

El VNPI se transmite de manera horizontal y vertical (Reno, 1999). Los peces infectados eliminan el virus por medio de la orina y heces (Billi y Wolk, 1969). El virus presente en el agua entra en contacto con las branquias, la boca y por los poros sensoriales del sistema de la línea lateral (Wolf, 1988; Novoa *et al.*, 1995).

En peces reproductores, se ha demostrado que el VNPI se transmite de manera vertical mediante la adsorción viral a la superficie de los espermatozoides (Mulcahy y Pascho, 1984), o puede estar presente en el líquido folicular (Wolf *et al.*, 1963). Esta vía de transmisión, se ha comprobado en trucha arcoíris (*O. mykiss*), en trucha café (*Salmo trutta*), y en otras especies se han observado casos asociados a ovas o fluidos sexuales infectados (Reno, 1999).

## **2.2 VIRUS DE LA NECROSIS PANCREÁTICA INFECCIOSA**

Los virus son partículas infecciosas que contienen un ácido nucleico, ya sea ARN o ADN (ácido ribonucleico o ácido desoxirribonucleico), los cuales codifican toda la información necesaria para su replicación en la célula del hospedero. El ácido nucleico que constituye el genoma viral, se asocia con la proteína para formar una nucleocápside, que puede o no estar envuelta en otras proteínas virales con o sin membrana lipídica. Los virus que contienen membrana lipídica se denominan envueltos, mientras que los virus sin lípidos se consideran no envueltos. Los virus envueltos son generalmente (pero no siempre) menos definidos en la estructura, y se dice que son pleomórficos. Los virus bacterianos (bacteriófagos) pueden tener estructuras extremadamente sofisticadas: una cápside elongada en forma de icosaedro, cuello, una maquinaria contráctil (fibras largas) y una base (Minor, 2001).

La partícula completa del virus se denomina virión. En algunos casos, el ácido nucleico del virus puede estar presente en segmentos dentro del virión, como sucede con el virus de la influenza y en muchos virus de plantas; estos segmentos, corresponden a genes que codifican para proteínas diferentes (Minor, 2001).

Las infecciones de origen viral, tienen gran importancia económica en la acuicultura (Southgate, 2000). Los virus con ácido ribonucleico (ARN), causan las enfermedades con mayor impacto ecológico y socioeconómico en las granjas de: salmón, trucha, dorada, lobina, carpa y rodaballo (Gómez-Casado, 2011). Algunas de las enfermedades virales que provocan los mayores impactos ecológicos y socioeconómicos en las granjas de peces son: encefalopatía y retinopatía (*Nodoviridae*), necrosis pancreática infecciosa (*Birnaviridae*), septicemia hemorrágica (*Rhabdoviridae*), necrosis hematopoyética infecciosa (*Rhabdoviridae*), viremia primaveral de la carpa (*Rhabdoviridae*), enfermedad del páncreas del salmón (*Togaviridae*), anemia infecciosa del salmón (*Orthomyxoviridae*), herpesvirosis de la carpa koi (*Alloherpesviridae*) (Salgado-Miranda *et al.*, 2013).

### **2.2.1 Taxonomía del virus de la necrosis pancreática infecciosa**

El VNPI pertenece a la familia *Birnaviridae* (Fauquet *et al.*, 2005). El nombre "Birna" resalta las características más importantes de estos virus: *bi*, del prefijo latino, que significa 'dos', haciendo referencia a la naturaleza bisegmentada del genoma viral así como su doble hebra, y ARN del ácido ribonucleico, indica la naturaleza del ácido nucleico viral. La familia está compuesta por cuatro géneros: 1) *Aquabirnavirus*, representado por el Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (VNPI); 2) *Avibirnavirus*, representado por el Virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa (VEIB); 3) *Entomobirnavirus*, representado por el Virus Drosophila X (VDX) (Dobos, 2001); 4) *Blosnavirus*, representado por la especie tipo Virus Cabeza de Serpiente Manchado (VCSM), (BSNV, por sus siglas en inglés: *Blotched snakehead virus*), que se identificó por primera vez en líneas celulares derivadas del pez cabeza



de serpiente del bosque (*Channa lucius*), ambos peces de aguas cálidas del sureste asiático (Riji y Richards, 1999; Lee *et al.*, 2006).

### **2.2.2 Estructura del virión**

El VNPI tiene forma de icosaedro, de aproximadamente 60 a 64 nm de diámetro (Dobos, 2001), conformado por proteínas virales (VP, por sus siglas en inglés: *viral protein*). Las micrografías electrónicas por computadora a una resolución de 2 nm produce un modelo del virión con 260 subunidades triméricas compuestas por el polipéptido virión o proteína viral 2 (VP2). La capa interna consiste en 200 subunidades triméricas de VP3. El principal polipéptido de la cápside y el antígeno de tipo específico, VP2, es la proteína de virión más abundante, que constituye el 50-70% de la cápside de los diversos Virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI), Virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa (VEIB) y el Virus Drosophila X (VDX), estudiados, mientras que el antígeno específico de la proteína de la cápside interna, VP3, representa el 20-40% de la cápside. VP1, un polipéptido interno menor, es la ARN polimerasa dependiente de ARN asociada al virión y constituye solo el tres al cinco por ciento del virión. VP1 está presente en ambos viriones en una forma libre y en una forma genoma-vinculada llamada proteína genoma-unida (VPg), donde un residuo de serina de la VPg se une al extremo 5' de cada cadena de ARN genómico mediante un enlace fosfodiéster. El genoma de los viriones constituye entre el 7 al 10% del peso total de la partícula viral (Dobos, 2001).

### **2.2.3 Simetría del virión**

La cápside de los viriones tiene forma de icosaedros unidos sin envoltura, con formas hexagonales isométricas y con un diámetro de aproximadamente 60 a 64 nm (Dobos, 2001). La cápside consta de 180 subunidades estructurales compartidas entre 132 capsómeros en la superficie del virión que poseen un número de triangulación (T) de 13 (Ozel y Gelderblom, 1985; Rodríguez *et al.*, 2003). El virus

tiene un peso molecular de  $55 \times 10^6$  Da con un coeficiente de sedimentación de 435 S y una densidad de flotación en CsCl de  $1,33 \text{ gr/cm}^3$  (Dobos y Rowe, 1977).

#### 2.2.4 Ácidos nucleicos

El ácido nucleico viral es ARN bicatenario, con un peso molecular de  $4,8 \times 10^6$  Da y que representa el 8.7% del peso total del virion (Dobos, 1976); presenta un coeficiente de sedimentación de 14 S y un porcentaje de pares G-C del 54% (Rodríguez *et al.*, 2003). El genoma está constituido por dos segmentos de ARNs, que se denominan A y B, de peso molecular  $1,95$  a  $2,6 \times 10^6$  y  $1,72$  a  $2,3 \times 10^6$  Da, respectivamente (Dobos, 1976; Dobos *et al.*, 1979). Los dos segmentos contienen, a ambos extremos de la molécula, regiones no codificantes de considerable tamaño (VPg) (Figura 1). Estas secuencias tienen importancia en el reconocimiento de la polimerasa, la iniciación de la traducción y también, posiblemente, en el empaquetamiento del genoma (Duncan *et al.*, 1991).

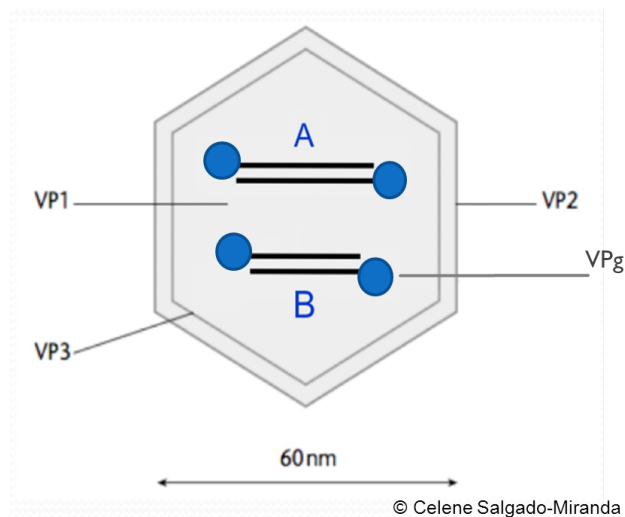


Figura 1. Diagrama de un birnavirus. A y B, se refieren a los dos segmentos del genoma; VP1, es la proteína viral 1; VP2, es la proteína viral 2; VP3, es la proteína viral 3; VPg, es la proteína ligada al genoma y nm, es nanómetro.

Fuente: Proyecto CONACYT, CB-257781, responsable técnico Celene Salgado Miranda.

### 2.2.5 Organización del genoma

El segmento A, con una longitud de 2962 a 3104 pb (Rodríguez *et al.*, 2003), este segmento presenta dos marcos de lectura abierta (ORF, por sus siglās en inglés: *Open Reading Frame*): el mayor y más conocido (ORF2) codifica una poliproteína de 106 kDa (NH<sub>2</sub>-preVP2-NS-VP3-COOH), la cual es precursora de las proteínas estructurales VP2, NS y VP3, mediante modificación cotransduccional gracias a la actividad auto proteolítica de la región NS, que codifica para la VP4 (Dobos *et al.*, 1977; Magyar y Dobos, 1994). El ORF1, codifica para una pequeña proteína no estructural de 17 kDa, rica en arginina, denominada VP5 e identificada en las células infectadas (Magyar y Dobos, 1994; Dobos, 1995). Mientras que el segmento B posee un peso de  $2.3 \times 10^6$  Da y un tamaño de 2731 a 2784 pb (Rodríguez *et al.*, 2003). El segmento B presenta un único marco de lectura abierta, denominado ORF3 que codifica para una proteína minoritaria, la proteína VP1, presente en el interior de la cápside (Duncan *et al.*, 1991) (Figura 2).

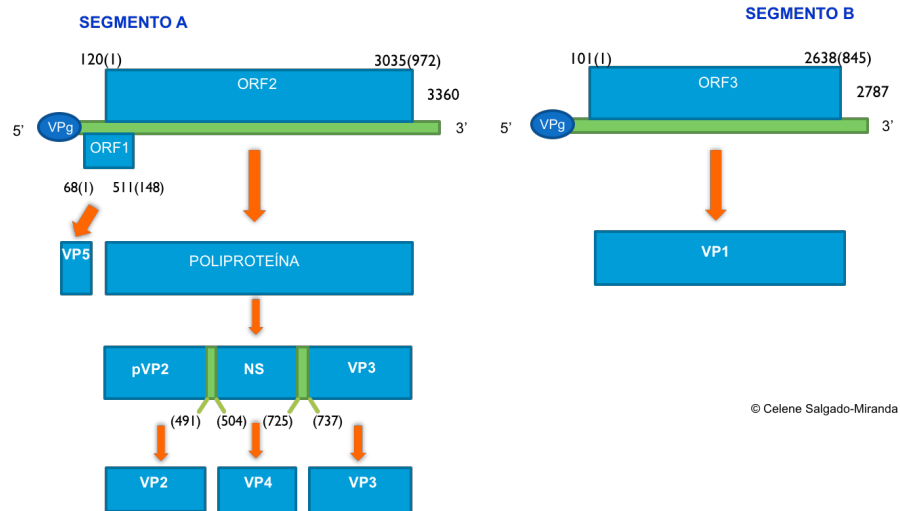


Figura 2. Mapa genómico del virus de la necrosis pancreática infecciosa. Las barras representan las secuencias de codificación como marcos de lectura abiertos (ORFs) en la cadena positiva (ARNm). Los números sobre cada segmento de ARN indican los números de nucleótidos. Los números entre paréntesis se refieren al número de aminoácidos (aa) dentro de los ORFs. VPg en el extremo 5' de cada ARN representa la proteína unida al genoma. Las áreas sombreadas entre pVP2 / NS / VP3 indican la ubicación de los sitios de escisión proteolítica dentro de la poliproteína. VP1, es la proteína viral 1; VP2, es la proteína viral 2; VP3, es la proteína viral 3; VP4, es la proteína viral 4. Fuente: Proyecto CONACYT, CB-257781, responsable técnico Celene Salgado Miranda.

### **2.2.6 Proteínas del virión**

Todos los birnavirus contienen cuatro polipéptidos. La proteína VP2 de 54 kDa forma la cápside, la proteína VP3 con 30 kDa, permanece en el interior del virión, y la proteína VP4 es una proteasa implicada en la maduración del virus. El segmento B codifica la VP1 de 94 kDa, que se encuentra en dos formas: un polipéptido libre de ARN dependiente de ARN de la polimerasa (RdRp); y la proteína VPg, que está vinculada al extremo final 5' de ambos segmentos genómicos (Dobos, 2001). Algunos autores, sugieren la presencia de la VP5, identificada en las células infectadas por el VNPI; sin embargo, su función no está definida en su totalidad (Dobos, 1995).

### **2.2.7 Replicación de los virus**

Los virus se replican en una célula viva (Gutiérrez y López, 2010). La replicación de algunas familias virales se lleva a cabo en el citoplasma y en otras en el núcleo. Este proceso involucra varios pasos: unión, penetración, pérdida de la envoltura o cápside viral, transcripción, traducción, ensamblaje, maduración y liberación (Maclachlan y Dubovi, 2017).

Las primeras interacciones entre un virus y una célula pueden carecer de especificidad, a menudo son electrostáticas y sirven principalmente para dar a un virus una retención inicial para posteriormente entrar a la célula por medio de receptores específicos (Grove y Marsh, 2017). El ciclo de replicación inicia cuando los virus a través de componentes de la superficie viral (glicoproteínas de la envoltura o proteínas de la cápside), se une a sus receptores celulares (Marsh y Helenius, 2006). Los receptores son moléculas de superficie celular que facilitan la entrada de los virus a la célula (Grove y Marsh, 2017).

### 2.2.8 Líneas celulares para replicar el virus de la necrosis pancreática infecciosa

Se conoce una amplia variedad de líneas celulares (Cuadro 2) tanto de peces salmónidos como no salmónidos, en las cuales los VNPI tienen la capacidad de replicarse y provocar el efecto citopático característico a una temperatura inferior a los 24 °C, y con una temperatura óptima entre los 18 a 20 °C (OIE, 2006). El efecto citopático es una alteración microscópica en la que la célula sufre cambios bioquímicos, moleculares y morfológicos durante el ciclo de replicación viral, en un cultivo celular (Mahy, 2001).

Cuadro 2. Líneas celulares continuas de peces teleósteos en las cuales se han propagado los birnavirus.

Líneas celulares	Especies	Rendimiento del virus	Referencia
RTG-2	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	10 <sup>8.5</sup>	Kelly <i>et al.</i> , 1978
RF	<i>O. mykiss</i>	NR	Wolf y Mann, 1980
RTH-149	<i>O. mykiss</i>	10 <sup>9.3</sup>	Lannan <i>et al.</i> , 1984
RTF-1	<i>O. mykiss</i>	NR	Wolf y Quimby, 1969
STE-137	<i>O. mykiss</i>	10 <sup>9.5</sup>	Lannan <i>et al.</i> , 1984
CHSE-214	<i>O. tshawytscha</i>	10 <sup>9.7</sup>	Lannan <i>et al.</i> , 1984
CHSE-114	<i>O. tshawytscha</i>	10 <sup>9.2</sup>	Lannan <i>et al.</i> , 1984
CSE-119	<i>O. kisutch</i>	10 <sup>8.8</sup>	Lannan <i>et al.</i> , 1984
CHH-1	<i>O. keta</i>	10 <sup>10.0</sup>	Lannan <i>et al.</i> , 1984
SSE-5	<i>O. nerka</i>	10 <sup>8.8</sup>	Lannan <i>et al.</i> , 1984
SSE-30	<i>O. nerka</i>	10 <sup>8.8</sup>	Lannan <i>et al.</i> , 1984
KO-6	<i>O. nerka</i>	10 <sup>8.8</sup>	Lannan <i>et al.</i> , 1984
BB	<i>Ictalurus nebulosus</i>	NR	Wolf y Quimby, 1969
AS	<i>Salmo salar</i>	10 <sup>8.0</sup>	Piper y Smith, 1973
CCT	<i>Cyprinus carpio</i>	10 <sup>9.0</sup>	Chen <i>et al.</i> , 1990
LF	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	10 <sup>7.33</sup>	Chen <i>et al.</i> , 1990
TO-2	<i>Tilapia mossambica</i>	10 <sup>10.33</sup>	Chen <i>et al.</i> , 1990
INEM-1	<i>Stenodus leucichthys</i>	10 <sup>9.9</sup>	Follett y Schmitt, 1990
SWT	<i>Xiphophorus helleri</i>	10 <sup>8.0</sup>	Kelly y Loh, 1972
GF-1	<i>Haemulon sciurus</i>	10 <sup>7.0</sup>	Moewus-Kobb, 1965
FHM	<i>Pimephales promelas</i>	10 <sup>7.7</sup>	Kelly <i>et al.</i> , 1978
OMAKA	<i>Caranx mate</i>	10 <sup>2</sup>	Lee y Loh, 1975
BF-2	<i>Lepomis macrochirus</i>	NR	Wolf y Quimby, 1969
PG	<i>Esox Lucius</i>	NR	Ahne, 1978
SJU-1	<i>Carassius auratus</i>	10 <sup>9.5</sup>	Lee y Loh, 1975
CL	<i>Ophicephalus lucius</i>	NR	Wattanavijarn <i>et al.</i> , 1988
WC-1	<i>Stizostedion vitreum</i>	NR	Kelly <i>et al.</i> , 1980

MK	<i>Brevoortia tyrannus</i>	NR	Stephens <i>et al.</i> , 1980
EPC	<i>Cyprinus carpio</i>	10 <sup>8.5</sup>	Fijan <i>et al.</i> , 1983
EK-1	<i>Anguilla japonica</i>	10 <sup>9.5</sup>	Kusuda <i>et al.</i> , 1989

No reportado: NR.

Fuente: Modificado de CABI, 2018.

En un principio la línea celular que más se utilizó para la replicación del virus, fue la RTG-2 (por sus siglas en inglés: *Rainbow Trout Gonad*) (Malsberger y Cerini, 1965, Kelly *et al.*, 1978, Nicholson *et al.*, 1979, Dorson, 1983); esta línea celular es muy sensible al virus y en ella se observa el efecto citopático con rapidez (MacDonald y Kennedy, 1979).

Actualmente la línea celular más utilizada es la CHSE-214 (por sus siglas en inglés: *Chinook Salmon Embryo*) (Figura 3), la cual presenta sensibilidad al virus y desarrolla un efecto citopático semejante a la línea RTG-2. Tiene la ventaja de que la producción de interferón es nula o muy baja consiguiendo títulos del orden de 10<sup>8</sup> pfu/ml (por sus siglas en inglés, también conocida como unidades formadoras de placa por mililitro de muestra) (MacDonald y Kennedy, 1979); además es muy adaptable y fácil de manipular en el laboratorio, lo que la hace muy conveniente para la replicación del VNPI (Kelly *et al.*, 1978).

Una tercera línea celular que se ha empleado en los últimos años es la BF-2 (por sus siglas en inglés: *Bluegill Fry*), de la especie mojarra oreja azul (*Lepomis macrochirus*); aunque algunos autores e incluso la Unión Europea, la proponen como sustituto de la línea CHSE-214, otros han demostrado que determinadas cepas del VNPI no se replican en esta línea celular (Rivas, 1991).

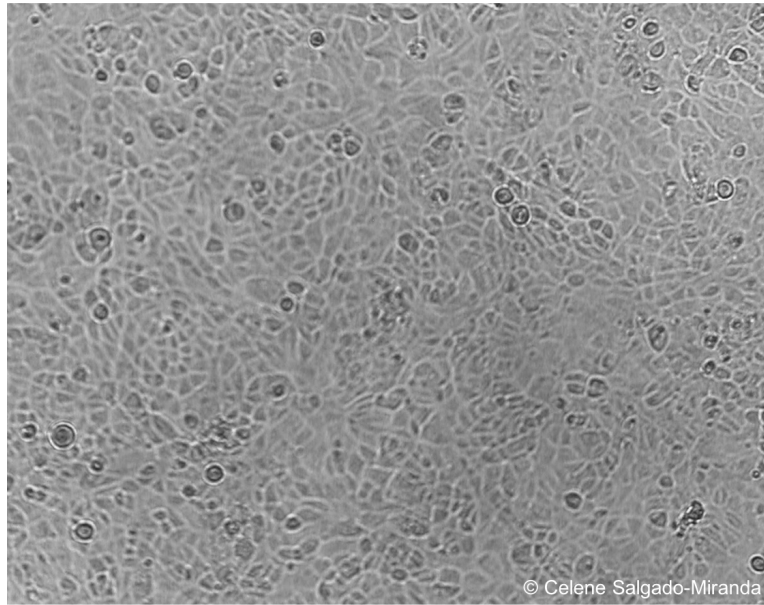


Figura 3. Microfotografía de la línea celular CHSE-214. Cultivo celular en monoestrato, con 90% de confluencia, sin inoculación viral; se observa la morfolología epitelial normal de la línea celular. Fuente: Proyecto CONACYT, CB-257781, responsable técnico Celene Salgado Miranda.

### 2.2.9 Ciclo de replicación del virus de la necrosis pancreática infecciosa

El VNPI es capaz de replicar a un amplio rango de temperaturas, de 4 °C a 37.5 °C (Scherrer *et al.*, 1974; Scherrer y Cohen, 1975). Aunque se replica mejor entre 10 y 25 °C, siendo su temperatura óptima de 15 a 20 °C (Malsberger y Cerini, 1963).

#### a) Unión

El ciclo de replicación de los VNPI inicia con la unión de la proteína VP2 a polipéptidos de alto peso molecular (100-200 kDa) ubicados en la membrana citoplasmática de las células susceptibles (Kuznar *et al.*, 1995). Se ha observado que el VNPI se adhiere a diferentes receptores, e incluso algunos investigadores sugieren que pueden tener diferentes mecanismos de entrada; esto podría explicar su amplio rango de hospederos (Ørpetveit *et al.*, 2012). La unión del virus a la célula hospedera, se lleva a cabo en un lapso de 1 a 2 horas (Dobos, 2001).

b) Penetración

Los virus entran a la célula por endocitosis (Couve *et al.*, 1992), a través del mecanismo de macropinocitosis (Levican *et al.*, 2017). El proceso endocítico en la célula, tiene varias ventajas, primero evita la barrera del citoesqueleto de actina cortical que se encuentra inmediatamente debajo de la membrana plasmática y forma una malla difícil de atravesar. Por otra parte, le da acceso a los organelos endocíticos los cuales proveen de micro ambientes que favorecen la penetración viral (Gutiérrez y López, 2010).

c) Pérdida de la cápside

Las proteasas endosomales o el bajo pH de la célula, facilitan la pérdida de la cápside (Gutiérrez y López, 2010). La cápside es parcial o totalmente removida dejando expuesto el genoma viral. Este paso del ciclo de la replicación viral es el menos investigado hasta el momento (Cann, 2015). El proceso ocurre en el citoplasma de la célula hospedera (Ørpetveit *et al.*, 2012).

d) Transcripción

Después de la entrar a en la célula, la ARN polimerasa dependiente de ARN del virión se activa y produce moléculas de ARNm de longitud del genoma de cada segmento de ARN de doble cadena (ARNds, por sus siglas en inglés: *double-stranded ribonucleic acid*). La VP1 posee actividad de guanilación donde el guanósín monofosfato (GMP) se une a uno de los residuos de serina de la VP1 mediante un enlace serina-5'-GMP fosfodiéster. Este complejo VP1pG sirve como primer para la síntesis de ARN, de modo que los ARNm resultantes tienen un VPg unido a sus extremos 5' en lugar de la estructura de casquete o cap-5' (*capping* 5-*prima*), y carecen de la cola 3'-poli(A). El ARNm del virus se transcribe a partir de ARNds mediante un mecanismo semiconservativo de desplazamiento de cadena. A las seis horas posteriores a la infección, los intermediarios de la transcripción representan el 70% de los ARN específicos del virus (Dobos, 2001).



e) Traducción

La síntesis de proteínas virales, se lleva a cabo de la siguiente manera: Dobos (1977) propuso un procesamiento de poliproteína o una iniciación interna de la traducción en el ARNm específico del segmento A. Mertens y Dobos (1982) sugirieron la presencia de un ARNm policistrónico. Finalmente, Manning y Leong (1990) y Dobos (1995) consideraron que los modelos entienden la síntesis de estas proteínas: 1) iniciación traslacional independiente para cada proteína viral y/o, 2) liberación proteolítica rápida por una proteasa viral o del hospedero. Análisis de secuencias de nucleótidos y péptidos han demostrado que el ORF mayor del segmento A del VNPI es monocistrónico y codifica una poliproteína conformada por tres polipéptidos dispuestos en el orden siguiente: N-preVP2-NS-VP3-C' (Dobos, 1995; Ducan y Dobos, 1986; Nagy *et al.*, 1987). El producto del segmento B del genoma es una ARN polimerasa (VP1) del VNPI. Este polipéptido está presente en el virión en dos formas: como polipéptido libre o como proteína unida al genoma (VPg) (Dobos, 2001). En la línea celular CHSE-214, una tasa de síntesis máxima de ARN específico del VNPI se observa entre las 8 a 10 horas (Somogyi y Dobos, 1980).

f) Ensamblaje y maduración viral

La replicación, ensamblaje y maduración se lleva a cabo en el citoplasma de las células infectadas, esto provoca un efecto citopático caracterizado por: células redondeadas y pérdida del monoestrato celular en un cultivo celular (Rodríguez *et al.*, 2003) (Figura 4).

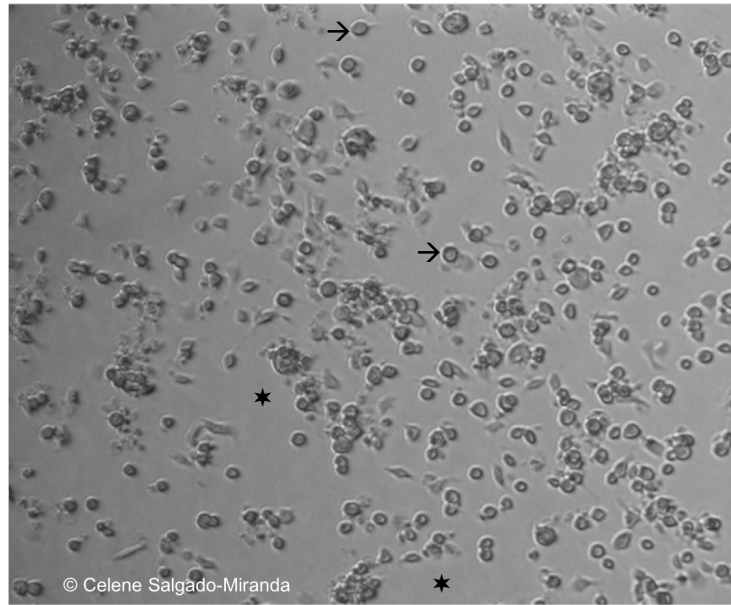


Figura 4. Microfotografía de la línea celular CHSE-214 con efecto citopático. Se observan células redondeadas (→) y pérdida del monoestrato celular (\*); a los dos días posteriores a la inoculación del VNPI.

Fuente: Proyecto CONACYT, CB-257781, responsable técnico Celene Salgado Miranda.

#### g) Liberación de nuevas partículas virales

La liberación de los nuevos virus se lleva a cabo por la destrucción (lisis) de las células. Rodríguez y colaboradores (2003), reportan que un ciclo de replicación del VNPI en la línea celular CHSE-214, a 22 °C, ocurre entre las 16 a 20 horas posteriores a la inoculación.

### 2.2.10 Clasificación serológica del VNPI

Rodríguez *et al.* (2003), agruparon serológicamente y clasificaron a los aislamientos en tres serotipos: serotipo 1 (VR-299), serotipo 2 (Ab) y serotipo 3 (Sp). Además, pueden diferenciarse entre sí, fundamentalmente por sus características patológicas y de virulencia. La clasificación serológica de Hill y Way (1995) reconoce dos serogrupos diferentes que no presentan reacción cruzada: A y B. El serogrupo A presenta nueve serotipos diferentes del VNPI y el serogrupo B solo uno (Cuadro 3). Existe correlación entre estos esquemas serológicos de clasificación (Rodríguez *et al.*, 2003).

Cuadro 3. Clasificación serológica de los VNPI.

SEROGRUPO	SEROTIPO	NOMBRE	ABREVIACIÓN
A	A1	VR-299	VR-299
		West Buxton	WB
	A2	Spjarup	Sp
	A3	Abild	Ab
	A4	Hecht	He
	A5	Telliana	Te
	A6	Canadá 1	Can. 1
	A7	Canadá 2	Can. 2
	A8	Canadá 3	Can. 3
	A9	Jasper	Ja
B	B1	TV-1	TV-1

Fuente: Datos tomados de Hill y Way (1995).

Cada serotipo está compuesto de numerosas cepas que difieren en la virulencia (Hill, 1982; Silim *et al.*, 1982). La mayoría de los aislamientos de birnavirus acuáticos obtenidos de peces de agua dulce y marinos en los Estados Unidos de América (EUA) pertenecen al serotipo A1. Los serotipos A6, A7, A8 y A9 se encuentran en Canadá y los serotipos A2, A3, A4 y A5 en Europa. La clasificación serológica tiene gran importancia epidemiológica, sin embargo los serotipos no tienen una distribución geográfica clara ya que los de origen europeo se han encontrado en América y viceversa, probablemente debido a los flujos migratorios naturales de las poblaciones de peces, así como a la comercialización de huevo oculado y peces importados como lo refiere Sano (1971) en Japón, Bragg y Combrink (1988) en África y Espinoza y colaboradores (1985) en Chile.

A partir de aislamientos de aquabirnavirus realizados en peces de ornato, John y Richards (1999) sugirieron un tercer serogrupo, denominado serogrupo C, que incluye el serotipo BSNV únicamente, aislado del pez cabeza de serpiente del bosque (*Channa lucius*). El cuarto serogrupo, el D, propuesto por Dixon y colaboradores, incluye dos serotipos, D1 y D2, aislados de peces de ornato: gobio marmol (*Oxyeleotris marmorata*), pez ángel (*Pterophyllum scalare*), gurami enano (*Thrichogaster lalius*) también conocido como *Colisa lalia* y en el cíclido enano de Ramírez (*Microgeophagus ramirezi*) (Dixon *et al.*, 2008).

### **2.2.11 Clasificación molecular del VNPI**

Las cepas de referencia y aislamientos de los principales serotipos (A1 al A9) y los virus aislados de diferentes hospederos y países, se han agrupado en 6 genogrupos: en el genogrupo 1 se incluyen aislamientos de los EUA (A1) y de Canadá (A9), en el genogrupo 2 aislamientos de Asia y Europa (A3), en el genogrupo 3 aislamientos de Canadá (A6) y un europeo (A5), el genogrupo 4 incluye aislamientos de Canadá (A7 y A8), el genogrupo 5 contiene cinco aislamientos europeos y un aislamiento de Asia (A2) y el genogrupo 6 un aislamiento (A4) (Blake *et al.*, 2001a; Blake *et al.*, 2001b). Posteriormente, Nishizawa y colaboradores (2005) propusieron un genogrupo más, el genogrupo 7 a partir de aislamientos de Japón y Corea. El primer aislamiento mexicano fue clasificado como serotipo A1 basado en la secuencia parcial del gen de la VP2 (Ortega *et al.*, 2002) y agrupado en el genogrupo 1 (Nishisawa *et al.*, 2005), asimismo otros virus obtenidos en el Estado de México (Barrera-Mejía *et al.*, 2011). Es necesaria la confirmación antigénica y serológica de esta observación.

Los diferentes serotipos del VNPI, presentan diferencias en la virulencia en peces de la misma especie e influyen en el curso de la enfermedad y en su pronóstico. Hay cepas altamente virulentas con un 90% de mortalidad y cepas avirulentas. Los serotipos A1 y A2 causan más mortalidad en truchas arcoíris que el serotipo A3 (Jørgensen y Kehlet, 1971) y dentro de un mismo serotipo hay

diferencias en el grado de virulencia (Santi *et al.*, 2004). La heterogenicidad antigénica tiene base molecular y los epítomos de neutralización variables y conservados se localizan en la proteína VP2 (Christie *et al.*, 1990; Frost *et al.*, 1995). Al comparar los aminoácidos que forman la proteína VP2 de los diferentes serotipos del serogrupo, se observa que los aminoácidos de los extremos son iguales y muy estables y los de la parte media muy variables y difieren en cada serotipo (Coulibaly *et al.*, 2010).

### **2.2.12 Sobrevivencia del virus en el ambiente**

Es necesario conocer la estabilidad que el VNPI posee tanto en su medio natural, así como las condiciones óptimas en el laboratorio para conservar la infectividad.

El VNPI es menos estable en agua dulce que en agua de mar. El VNPI resiste un amplio rango de salinidad y temperatura, incluso puede permanecer viable, durante varias semanas a 40 °C en agua dulce y hasta cuatro meses en agua salada; esto explica su presencia en reservorios vivos como inanimados (Mortensen *et al.*, 1998). Smail y colaboradores (1993), demostraron que el virus puede sobrevivir en ensilaje de peces por más de 15 días a 20 °C y por 147 días a 4 °C y Dixon y colaboradores (2012) probaron que el VNPI sobrevivió por más de 14 días en condiciones de ensilaje. El VNPI permanece viable por varios meses en agua filtrada a 4 °C, puede sobrevivir varias semanas en sedimento a 10 °C, 71 días a 20 °C y dos horas a 60 °C (Dixon *et al.*, 2012).

En el laboratorio, se puede conservar la infectividad durante meses en soluciones tampón, incluyendo los medios de cultivo comerciales, a una temperatura de 4 °C. Asimismo, se pueden conservar congelados a -70 °C durante varios años. Al ser un virus sin envoltura lipídica, el VNPI resiste al tratamiento con éter o cloroformo. Sin embargo, el VNPI es sensible a condiciones ácidas y se ha probado su inactivación a una pH de 12 (Dixon *et al.*, 2012).

### III. RESULTADO PATOLÓGICO EN EL HOSPEDERO

#### 3.1 SIGNOS CLÍNICOS

La enfermedad se presenta en especies de salmónidos, donde el grado de susceptibilidad al virus varía de una especie a otra y se observan diversos signos clínicos (Fridholm, 2008). Los signos clínicos característicos, se presenta en la trucha arcoíris, trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*), trucha café, salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y en varias especies de salmón del Pacífico (Roberts y Pearson, 2005). Esta enfermedad es típica en los salmónidos jóvenes; en los alevines y en crías de primera alimentación, puede causar una mortalidad hasta del 100% (Wolf y Quimby, 1969), esto depende si el hospedero es homólogo o heterólogo (Cuadro 4).

Cuadro 4. Virulencia de birnavirus acuáticos en infecciones experimentales realizadas en hospederos homólogos y heterólogos.

Aislado en	Especie infectada	Tamaño, edad y etapa del hospedador	Ruta de exposición	Dosis por pez TCID <sub>50%</sub> /ml	Mortalidad específica (%)	Duración de la observación	Referencia
<b>Especies homólogas infectadas</b>							
<i>Salvelinus fontinalis</i>	<i>S. fontinalis</i>	Alevín	INM	NR	7 a 98	14 D	Wolf y Quimby, 1969
<i>S. fontinalis</i>	<i>S. fontinalis</i> (NB)	0.5 g	INM/15 minutos	10 <sup>6.9</sup>	3	1 D	Reno <i>et al.</i> , 1978
<i>S. fontinalis</i>	<i>S. fontinalis</i> (Penn-2)	5 ME	IP	10 <sup>6.3</sup>	0	25 D	Swanson y Gillespie, 1982
<i>S. fontinalis</i>	<i>S. fontinalis</i> (VR-299)	6 ME	IP	10 <sup>6.3</sup>	0	25 D	Swanson y Gillespie, 1982
<i>S. fontinalis</i>	<i>S. fontinalis</i> (VR-299)	14 ME	IP	10 <sup>6.3</sup>	0	25 D	Swanson y Gillespie, 1982
<i>O. mykiss</i>	<i>O. mykiss</i>	0.11 g	INM/1 HO	10 <sup>4.8</sup>	15	90 D	Sano <i>et al.</i> , 1981

<i>O. mykiss</i>	<i>O. mykiss</i> (Sp)	5 a 7 cm	INM	10 <sup>5.0</sup>	20	21 D	Vestergård-Jørgensen y Kehlet, 1971
<i>O. mykiss</i>	<i>O. mykiss</i> (Ab)	5 a 7 cm	INM	10 <sup>5.0</sup>	0	21 D	Vestergård-Jørgensen y Grauballe, 1971
<i>O. mykiss</i>	<i>O. mykiss</i> (Ab)	0.2 g	INM	10 <sup>4</sup>	9	35 D	Kohlmeier <i>et al.</i> , 1986
<i>O. mykiss</i>	<i>O. mykiss</i> (Sp)	0.2 g	INM	10 <sup>4</sup>	42	35 D	Kohlmeier <i>et al.</i> , 1986
<i>Salmo salar</i>	<i>S. salar</i>	Alevín	INM	10 <sup>5</sup> a 10 <sup>8</sup>	0 a 15	30 D	Smail <i>et al.</i> , 1986
<i>Brevoortia tyrannus</i>	<i>B. tyrannus</i>	5 a 25 cm	IP	10 <sup>5</sup>	100	7 D	Stephens <i>et al.</i> , 1980
<i>Anguilla japonica</i>	<i>A. japonica</i>	10 g	IP	10 <sup>7.8</sup>	5.5 a 75	NR	Sano <i>et al.</i> , 1981
<i>Paralichthys olivaceus</i>	<i>P. olivaceus</i>	5 g	IP	NR	60	21 D	Kusuda <i>et al.</i> , 1989
<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	<i>M. anguillicaudatus</i>	10 a 15 g	IP	10 <sup>4</sup>	75	7 D	Chen <i>et al.</i> , 1984
<i>Morone saxatilis</i>	<i>M. saxatilis</i>	5 D a 6 ME	Oral, INM	10 <sup>2</sup> a 10 <sup>6</sup>	0	33 SE	Wechsler <i>et al.</i> , 1987
<b>Especies heterólogas infectadas</b>							
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Salvelinus fontinalis</i> (Sp)	25 mm	INM	NR	42 a 51	20 D	Wechsler <i>et al.</i> , 1987
<i>O. mykiss</i>	<i>Salmo salar</i> (Sp)	Alevín	INM	10 <sup>5</sup> a 10 <sup>8</sup>	0 a 1.5	30 D	Smail <i>et al.</i> , 1986
<i>O. mykiss</i>	<i>O. tshawytscha</i>	0.8 a 1.2 cm	SC	10 <sup>3</sup>	100	< 6 D	Klontz <i>et al.</i> , 1965
<i>O. clarki</i>	<i>O. nerka</i>	Alevín	NR	NR	0	NR	Parisot <i>et al.</i> , 1963
<i>O. clarki</i>	<i>O. kisutch</i>	Alevín	NR	NR	0	NR	Parisot <i>et al.</i> , 1963
<i>O. clarki</i>	<i>O. tshawytscha</i>	Alevín	NR	NR	0	NR	Parisot <i>et al.</i> , 1963

<i>Anguilla japonica</i>	<i>O. mykiss</i>	0.11 g	INM/1 HO	10 <sup>5.1</sup>	0	90 D	Sano <i>et al.</i> , 1981
<i>Esox niger</i>	<i>S. fontinalis</i>	NR	INM/6 horas	10 <sup>6</sup>	16.6 a 40	14 D	Silim <i>et al.</i> , 1982
<i>E. niger</i>	<i>S. namaycush</i>	NR	INM/6 horas	10 <sup>6</sup>	1.6	14 D	Silim <i>et al.</i> , 1982
<i>E. lucius</i>	<i>O. mykiss</i> (Hecht)	0.2 g	INM	10 <sup>4</sup>	0	35 D	Kohlmeyer <i>et al.</i> , 1986
<i>Morone saxatilis</i>	<i>S. fontinalis</i>	20 D	INM	10 <sup>5</sup>	94	60 D	McAllister y McAllister, 1988
<i>Rutilus rutilus</i>	<i>O. mykiss</i>	Alevín	INM	10 <sup>4</sup>	10	30 D	Hill, 1982
<i>Perca fluviatilis</i>	<i>O. mykiss</i>	Alevín	INM	10 <sup>4</sup>	6	30 D	Hill, 1982
<i>Cyprinus carpio</i>	<i>O. mykiss</i>	Alevín	INM	10 <sup>4</sup>	60	30 D	Hill, 1982
<i>Salvelinus fontinalis</i>	<i>O. mykiss</i>	100 g	IP	10 <sup>6</sup>	0	84 D	Wolf y Quimby, 1969
<i>Paralichthys lethostigma</i>	<i>S. fontinalis</i>	Alevín	NR	NR	Ligeramente virulento	NR	McAllister <i>et al.</i> , 1984
<i>A. japonica</i>	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i> (EVE)	10 a 15 g	IP	10 <sup>4</sup>	20	7 D	Chen <i>et al.</i> , 1984
<i>Ostrea edulis</i>	<i>Crassostrea gigas</i>	1 a 2 cm	INM	10 <sup>4</sup>	18	50 D	Hill <i>et al.</i> , 1982
<i>Crassostrea virginica</i>	<i>Ostrea edulis</i>	5 a 6 cm	INM	10 <sup>4</sup>	34	50 D	Hill <i>et al.</i> , 1982
<i>Tellina tenuis</i>	<i>Crassostrea gigas</i>	NR	INM	NR	0	90 D	Hill, 1976
<i>S. fontinalis</i>	<i>Hippocampus erectus</i>	NR	IP	10 <sup>5</sup>	0	34 D	Moewus-Kobb, 1965
<i>S. fontinalis</i>	<i>Haemulon flavolineatum</i>	NR	IP	10 <sup>5</sup>	0	22 D	Moewus-Kobb, 1965

A: año, cm: centímetro, D: día, INM: inmersión, HO: hora, IP: intraperitoneal, ME: mes, NR: no reportado, SC: subcutáneo, SE: semana.

Fuente: Modificado de CABI, 2018.

El VNPI se caracteriza por causar diversos cambios conductuales e importantes lesiones internas y externas a nivel histológico (Munro y Midtlyng, 2011). Los signos incluyen: anorexia, ataxia, hiperventilación, oscurecimiento de piel (hiperpigmentación) (Figura 5), hemorragias en áreas ventrales y aletas (Wolf, 1988; Rodríguez *et al.*, 2003; Roberts y Pearson, 2005); un comportamiento



natatorio horizontal, el pez se encuentra en la parte inferior del estanque, respiración acelerada, exoftalmia moderada (Figura 6), distensión abdominal, branquias pálidas y heces blanquecinas (Dobos, 2001).



Figura 5. Hiperpigmentación en trucha arcoíris al día ocho posterior a la infección con el VNPI. Pez superior normal (grupo Control), pez inferior con obscurecimiento (grupo infectado con cepa Sp). Fuente: Proyecto CONACYT, CB-257781, responsable técnico Celene Salgado Miranda.



Figura 6. Exoftalmia en cría de trucha arcoíris al día ocho posterior a la infección con el VNPI. Pez superior normal (grupo Control), pez inferior con exoftalmia (grupo infectado con cepa Sp). Fuente: Proyecto CONACYT, CB-257781, responsable técnico Celene Salgado Miranda.

### 3.2 HALLAZGOS MACROSCÓPICOS

Los hallazgos a la necropsia son: moco lechoso en intestino y estómago, el bazo, corazón, hígado y riñón pueden estar pálidos (Figura 7), por lo general el intestino y estómago se encuentran vacíos (sin alimento), el intestino se encuentra con exudado catarral y lesiones en la mucosa, hay sustancia mucosa y hemorragias petequiales en el tracto digestivo, congestión en el hígado y de color amarillo, hemorragias petequiales en tejido graso pilórico, ascitis en cavidad abdominal, ciegos pilóricos con hemorragias petequiales. También se pueden observar, lesiones necróticas en gónadas y cerebro (Maret, 1997; Dobos, 2001; Roberts y Pearson, 2005; Munro y Midtlyng, 2011; Vega *et al.*, 2011).



Figura 7. Hígado pálido en trucha arcoíris al día ocho posterior a la infección con el VNPI. Pez superior con hígado pálido (grupo infectado con cepa Sp), pez inferior normal (grupo Control). Fuente: Proyecto CONACYT, CB-257781, responsable técnico Celene Salgado Miranda.

### 3.3 HALLAZGOS MICROSCÓPICOS

Después de un periodo de viremia no detectable, aproximadamente al cuarto día post infección, se observan áreas de necrosis en páncreas exocrino y otros órganos (Reno, 1999); sin embargo, el virus puede estar en distintos órganos.

En muchos casos no se aprecia infiltración de células inflamatorias (Wolf, 1988). En peces adultos que sufrieron infección a edad temprana, en intestino se encontraron abundantes células epiteliales con núcleos cariorréticos. Este hallazgo sugiere que pueden ser sitios de replicación viral en los portadores, pero esto no se ha confirmado (Smail *et al.*, 1995).

A nivel histológico, se observa necrosis focal en las células de los acinos e islote del páncreas (Figura 8), y en el hígado, remanentes de estructura de sostén y tejido adiposo del páncreas, necrosis en tejido adiposo peripancreático, infiltrado de células mononucleares en páncreas, necrosis de la mucosa intestinal y cecal, enteritis catarral en intestino y ciego pilórico, infiltración de células mononucleares en intestino y ciego pilóricos, incremento gradual de melanomacrófagos en riñón, necrosis en el tejido hematopoyético del riñón y signos de necrosis y degeneración de tejido adiposo intra-abdominal (Maret, 1997; Roberts y Pearson, 2005; Munro y Midtlyng, 2011; Vega *et al.*, 2011). Además, se describen diferencias entre algunos salmónidos, por ejemplo, en la trucha arcoíris las lesiones típicas relacionadas a la enfermedad incluyen necrosis del tejido acinar del páncreas y el exudado catarral del intestino. En el caso del salmón del Atlántico se han observado áreas de necrosis focal o difusa en hígado, que además se observa pálido y muy frágil al tacto, necrosis en el tejido hematopoyético del riñón (Roberts y Pearson, 2005; Smail *et al.*, 2006). Además, existe evidencia de salmones infectados con aislados del VNPI que no expresan la proteína VP5 (que tiene actividad apoptótica) y que presentan hepatocitos en estado apoptótico. Esta respuesta estaría desencadenada por el sistema inmune innato del pez más que por el VNPI (Noguera y Bruno, 2010).

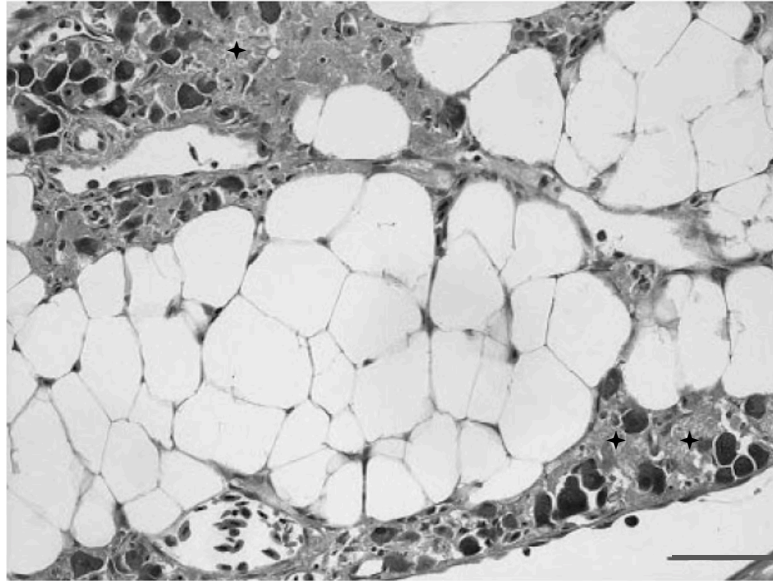


Figura 8. Microfotografía de las células de los acinos del páncreas. Se observa necrosis pancreática típica (†) en las células de los acinos del páncreas, provocada por el VNPI. Escala de la barra = 10  $\mu$ m.

Fuente: Imagen tomada de Munro y Midtlyng (2011), proporcionada por Patricia Noguera, Marine Scotland, Escocia.

### 3.4 DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DE LA NECROSIS PANCREÁTICA INFECCIOSA

De acuerdo al Manual de Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos, publicado por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), las técnicas para la identificación del VNPI a partir de peces sin signos clínicos se fundamentan en el aislamiento viral en líneas celulares de peces. El virus, se puede aislar con líneas celulares como: RTG-2 (*Rainbow Trout Gonad*), CHSE-214 (*Chinook Salmon Embryo*) y BF-2 (*Bluegill Fry*), y posteriormente realizar la identificación inmunológica de los aislamientos mediante las pruebas de inmunofluorescencia indirecta (Figura 9), seroneutralización e inmunoenzimática (ELISA, por sus siglas en inglés: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*; en español: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) (OIE, 2006).

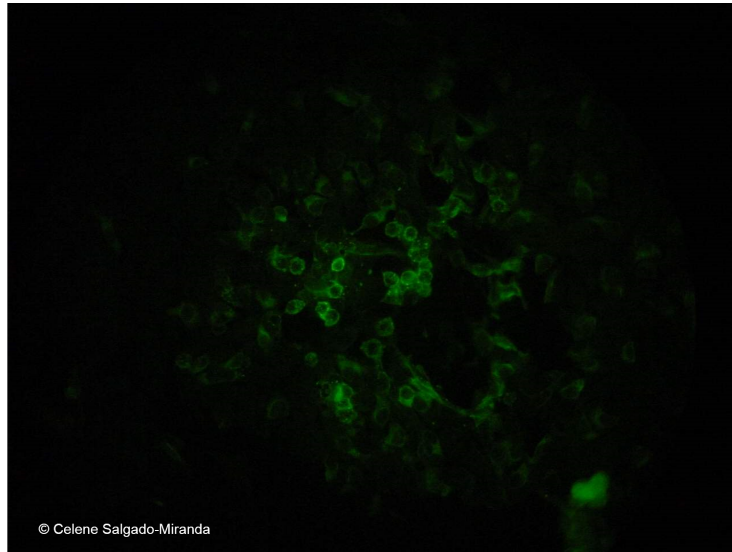


Figura 9. Inmunofluorescencia indirecta del VNPI 24 horas posteriores a la inoculación de un monocultivo de células CHSE-214.

Fuente: Proyecto CONACYT, CB-257781, responsable técnico Celene Salgado Miranda.

Sin embargo, el cultivo del virus es costoso y laborioso; por lo que se han desarrollado nuevos métodos de detección del virus, como la técnica de transcriptasa inversa, reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR, por sus siglas en inglés: *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*) (Reno, 1999).

Rodríguez y colaboradores, evaluaron seis técnicas diagnósticas para la detección del VNPI: inmunofluorescencia indirecta, citometría de flujo, inmunoperoxidasa, inmunoblot, inmunoestafilococo-proteína A y RT-PCR. Concluyeron que la RT-PCR y la citometría de flujo son los métodos más apropiados y sensibles para la detección de birnavirus en peces enfermos, y que la citometría de flujo puede detectar peces infectados a partir de leucocitos sanguíneos (Rodríguez *et al.*, 2001). En México se desarrolló un protocolo para la identificación del VNPI que consiste en un cultivo celular de corta duración, seguido de un RT-PCR múltiple (Barrera-Mejía *et al.*, 2009).

Las siguientes técnicas fueron empleadas para detectar el VNPI a partir de agua: la ultrafiltración de flujo tangencial (UFT) (Watanabe, 1988) y la UFT combinada con filtración de exclusión (Chamorro *et al.*, 2006).

### **3.5 MEDIDAS DE CONTROL DEL VIRUS DE LA NECROSIS PANCREÁTICA INFECCIOSA**

No hay una medida de control específica para el VNPI (Dobos, 2001). Lo que ha funcionado es el control de peces infectados, eliminación de reproductores positivos al virus y desinfección de estanques de cultivo (Munro y Midtlyng, 2011).

El VNPI se transmite principalmente en forma horizontal, por lo que la cuantificación del virus en el agua es fundamental para un adecuado manejo sanitario de la salmonicultura y del ambiente (Chamorro *et al.*, 2006). La infectividad del virus puede ser reducida por varios agentes desinfectantes como el yodo, cloro, ozono y formalina (Economon, 1973) y por calor seco o húmedo a 60 °C por cuatro horas (Munro y Midtlyng, 2011).

Hasta la fecha no se ha obtenido una vacuna totalmente efectiva contra el VNPI, con las vacunas comerciales actuales, se observan resultados variables y no previenen por completo las pérdidas (Munro y Midtlyng, 2011). En parte, esto es debido a las características antigénicas del virus antes mencionadas.

#### **IV. FACTORES MICROBIANOS Y RESPUESTA INMUNE DEL HOSPEDERO**

##### **4.1 FACTORES DE VIRULENCIA DEL VIRUS DE LA NECROSIS PANCREÁTICA INFECCIOSA**

Los factores de virulencia son moléculas producidas por bacterias, virus, hongos y protozoos que aumentan su eficacia de patogenicidad y les permite lograr en el hospedero lo siguiente: colonización de un nicho, capacidad para entrar y salir de las células donde se multiplica, evasión o inhibición de la respuesta imune y la obtención de nutrientes a partir del hospedero (Keen, 2012).

###### **4.1.1 Virulencia del virus de la necrosis pancreática infecciosa**

Conocer la capacidad que el VNPI tiene para provocar daño y consecuente enfermedad, su frecuencia, así como su gravedad, en algunos eventos clínicos se dificulta; ya que no en todos los brotes se conoce o se llega a conocer origen del virus y no se lleva un registro de la mortalidad observada. Por lo que se han propuesto métodos para determinar la virulencia o un indicador de esta mediante el análisis de su genoma viral. Sano y colaboradores (1992) determinaron que el segmento A del genoma del virus incluye genes que codifican para factores de virulencia. Bruslind y Reno (2000) realizaron una infección experimental en 400 alevines de trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*) con tres cepas del genotipo Buhl (Genogrupo 1). La exposición al virus duró 62 días y ocasionó mortalidad acumulada de 67%, 78% y 93%, siendo ésta última estadísticamente significativa, considerándola una cepa virulenta. Se secuenciaron los genes de las proteínas VP2 y VP3 para determinar los posibles determinantes de virulencia. Los autores sugirieron que la causa más probable de la variación en la virulencia de estas 3 cepas es la posición 217 en el gen de la proteína VP2, debido a que la cepa virulenta presento treonina en la posición 217, mientras que las cepas menos virulentas (moderadamente virulentas) tenían el residuo alanina en esa posición. En el trabajo realizado por Santi y colaboradores (2004), se determinó la mortalidad ocasionada

por nueve aislamientos noruegos del serotipo Sp, a partir de una infección experimental realizada en alevines de la especie *Salmo salar*. Se amplificó y secuenció por completo el segmento A, tanto de los aislados originales como de estos mismos recuperados, luego de realizar la infección. Se determinó que los aislados virulentos presentaban residuos de treonina en la posición 217 y de alanina en la posición 221, y los aislados avirulentos mostraban el residuo prolina en la posición 217. Además, los autores sugirieron que los aislados virulentos poseían una proteína VP5 truncada de aproximadamente 12 kDa, al encontrar esta característica en 4 de 5 aislados que ocasionaron una alta mortalidad. Posteriormente, en otra investigación, mediante la creación de tres recombinantes genéticos del serotipo Sp: uno que codificaba para la proteína VP5 de 15 kDa, otro que no poseía el codón de inicio para sintetizar la proteína VP5 y tercero que codificaba para la proteína VP5 truncada de 12 kDa, descartaron cualquier correlación de la proteína VP5 con la virulencia del virus, lo anterior debido a que las tres cepas recombinantes ocasionaron mortalidades en post-smolt de salmón sobre el 80% (Santi *et al.*, 2005).

Song y colaboradores (2005) estudiaron la importancia de los aminoácidos en las posiciones 217 y 221 mediante la utilización de varios aislamientos de virus recombinantes del serotipo Sp, y además realizaron nueve pases seriados en células CHSE-214 para descubrir la importancia de la posición 221 en la virulencia y atenuación del virus. Estos virus recombinantes fueron inoculados en alevines de *Salmo salar* silvestre y, posterior al desarrollo de la infección durante 32 días, fueron recuperadas nuevamente para su aislamiento y secuenciación. Se determinó que la combinación de ciertas posiciones de residuos de aminoácidos determinaba la virulencia: las cepas que presentaron treonina en posición 217 y alanina en posición 221 fueron virulentas, ocasionando en 70% de mortalidad, las cepas con sustitución prolina 217 y alanina 221 mostraron una virulencia moderada (47% de mortalidad) y las cepas que presentaron treonina 221 fueron avirulentas independiente del residuo en posición 217. Adicionalmente se descartó que la posición 247 estuviera



directamente correlacionada con la virulencia. No obstante, en los trabajos de Dadar *et al.* (2013) y Dadar *et al.* (2014) se ha clasificado la mortalidad de los aislados secuenciados como de moderada virulencia, a pesar de mostrar treonina 221, asociada a aislados avirulentos. Estos autores sugieren la relación de esta virulencia moderna al residuo alanina en la posición 247.

Posteriormente, Mutoloki y colaboradores (2016), investigaron la asociación entre la manifestación clínica de la enfermedad y el gen que codifica para la proteína VP2 del virus. Para ello, se cultivaron peces de la especie salmón del Atlántico, por un período de tres años, tanto en agua dulce como en agua de mar, los cuales fueron situados en lugares cuyo historial, en relación a la enfermedad, era de muy alto o de muy bajo riesgo. Los virus aislados de peces con manifestaciones subclínicas presentaron el siguiente motivo de virulencia, P217T221A247, en cambio aquellos virus que fueron aislados de peces con claros signos de la enfermedad presentaron un motivo altamente virulento, T217A221T247. Los análisis filogenéticos presentaron dos clados: uno asociado a los aislados subclínicos y otro relacionado con los aislados que provocaron signos evidentes de la enfermedad. Además, este estudio se refiere a dos hallazgos importantes: por un lado, un grupo de peces infectados con el VNPI en agua dulce, presentan signología al ser trasladados al agua de mar. Asimismo, se ha visto que los sitios de agua dulce y marina pueden convertirse en reservorios del VNPI, por lo que son fuentes de infección.

La sustitución en la posición 221, además de estar relacionada con la virulencia de una cepa, también está involucrada en la persistencia de la infección (Song *et al.*, 2005), ya que se ha observado una rápida sustitución del aminoácido Alanina, que es el que se correlaciona con la virulencia, por el aminoácido treonina. Esta sustitución se detectó luego de dos pases del virus en cultivo en células CHSE-214, e incluso se mantuvo luego de realizados 10 pases (Santi *et al.*, 2005).

Los autores explican esta situación asociando al residuo 221 la función de reconocer al respecto que media la entrada del virus a las células CHSE-214, pero no así para la línea celular RTG. Esta misma situación, incluso, se ha observado en peces portadores (Song *et al.*, 2005). Santi y colaboradores (2004), manifestaron que el virus cambia y esto le permite sobrevivir largo tiempo en el hospedador, por ejemplo: en situaciones en que hay pocos hospederos disponibles para infectar. Aun así, en este trabajo los virus del genotipo 5 mostraron en la posición 217 el aminoácido treonina que se relaciona con virulencia, pero en el residuo 221 se observó casi la misma proporción de alanina y treonina en posición 221, además que dos aislados mostraban c como residuo en esa posición, a pesar de que la mayoría de los aislados se recuperaron luego de dos o cuatro pases. En el trabajo de Santi y colaboradores (2004), obtuvieron diferentes sustituciones en la posición 221 después de dos pases para nueve aislados del serotipo Sp, por lo que proponen que es el resultado de una constante presencia de clones que están siendo seleccionados para adaptarse al cultivo.

A pesar de que mayoritariamente se ha determinado que el segmento A del genoma del virus es el responsable de la virulencia, se han encontrado aislamientos virulentos en la especie *Salmo salar* con residuos de Prolina en la posición 217 y alanina en residuo 221 (Smail *et al.*, 2006), por lo que es muy probable que existan otros determinantes para reconocer cepas virulentas, posiblemente en el segmento B del virus. Liu y Vakharia (2004) mostraron que en el IBDV (*Infectious Bursal Disease Virus*), perteneciente a la misma familia *Birnaviridae*, la proteína CP1 está involucrada en la eficiencia de la replicación viral, además que modula su virulencia *in vitro*. Asimismo, Shivappa *et al.* (2004) sugiere la posibilidad de que la proteína VP1 pueda tener un rol en la virulencia del VNPI. Los resultados de la infección experimental en alevines y post-smolt de *Salmo salar* realizadas en su trabajo mostraron que el aislamiento que presentó mayor virulencia, 79% de mortalidad acumulada en post-smolts, tenía las sustituciones treonina 217 y treonina 221. En cambio, el aislamiento que ocasionó una mortalidad moderada, 46% en post-smolts,

mostró las sustituciones prolina 217 y alanina 221, al igual que el aislado virulento. Por esta razón los autores sugirieron que no era posible explicar la virulencia del virus solo basándose en VP2, y consideraron que VP1 podía aportar información al respecto, ya que encontraron que los dos aislados virulentos diferían en las mismas posiciones 125,154 y 240 en VP1 en contraste con la cepa avirulenta.

#### **4.1.2 Impacto del VNPI en la truticultura**

El VNPI provoca la necrosis pancreática infecciosa, una enfermedad viral aguda y altamente contagiosa de los salmónidos jóvenes, tiene una importancia económica para la industria acuícola de salmónidos, tiene una distribución mundial y se presenta más en las granjas de salmónidos de América del Sur y Norte, Europa y Asia (Crane y Hyatt, 2011; Sahoo y Goodwin, 2012). Actualmente, el VNPI y la NPI, se consideran de distribución mundial (Figura 10).

Las epizootias ocurren en los criaderos donde gran número de peces comparten estanques. Los alevines son los más susceptibles, los brotes ocurren comúnmente en el momento en que los alevines empiezan a alimentarse a las tres o cuatro semanas después del contacto y pueden dar como resultado mortalidades superiores al 90%. Los peces mayores de seis meses, infectados, generalmente el cuadro es subclínico sin mortalidad. Estos peces y los alevines sobrevivientes de brotes, se convierten en portadores de por vida y son reservorios de nuevas infecciones. A pesar de la respuesta inmune humoral, el VNPI se encuentra en la mayoría de los órganos viscerales y periódicamente se liberan virus en las heces y a través de los fluidos gonadales (Munro y Midtlyng, 2011).

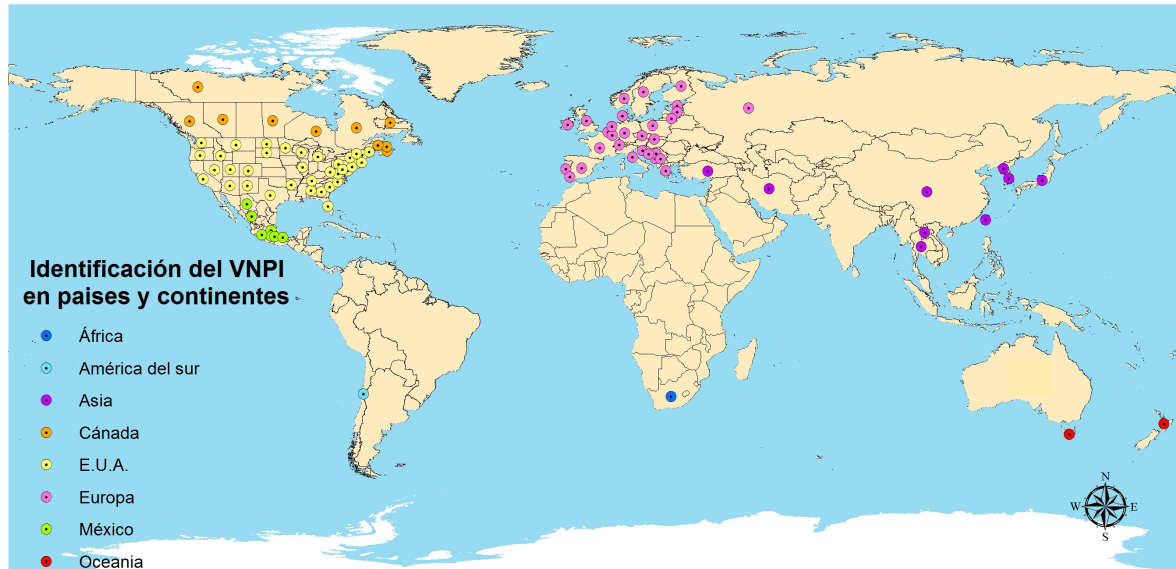


Figura 10. Identificación del virus de la necrosis pancreática infecciosa en países y continentes. Figura propia de la tesina, autores: Pérez-Lozano M y Pérez-Lozano AA, 2018. **África:** Sudáfrica (Bragg y Combrink, 1988). **América del Sur:** Chile (McAllister y Reyes, 1984). **Asia:** China (Jiang *et al.*, 1989), Irán (Akhlaghi y Hosseini, 2007), Japón (Sano, 1971), Laos (Wattanavijarn *et al.*, 1988), República de Corea (Hah *et al.*, 1984), Tailandia (Wattanavijarn *et al.*, 1988), Taiwán (Hedrick *et al.*, 1983), Turquía (Candan, 2002). **Canadá:** Alberta, Columbia Británica, Manitoba, Nuevo Brunswick, Terranova y Labrador (M'Gonigle, 1940), Territorios del Noroeste, Nueva Escocia, Ontario, Isla del Príncipe Eduardo, Quebec (Reno, 1999). **E.U.A.:** Alabama, Arizona, Arkansas, California, Carolina del Norte, Carolina del Sur, Colorado, Connecticut, Florida, Dakota del Norte, Dakota del Sur, Georgia, Idaho, Illinois, Maine, Maryland, Massachusetts, Michigan, Minnesota, Montana, Nevada, Nuevo Hampshire, Nueva Jersey, Nuevo México, Nueva York, , Oregón, Pennsylvania, Isla Rhode, Tennessee, Texas, Utah, Vermont, Virginia, Washington, Virginia del Oeste, Wisconsin (Reno, 1999). **Europa:** Alemania (Schlotfeldt *et al.*, 1975), Checoslovaquia (ex) (Pospisil *et al.*, 1986), Dinamarca (Vestergård-Jørgensen y Bregnballe, 1969), España (Pérez y Rodríguez, 1997), Francia (Besse y de Kinkelin, 1965), Grecia (Varvarigos y Way, 2002; Varvarigos *et al.*, 2011), Italia (Ghittino, 1972), Irlanda (Ruane *et al.*, 2009), Kosovo (Rexhepi *et al.*, 2011), Noruega (Hastein y Krogsrud, 1976), Países bajos (Haenen *et al.*, 2016), Países bálticos (Lituania, Finlandia) (Lvov *et al.*, 2015), Portugal (Sousa *et al.*, 1996), Polonia (Antychowicz *et al.*, 2000), Reino Unido (Ball *et al.*, 1971), República Checa (Reschova *et al.*, 2008), República Croata, Bosnia, Herzegovina (Lojkić, *et al.*, 2012), Rusia (Múrmansk) (Shchelkunov, 2006), Suecia (Ljungberg y Vestergård-Jørgensen, 1973), Suiza (Mortensen *et al.*, 1993), Yugoslavia (Serbia y Montenegro), Bélgica, Finlandia, Luxemburgo (Reno, 1999). **México:** Chihuahua, Durango (Ortega *et al.*, 2013), Estado de México (Ortega *et al.*, 2002), Hidalgo, Morelos, Michoacán, Puebla, y Veracruz (Ortega *et al.*, 2013). **Oceanía:** Nueva Zelanda (Tisdall y Phipps, 1987; Anderson, 1996; Anderson, 1998; Horner, 2003), Tasmania (Crane *et al.*, 2000).

Fuente: Proyecto CONACYT, CB-257781, responsable técnico Celene Salgado Miranda.

Las epizootias o brotes ocurren regularmente en criaderos que utilizan huevos de reproductores portadores del virus o utilizan aguas superficiales

habitadas por peces portadores. Las condiciones ambientales estresantes, como la temperatura, la nutrición, la salinidad, el limo, el hacinamiento, etc., frecuentemente agravan la infección por VNPI. Los *Aquabirnavirus* (VNPI y virus tipo VNPI) están distribuidos globalmente a partir de 1993, el virus ha sido aislado de 16 especies de salmónidos, 38 especies de no salmónidos y 12 especies de mariscos. En los peces no salmónidos, la infección por el *Aquabirnavirus* no causa signos clínicos excepto en la cola amarilla, arenque americano y la anguila. Aunque el virus ha sido aislado de varios mariscos, sólo se ha demostrado que causa cambios patológicos en las ostras (*Ostrea edulis*) y en los moluscos bivalvos (*Tellina tenuis*) (Eskildsen y Vestergård-Jørgensen, 1973).

#### **4.1.3 Otros birnavirus**

Los otros virus que pertenecen a la familia *Birnaviridae*, provocan también enfermedades y pérdidas económicas: la enfermedad infecciosa de la bolsa de Fabricio o también denominada enfermedad de Gumboro, es una infección viral aguda y altamente contagiosa de los pollos jóvenes. Se caracteriza por la destrucción de las células linfoides (principalmente linfocitos B y sus precursores) en la bolsa de Fabricio. La bolsa de Fabricio, es un órgano pequeño, ciego y semejante a un saco, ubicado en la pared superior de la cloaca, es importante en el sistema inmunitario de las aves jóvenes, ya que en este órgano los linfocitos productores de anticuerpos B se desarrollan y maduran. Los pollitos susceptibles menores a tres semanas no presentan signos clínicos, pero presentan un cuadro subclínico que es económicamente importante como resultado de la inmunosupresión severa. Las aves enfermas eliminan el virus a través de las heces, y la ingesta oral de alimento contaminado, asegura la propagación de la infección a aves sanas. La resistencia del virus al calor, a la desecación y una no correcta desinfección, explica la presencia del virus en el ambiente. No se ha reportado la transmisión vertical del virus a través del huevo, y no existe evidencia de que las aves recuperadas queden infectadas. El virus ha sido detectado en otras aves domésticas como: pavos y patos, causando infección subclínica sin

inmunosupresión. El virus no afecta a los seres humanos y no tiene importancia para la salud pública. En las granjas avícolas, los brotes iniciales son los más agudos y los brotes recurrentes son menos graves y con frecuencia no se detectan. El período de incubación es corto, y los signos clínicos de la enfermedad se observan a los dos a tres días después de la exposición. En las poblaciones altamente sensibles, la enfermedad aparece repentinamente y la tasa de morbilidad puede alcanzar el 100%. La mortalidad acumulada puede estar entre 20 y 30%, por lo general el pico se observa entre el quinto y séptimo día después de la infección (Etteradossi y Saif, 2013). *Drosophila melanogaster*, es el hospedero natural de VDX. El virus fue descubierto como contaminante de las colonias de moscas de la fruta en Francia en 1976 (Teningeset *et al.*, 1979). Las moscas infectadas se vuelven sensibles a la anoxia y finalmente mueren. El virus se transmite tanto horizontal como verticalmente. La distribución geográfica es desconocida. Los órganos diana no se conocen con exactitud, aunque el virus ha sido observado por microscopía electrónica en secciones delgadas de varios órganos de moscas infectadas (Dobos, 2001).

## **4.2 NATURALEZA DEL DAÑO: RESPUESTA INMUNE DEL HOSPEDERO**

El sistema inmune de los peces teleósteos comparte componentes con los mamíferos y aves. Sin embargo, tienen sus particularidades. A continuación, revisamos de manera general el sistema inmune de estos peces.

### **4.2.1 Órganos linfoides en peces teleósteos**

Los peces teleósteos carecen de médula ósea y ganglios linfáticos, no siendo posible diferenciar entre órganos hematopoyéticos y órganos linfoides primarios y secundarios. Algunos autores denominan a los órganos que ejercen estas funciones como órganos linfo-hemopoyéticos y otros como órganos linfoides. Los principales órganos linfoides en peces teleósteos son: timo, riñón y bazo (Figura 11) (Bone y Moore, 2007).

Timo: órgano par, homogéneo, localizado en la comisura dorsal del opérculo. La histogénesis del timo comienza varios días antes de la eclosión en la trucha arcoíris, pero hasta los 14 días post-eclosión no se observan células linfoides diferenciadas. Mediante la timectomización de truchas de diversas edades, se ha demostrado la implicación del timo en la respuesta celular y humoral a lo largo de la vida de los peces hasta que son adultos (Vega *et al.*, 2010).

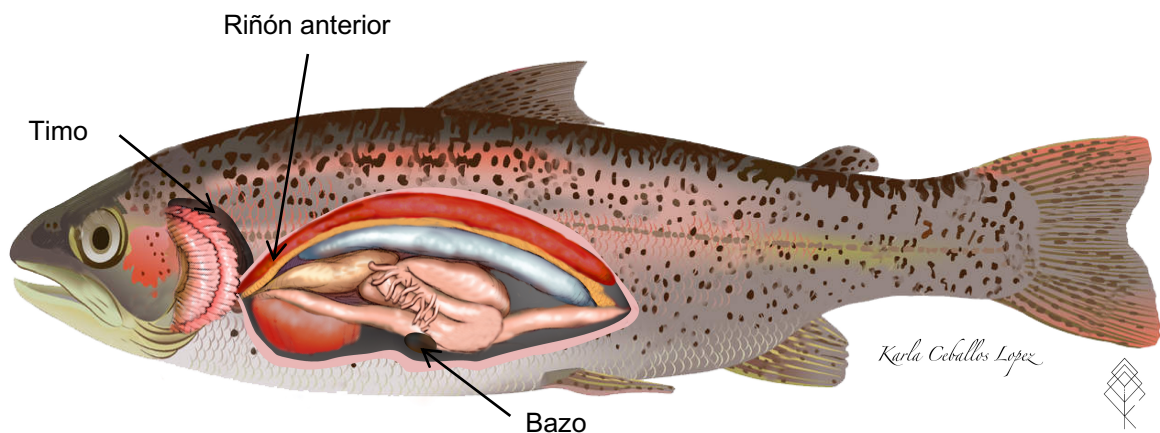


Figura 11. Órganos linfoides de un pez teleosteo. Figura propia de la tesina.  
Fuente: Proyecto CONACYT, CB-257781, responsable técnico Celene Salgado Miranda.

Riñón: el riñón cefálico es el órgano hematopoyético primario de los peces y es el principal sitio de diferenciación de eritrocitos, granulocitos, linfocitos B y monocitos. Asimismo, es el principal órgano productor de anticuerpos. Es el análogo de la médula ósea, de los ganglios y en parte de la glándula adrenal de los vertebrados superiores (Vega *et al.*, 2010).

Bazo: órgano abdominal único, aunque en ocasiones pueden encontrarse dos o más bazos menores. La función inmune del tejido linfoide esplénico ha sido motivo de controversia, principalmente por las diferencias encontradas entre las distintas especies. Estudios ontogénicos en el salmón del Atlántico, carpa y trucha

arcoíris, sugirieron que el bazo no es esencial en la maduración inmunológica (Vega *et al.*, 2010).

Los mecanismos de inmunidad existen en múltiples y variadas formas a lo largo de la evolución, desde los organismos pluricelulares los más primitivos hasta los organismos superiores. Las células fagocíticas y algunas moléculas en circulación son parte importante de la inmunidad innata que aparece temprano y se conserva en especies superiores. La inmunidad innata es la primera línea de defensa contra las infecciones en vertebrados. Los peces no mandibulados presentan solo inmunidad innata (Vega *et al.*, 2010).

El epitelio intacto y el moco forman la barrera de defensa primaria del pez contra parásitos, bacterias y hongos. El moco contiene carbohidratos, péptidos antibacterianos (defensinas) y proteínas, principalmente mucina, precipitinas, aglutininas, proteína C reactiva y lisozima, las células constituyen una barra de defensa química primaria (Vega *et al.*, 2010).

Los péptidos antimicrobianos de 12 a 50 aminoácidos, tienen actividad sobre bacterias, hongos, virus y protozoarios. Estos péptidos también participan en la respuesta inflamatoria, incluyendo el reclutamiento de neutrófilos y fibroblastos, la desgranulación de células cebadas, el incremento de la actividad fagocítica y la disminución de la fibrinólisis (Vega *et al.*, 2010).

Existen otras moléculas que contribuyen a la respuesta inmune innata en la superficie epitelial y el moco de muchas especies de peces. Algunas de estas moléculas son anticuerpos, apolipoproteínas, varias isoformas de lisozima, compuestos antimicrobianos como la escualamina (Vega *et al.*, 2010). La escualamina es un esteroide catiónico, identificado por primera vez en el tiburón cazón espinoso común (*Squalus acanthias*) (Moore *et al.*, 1993) y en los leucocitos de sangre periférica del bagre (Vega *et al.*, 2010). Muchos de los compuestos



catiónicos de los peces teleósteos se han aislado de células epidérmicas o secreciones de la piel, branquias e intestino (Vega *et al.*, 2010).

Los eosinófilos y los basófilos participan de manera importante en la defensa antiparasitaria y en la inflamación que se amplifica cuando vierten el contenido de sus gránulos citoplásmicos al medio extracelular. Las citosinas participan también de manera importante en los procesos inflamatorios que ocurren en peces. Entre las citosinas proinflamatorias que se liberan como consecuencia del daño en las barreras membranales en peces se han descrito las interleuquinas (IL) 1 y 6, y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). Otras citoquinas que se han identificado en peces son las citosinas antiinflamatorias IL-10 y otra, semejante a la IL-4, cuya presencia y función caracteriza la respuesta de linfocitos cooperadores de tipo 2 (Th2) en mamíferos (Vega *et al.*, 2010).

Un elemento humoral muy importante de la inmunidad innata en peces, es el sistema del complemento, el cual se puede activar por tres vías: la vía clásica (dependiente de anticuerpos), la vía alterna y la vía de la lectina (Vega *et al.*, 2010).

A partir de los teleósteos aparece un nuevo sistema de defensa mucho más complicado, la inmunidad adaptativa, que incluye mayor número de células participantes y una gran diversidad de ligandos y receptores celulares. La inmunidad innata provee la primera línea de defensa y es responsable por la eliminación de la mayor parte de microorganismos infectantes. Esta respuesta da tiempo a que se desarrolle la inmunidad adaptativa, que a su vez aumenta y potencia los mecanismos de inmunidad innata, haciendo más eficiente la respuesta inmunológica (Vega *et al.*, 2010).

La inmunidad adaptativa se favoreció con la aparición de los linfocitos y su capacidad de auto renovación y expansión clonal. Los linfocitos B y T tienen una enorme variedad de receptores (BCR y TCR, respectivamente) para antígeno que

se genera por recombinación somática de genes de línea germinal. La respuesta de los linfocitos T requiere de la presentación antigénica por macrófagos, fenómeno que ya se presenta en peces. En peces, los genes que codifican para los productos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés: *Major Histocompatibility Complex*) de clase I y del MHC de clase II se encuentran en cromosomas diferentes. La existencia de dos tipos de MHC implica la diferenciación de dos poblaciones funcionales de linfocitos T, cooperadores y citotóxicos (Vega *et al.*, 2010).

La inmunoglobulina de membrana con función de receptor en los linfocitos B es en forma predominante de clase M. La IgM en secreciones se presenta como un tetrámero, mientras que en suero se encuentra en forma monomérica y en ocasiones como dímero (Vega *et al.*, 2010).

Los linfocitos de los peces tienen memoria de corto plazo, pero son incapaces de cambiar de isotipo de inmunoglobulina. Los anticuerpos son de baja afinidad y su heterogeneidad es pequeña, a pesar de la recombinación somática (Vega *et al.*, 2010).

#### **4.2.2 Respuesta inmune de los peces teleósteos**

La respuesta inmune en los peces se ve afectada por factores que dependen del propio organismo (factores intrínsecos) y factores ambientales (extrínsecos).

##### **4.2.2.1 Factores intrínsecos**

Se dividen en: edad, nutrición, ciclo de maduración sexual, estrés y niveles hormonales. Los factores extrínsecos: la temperatura, contaminantes inorgánicos y contaminantes de origen orgánico (Vega *et al.*, 2010).

Edad: los peces teleósteos no son a nivel inmunológico competentes hasta varias semanas después de la eclosión. Los huevecillos dependen mientras tanto

de las inmunoglobulinas maternas. Luego aparecen los macrófagos y después los linfocitos. Por ejemplo, en el salmón del Atlántico la actividad linfocitaria es detectable hasta que el riñón y el bazo se desallorran (Vega *et al.*, 2010). En los alevines alrededor de los 20 a 30 días posteriores a la eclosión. Se ha observado que en crías de trucha arcoíris infectadas con una cepa patogénica y virulenta como la Sp, la mortalidad disminuye con la edad; así como con la temperatura del agua (Dorson y Torchy, 1981).

**Nutrición:** las deficiencias vitamínicas de ácidos ascórbico y vitamina E, afectan de manera negativa los mecanismos de inmunidad, de modo principal la actividad de los macrófagos y el complemento (Vega *et al.*, 2010).

**Ciclos de maduración sexual y niveles hormonales:** el sistema inmune se ve gravemente comprometido durante la maduración sexual y la época reproductiva. Los cambios fisiológicos que se producen implican un incremento en los niveles plasmáticos de corticoides y esteroides sexuales, hormonas capaces de afectar el funcionamiento del sistema inmune y producir cambios en la epidermis, que influye en la resistencia superficial (Vega *et al.*, 2010).

**Estrés:** es una respuesta adaptativa del organismo que produce cambios en el sistema de defensa. Cuando es muy agudo o prolongado, conlleva la supresión o un desarrollo desmesurado de la respuesta inmune, lo que puede desequilibrar al resto de los sistemas fisiológicos y producir una enfermedad (Vega *et al.*, 2010).

**Niveles hormonales:** los corticoesteroides, sobre todo el cortisol y neutrofilia. La disminución de células linfoides ocasiona retrasos en la respuesta inmune primaria y secundaria. Los corticoides también inhiben la migración y proliferación *in vitro* de linfocitos. Los andrógenos producen hiperplasia de la epidermis y descenso en la secreción de moco en machos sexualmente maduros, lo que ocasiona un descenso en sus defensas (Vega *et al.*, 2010).

#### 4.2.2.2 Factores extrínsecos

Temperatura: la temperatura afecta el desarrollo de la respuesta inmune innata y adaptativa en animales ectotermos, como los peces. Bajas temperaturas pueden disminuir parcialmente o del todo la producción de anticuerpos. Los linfocitos T son los más afectados por la baja temperatura, afectando también la producción de anticuerpos. Sin embargo, el procesamiento y la presentación del antígeno y la proliferación de las células B, son independientes de la temperatura. Los efectos causados por las bajas temperaturas provocan que el sistema inmune disminuya en invierno. Además, cambios en el fotoperíodo relacionadas con las variaciones estacionales también afectan su sistema inmune (Vega *et al.*, 2010).

Las alteraciones del sistema inmune ocasionan un incremento en la susceptibilidad de los peces a las infecciones por pseudohongos acuáticos. Las Saprolegniales aparecen con mayor prevalencia en las épocas de temperaturas frías (10 a 12 °C) (Vega *et al.*, 2010).

Contaminantes inorgánicos: las altas concentraciones de metales pesados como son el cadmio, el mercurio y cobre, tienen efectos negativos sobre la actividad y los niveles de lisozima en macrófagos. Algunos compuestos conocidos por su inmunotoxicidad hacia otras especies, son también inmunotóxicos para los peces. Los insecticidas organoclorados, organofosforados y herbicidas, pueden producir leucopenia, atrofia de órganos linfoides y supresión de la respuesta humoral en peces (Vega *et al.*, 2010).

Contaminantes de origen orgánico: fenoles, tributilos, hidrocarburos aromáticos y bifenilos policlorados pueden producir leucopenia y algunos otros efectos negativos como alteraciones en la respuesta humoral y la actividad de macrófagos. La magnitud y duración de estos efectos dependen del tiempo de exposición y concentración del contaminante (Vega *et al.*, 2010).

#### 4.2.3 Respuesta inmune ante el virus de la necrosis pancreática infecciosa

Woo y Bruno (2006), consideran que la respuesta inmune generada al VNPI, es medible; sin embargo, algunas veces insuficiente para conferir una protección eficaz. En los peces infectados naturalmente por el VNPI, así como en los peces experimentales, se observa una respuesta inmune humoral por medio de anticuerpos neutralizantes (Wolf y Quimby, 1969; Yamamoto 1975; Reno *et al.*, 1978).

Sadasiv (1995), investigó las respuestas inmunológicas de salmónidos al VNPI e hizo hincapié en la falta de anticuerpos humorales neutralizantes, apuntando hacia la capacidad del virus para infectar leucocitos de forma persistente, y abordó un potencial paralelo a la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBD) (Woo y Bruno, 2006). La recurrencia de la replicación viral y las enfermedades clínicas posteriores al estrés (Roberts y McKnight, 1976; Stangeland *et al.*, 1996) y el VNPI conlleva a la súper infección (Taksdal *et al.*, 1998), mientras la inmunidad adquirida naturalmente contra el VNPI permanece baja (Woo y Bruno, 2006).

Las respuestas de anticuerpos que neutralizan la infectividad del VNPI *in vitro* se demuestran fácilmente en salmónidos infectados naturalmente (Vestergård-Jørgensen, 1973; Yamamoto, 1975; Smail y Munro, 1985) y, aunque existe una variabilidad significativa, se han notificado títulos de neutralización superiores a 1000 (Mangunwiryo y Agius, 1988).

Como se mencionó antes, los mecanismos de inmunidad en los peces poiquilotermos dependen en gran medida de la temperatura ambiental, pero se han encontrado buenas respuestas neutralizantes contra el VNPI en trucha arcoíris mantenida a 6 °C (Sadasiv *et al.*, 1993). Mientras que los principales epítomos de neutralización están localizados en la proteína VP2 (cápside) (Tarrab *et al.*, 1995),

Park y Jeong (1996) encontraron que VP3 también contenía sitios neutralizantes. Front *et al.*, (1998) informaron que los epítomos VP2 y VP3 fueron reconocidos fácilmente por sueros de peces infectados por el VNPI.

Asimismo, se ha reportado que los VNPI inducen una respuesta rápida y persistente en la expresión de transcritos de los genes que codifican para las proteínas antivirales Mx, las cuales posteriormente son detectadas en órganos como el hígado, riñón y branquias, así como altos niveles de interferón (INF) (Lockhart *et al.*, 2007; Das *et al.*, 2007). Estudios posteriores mostraron que la inducción de Mx fue alta en el tejido hepático de las truchas, coincidente con la aparición de mortalidad inducida por el VNPI, en comparación con las truchas jóvenes, que se mantuvieron saludables y con bajos títulos del virus (Lockhart *et al.*, 2007). En el lenguado senegalés, en el que la transcripción de Mx fue inducida por poli I:C, reveló una replicación de birnavirus reducida en la infección experimental (Fernández-Trujillo *et al.*, 2008). Das y colaboradores (2007), demostraron las proteínas Mx por inmunohistoquímica en tejido hepático, renal y branquial en truchas infectadas con el VNPI que también expresaban altos genes de interferón y transcripciones de genes Mx.

También se debe observar que el VNPI solo y los experimentos de coinfección del VNPI con el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (VNHI) en trucha arcoíris produjeron una fuerte expresión de Mx en riñón, hígado y bazo, y los peces que habían sido estimulados con poli I:C siete días antes mostraron una mortalidad reducida para ambos virus (Rodríguez y Perez-Prieto, 2007). La trucha inicialmente infectada con el VNPI también mostró ser refractaria a la infección experimental con VNHI cuatro días después (Byrne *et al.*, 2008).

#### **4.2.3.1 Infección persistente del virus de la necrosis pancreática infecciosa**

En un experimento que duró 10 meses, peces infectados con el VNPI, no presentaron signos clínicos mientras se mantuvieron en agua dulce; sin embargo,

al ser transferidos al agua de mar, el 24% de los peces no vacunados murieron debido al VNPI, en comparación con los peces vacunados, en los que se registró 7% de mortalidad (Johansen *et al.*, 2009).

En contraste con el VEIB del pollo, el VNPI no parece provocar en los salmónidos inmunodepresión de ningún grado (Woo y Bruno, 2006).

LaPatra *et al.* (2000), usaron al pez cebra (*Danio rerio*) como modelo y demostraron que la infección con el VNPI produjo una toxicidad transitoria en los precursores hematopoyéticos y en la diferenciación terminal de las células rojas. Esto no ha sido estudiado en salmónidos. Sin embargo, debido a la gama de hospederos que el virus tiene, en ocasiones no es fácil identificar la respuesta que el microorganismo provoca en ellos.

## V. TRUTÍCULTURA MEXICANA

### 5.1. LA PRODUCCIÓN DE TRUCHA ARCOÍRIS

El cultivo de trucha arcoíris en los Estados Unidos Mexicanos, inició a finales del siglo XIX en el primer vivero natural en Chimela, Lerma, Estado de México. En 1937, se formalizó la reproducción de la especie con la creación de un centro piscícola en Salazar, Lerma, el cual en 1943 se convirtió en el centro acuícola El Zarco (SAGARPA, 2013). A partir de entonces se inició la producción controlada de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), que dio como resultado que se ampliara su distribución geográfica. El cultivo se lleva a cabo en lugares de clima frío principalmente, en lagos y lagunas con aguas limpias, frías y cristalinas en lugares con altitud superior a los 1500 m s.n.m. (SAGARPA, 2012a). Se recomienda una densidad de 20 a 25 kg/m<sup>2</sup> a 10 °C. Se siembran crías de 5.0 a 8.0 cm (SAGARPA, 2012b). Debido a la alta demanda del producto trucha arcoíris y a la falta de crías nacionales, nuestro país importa de manera continua huevo oculado. En el 2010 importó 11,570,000 huevos oculados de trucha arcoíris procedente de los Estados Unidos de América (SAGARPA, 2012b).

Las entidades federativas que destacan en el cultivo la trucha arcoíris son: Michoacán, México, Veracruz, Puebla, Tamaulipas, Chihuahua, Hidalgo, Durango y Guerrero. En los últimos 10 años, la producción de trucha arcoíris ha tenido una tasa media de crecimiento anual de producción de 9.16%; por su volumen se encuentra posicionada en el lugar 16 de la producción pesquera nacional sin embargo, por su valor se encuentra en el lugar cinco (SAGARPA, 2014). En el 2018, la producción nacional de la trucha arcoíris, registró 19 mil 118 toneladas producidas, con valor de 876 millones de pesos (SAGARPA, 2018).

En México, la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), en ambientes silvestres; se encuentra incluida en la NOM-059-SEMARNAT-2010, como especie



“sujeta a protección especial” (Pr), por lo que su regulación le compete a la SEMARNAT, a través de la Dirección General de Vida Silvestre, y su manejo y aprovechamiento sustentable sólo puede ser a través de Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) y deberá sujetarse a lo dispuesto en la Ley General de Vida Silvestre y su Reglamento (SAGARPA, 2012b), por lo que es primordial su protección.

En los años 80's en la presa Corra de Piedra se introdujo el cultivo de trucha, iniciando con 20 granjas, hasta en 25 de febrero de 2010 se registraron 58 granjas, donde se producen alrededor de 950 toneladas por año (SAGARPA, 2010); siendo actualmente uno de los principales municipios productores de la especie. A partir de un análisis sobre el desarrollo de la producción de trucha arcoíris en la zona centro de México, se concluye que la producción de trucha es un caso de éxito, proporciona un producto de alto valor económico y nutricional, y permite diversificar las actividades productivas de comunidades rurales (García-Mondragón, 2013). Para continuar con este crecimiento agropecuario, se requiere aplicar tecnologías eficientes y procesos de innovación, modernización y hacer una reconversión productiva realista (APROMAR, 2014; FAO, 2014).

## **5.2. EL VIRUS DE LA NECROSIS PANCREÁTICA INFECCIOSA EN MÉXICO**

En México, el VNPI fue aislado por primera vez en el 2000 a partir de crías de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) importadas de los Estado Unidos de América (EUA) (Ortega *et al.*, 2002). A la fecha, el VNPI se ha reportado en las siguientes entidades: México, Hidalgo, Morelos, Michoacán, Puebla, Chihuahua, Durango y Veracruz (Ortega *et al.*, 2013). A la fecha, en México se desconoce el número de peces que han sido afectados por el virus, así como tampoco se tiene registradas las pérdidas económicas debido al VNPI. Sin embargo, se sabe que entre el 2001 y el 2002, se identificó en crías de trucha arcoíris importadas de los Estados Unidos de América, la presencia de la cepa Buhl del virus de la necrosis

pancreática infecciosa, y que estas crías fueron movilizadas a unidades de producción de trucha, localizadas en varias entidades federativas del país (PROY-NOM-045-PESC-2003). A tal grado, que en el centro acuícola El Zarco, unidad nacional de reproducción de trucha arcoíris, dependiente de la Dirección General de Organización y Fomento de la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca, y principal productor de crías de trucha arcoíris, se diagnosticó el virus de la necrosis pancreática infecciosa en el 2002, en 181 organismos de 638 peces reproductores que se incluyeron en el muestreo. Ante la presencia del VNPI, se realizó la eutanasia del total de los reproductores del centro acuícola El Zarco; 16,339 ejemplares, con una biomasa de 12,437 kilogramos; asimismo, con el objetivo de erradicar el VNPI, se realizó la limpieza, desinfección y remodelación de las instalaciones del centro acuícola, para posteriormente proceder al repoblamiento con ejemplares certificados libres del VNPI (PROY-NOM-045-PESC-2003).

La sanidad acuícola juega un papel muy importante en este ámbito ya que la prevención de las enfermedades es el mejor elemento de control y juega un papel muy importante en los cultivos acuícolas. Las estrategias deben enfocarse más en la prevención que en el tratamiento de las enfermedades (SAGARPA, 2012b). Algunos de los aspectos más importantes de las buenas prácticas de producción acuícola son: a) utilizar huevos y crías certificados; b) oxigenación mayor a 5.5 mg/l; c) densidades de siembra adecuadas; d) agua limpia y con adecuada presión; e) desechar y enterrar los peces muertos o enfermos lejos del centro de producción; f) desinfectar el material utilizado en el cultivo; g) control adecuado de la alimentación; h) monitoreo mensual de la calidad del agua; i) prohibir animales domésticos en las instalaciones (SAGARPA, 2012b).

La descripción de la patogenia del virus de la necrosis pancreática infecciosa con base en los criterios de la teoría de Casadavall y Pirofski (2003), puede contribuir a establecer medidas para prevenir la introducción y controlar la dispersión de esta enfermedad de alto impacto en la truticultura nacional.

## CONCLUSIONES

La presente revisión bibliográfica sistemática y exhaustiva, describe la patogenia del virus de la necrosis pancreática infecciosa, con base en la teoría respuesta – daño, propuesta por Casadevall y Pirofski; la cual se basa en:

- a) la patogenia microbiana es resultado de la interacción entre un hospedero y un microorganismo,
- b) el resultado patológico en el hospedero, debido a la interacción hospedero-microorganismo, se determina por la cantidad de daño producida en el hospedero, y
- c) el daño en el hospedero resulta de factores microbianos y de la respuesta inmune del hospedero.

Para que se inicie la patogenia microbiana, el hospedero y el microorganismo deben interactuar. En el caso del VNPI, esto sucede principalmente por medio del agua en la que se encuentran los peces, o bien por medio de los fluidos gonadales; por lo que la transmisión del virus se puede llevar a cabo por vía horizontal y vertical. La unión del virus a la célula, no es fortuito; sino se lleva a cabo por medio de la proteína de superficie VP2 y los receptores celulares de la célula hospedera.

Después de la replicación del VNPI, principalmente en las células del riñón, hígado y bazo, se puede observar el resultado patológico en el hospedero. Los signos clínicos característicos que se presentan en los salmónidos, abarca cambios conductuales, fisiológicos; con morbilidad y mortalidad variable de acuerdo a la virulencia del virus y edad del pez. Las lesiones macroscópicas y microscópicas pueden observarse fácilmente, al presentarse un brote de la enfermedad.

A partir de los factores microbianos y la respuesta inmune del hospedero, los peces pueden responder a la infección viral activando los genes de respuesta del

sistema inmune innato, en particular el interferón tipo I. La producción de IFN se activa en respuesta a patrones moleculares asociados al patógeno, como es la doble hélice de ARN. La producción de IFN finalmente da como resultado la transcripción de genes que codifican para las proteínas Mx (genes antivirales contra los ARN).

En México, el primer brote del VNPI se presentó en el 2000 en crías de trucha arcoíris, provenientes de los Estados Unidos de América, a partir de ese año; el virus se diseminó en ocho entidades federativas productoras de la especie, causando grandes pérdidas económicas en la truticultura nacional. Actualmente, el VNPI se ha aislado en varios países, y se encuentra presente en los cinco continentes.

Conocer la patogenia del VNPI, es importante para establecer las correctas medidas de control del virus; así como la prevención de la enfermedad; para evitar grandes pérdidas en la truticultura nacional y en las poblaciones de truchas silvestres.

## LITERATURA CITADA

- Adair BM y Ferguson HW. (1981): Isolation of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus from non-salmonid fish. *Journal of Fish Diseases*, 4(1):69-76.
- Ahne W, Jorgensen PEV, Olesen NJ, Fischer-Scherl T y Hoffmann R. (1989): Aquatic birnaviruses: virus of the serogroup II isolated from an IPN outbreak in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Bulletin European Association of Fish Pathologists*, 9(1):14-16.
- Ahne W. (1977): Some properties of an IPN-virus isolated from pike (*Esox lucius*). *Bulletin de l'Office Internationale des Epizooties*, 87:417-418.
- Ahne W. (1978): Isolation and characterization of infectious pancreatic necrosis virus from pike (*Esox lucius*). *Archives of Virology*, 58(1):65-69.
- Ahne W. (1979): Fish cell culture: a fibroblastic line (PG) from ovaries of juvenile pike (*Esox lucius*). *In Vitro*, 15(11):839-840.
- Akhlaghi M, Hosseini A. (2007): First report on the detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) by RT-PCR in rainbow trout fry cultured in Iran. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 27(5):205-210.
- Anderson CD. (1996): Distribution of salmonid diseases in New Zealand. *Surveillance*, 23(4):23-24.
- Anderson CD. (1998): Survey of New Zealand salmonids for OIE List B viruses. *Surveillance*, 25(4):9-10.
- Antychowicz J, Wejman M y Grawinski E. (2000): The isolation of viral haemorrhagic septicaemia and infectious necrosis pancreatic viruses in trout un Poland. *Medycyna Weterynaryjna*, 56:255-258.
- APROMAR (Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos de España). (2014): La Acuicultura en España 2014. [www.apromar.es](http://www.apromar.es) (27 diciembre 2014).
- Ball HJ, Munro ALS, Ellis A, Elson KGR, Hodgkings W y McFarlane IS. (1971): Infectious pancreatic necrosis in rainbow trout in Scotland. *Nature*, 234(5329):417-418.

- Barrera-Mejía M, Martínez S, Ortega C y Ulloa-Arvizu R. (2011): Genotyping of infectious pancreatic necrosis virus isolates from Mexico State. *Journal of Aquatic Animal Health*, 23(4):200-206.
- Barrera-Mejía M, Simón-Martínez J, Salgado-Miranda C, Vega F y Ortega C. (2009): Development and validation of a short-time cell culture and multiplex reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for infectious pancreatic necrosis virus in Mexican farm-sampled rainbow trout. *Journal of Aquatic Animal Health*, 21(3):167-172.
- Besse P y de Kinkelin P. (1965): Sur l'existence en France de la necrose pancreatique de la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*). *Bulletin de l'Academie Veterinaire*, 38:185-190.
- Billi JL y Wolf K. (1969): Quantitative comparison of peritoneal washes and feces for detecting infectious pancreatic necrosis (IPN) virus in carrier brook trout. *Journal of the Biological Board of Canada*, 26(6):1459-1465.
- Blake SJ, Ma Y, Caporale DA, Jairath S y Nicholson BL. (2001a): Phylogenetic relationships of aquatic birnaviruses based on deduced amino acid sequences of genome segment A cDNA. *Diseases of Aquatic Organisms*, 45(2):89-102.
- Blake SJ, Ma Y, Caporale DA, Jairath S y Nicholson BL. (2001b): Erratum: Phylogenetic relationships of aquatic birnaviruses based on deduced amino acid sequences of genome segment A cDNA. *Diseases of Aquatic Organisms*, 46(2):159.
- Bonami JR, Cousserans F, Weppe M y Hill BJ. (1983): Mortalities in hatchery-reared sea bass fry associated with a birnavirus. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 3(3):41-42.
- Bone Q, Moore RH. (2007): *Biology of Fishes*. 3ª edición. Taylor & Francis Group. Reino Unido.
- Bovo G, Ceschia G, Giorgetti G y Vanelli M. (1984): Isolation of an IPN-like virus from adult Kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 4(2):21.

- Bragg RR, Combrink ME. (1988): Isolation and identification of trout viruses in South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 55(3):139-43.
- Bruslind LD y Reno PW. (2000): Virulence comparison of three Buhl-subtype isolates of infectious pancreatic necrosis virus in brook trout fry. *Journal of Aquatic Animal Health*, 12(4):301-315.
- Byrne N, Castric J, Lamour F, Cabon J y Quentel C. (2008): Study of the viral interference between infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology*, 24(5):489-497.
- CABI (*Centre for Agriculture and Biosciences International*) (2018): Datasheet. Infectious pancreatic necrosis, European Union. <https://www.cabi.org/isc/datasheet/79273> (30 de abril 2018).
- Candan A. (2002): First report on the diagnosis of infectious pancreatic necrosis (IPN) based on reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in Turkey. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 22(1):45-48.
- Cann AJ. (2015): *Principles of Molecular Virology*. 6ª edición. Academic Press, Reino Unido.
- Casadevall A y Pirofski L. (1999): Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infection and Immunity*, 67(8):3703-3713.
- Casadevall A y Pirofski L. (2001): Host-Pathogen interactions: the attributes of virulence. *Journal of Infectious Diseases*, 184(3):337-344.
- Casadevall A y Pirofski L. (2002): What is a pathogen? *Annals of Medicine*, 34(1):1-4.
- Casadevall A y Pirofski L. (2003): The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 1(1):17-24.
- Castric J, Baudin-Laurencin F, Counstans MF y Auffret M. (1987): Isolation of infectious pancreatic necrosis virus, Ab serotype, from an epizootic in farmed turbot, *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture*, 67(1/2):117-126.

- Chamorro C, Espinoza JC, Soto K y Kuznar J. (2006): Concentración del virus de la necrosis pancreática infecciosa mediante ultrafiltración de flujo tangencial combinado con filtración de exclusión. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 38(1):77-82.
- Chen MM, Chen JC, Chen SN y Kou GH. (1990): Characteristics of a birnavirus isolated from *Chanos chanos*. COA Fisheries Series, 24, Fish Diseases Research, 10:46-59.
- Chen SN, Chi SC, Guu, JJ, Chen JC y Kou GH. (1984): Pathogenicity of a birnavirus isolated from loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. COA Fisheries Series, 10. Fish Diseases Research, 3(12):38-43.
- Christie KE, Ness S y Djupvik HO. (1990): Infectious pancreatic necrosis virus in Norway: partial serotyping by monoclonal antibodies. *Journal of Fish Diseases*, 13:323-327.
- Comps M, Menu B, Breuil G y Bonami JR. (1991): Viral infection associated with rotifer mortalities in mass culture. *Aquaculture*, 93(1):1-7.
- Coulibaly F, Chevalier C, Delmas B y Rey FA. (2010): Crystal Structure of an Aquabirnavirus Particle: Insights into Antigenic Diversity and Virulence Determinism. *Journal of Virology*, 84(4):1792-1799.
- Couve E, Kiss J y Kuznar J. (1992): Infectious pancreatic necrosis virus internalization and endocytic organelles in CHS-214 cells. *Cell Biology International Reports*, 16(9):899-906.
- Crane M y Hyatt A. (2011): Viruses of fish: an overview of significant pathogens. *Viruses*, 3(11):2025-2046.
- Crane MStJ, Hardy-Smith P, Williams LM, Hyatt AD, Eaton LM, Gould A, Handler J, Kattenbelt J y Gudkovs N. (2000): First isolation of an aquatic birnavirus from farmed and wild fish species in Australia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 43(1):1-14.
- Dadar M, Peyghan R, Memari HR, Shapouri MR, Hasanzadeh R, Goudarzi LM y Vakharia VN. (2013): Sequence analysis of infectious pancreatic necrosis



- virus isolated from Iranian reared rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in 2012. *Virus Genes*, 47(8):574-578.
- Dadar M, Peyghan R, Rajabi-Memari H, Seifi Abad Shapouri M, Hasanzadeh R, Moazzami Goudarzi L y Vakharia V. (2014): Phylogenetic relationships of Iranian Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) based on deduced amino acid sequences of genome segment A and B cDNA. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 13(3):560-575.
- Das BK, Nayak KK, Fourrier M, Collet B, Snow M y Ellis AE. (2007): Expression of Mx protein in tissues of Atlantic salmon post-smolts – An immunohistochemical study. *Fish and Shellfish Immunology*, 23(6):1209-1217.
- Dixon JR, Selvaraj S, Yue F, Kim A, Li Y, Shen Y, Hu M, Liu JS y Ren B. (2012): Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature*, 485(7398):376-380.
- Dixon PF, Ngho GH, Stone DM, Chang SF, Way K y Kueh SLF. (2008): Proposal for a fourth aquabirnavirus serogroup. *Archives of Virology*, 153(10):1937-1941.
- Dobos P y Rowe D. (1977): Peptide map comparison of infectious pancreatic necrosis virus-specific polypeptides. *Journal of Virology*, 24(3):805-820.
- Dobos P, Hill BJ, Hallett R, Kells DTC, Becht H y Teninges D. (1979): Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented dsRNA genomes. *Journal of Virology*, 32(2):593-605.
- Dobos P. (1976): Use of gum tragacanth overlay, applied at room temperature, in the plaque assay of fish and other animal viruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 3(3):373-375.
- Dobos P. (1995): The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Annual Review of Fish Diseases*, 5:25-54.
- Dobos P. (2001): Birnaviruses. *Encyclopedia of life sciences*, Nature Publishing Group, Canada.
- Dorson M y Torchy C. (1981): The influence of fish age and water temperature on mortalities of rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson, caused by a

- European strain of infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of Fish Diseases*, 4(3):213-221.
- Dorson M. (1983): Infectious pancreatic necrosis of salmonids. An overview of current problems. En: Anderson, D P, Dorson, M. M., Douborget, P. (eds.) *Antigens of fish pathogens*. Foundation Marciel Merieux, Lyon, 7-32.
- Duncan R y Dobos P. (1986): The nucleotide sequence of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) ds RNA segment A reveals one large open reading frame encoding a precursor polyprotein. *Nucleic Acids Research*, 14(14):5934.
- Duncan R, Mason CL, Nagy E, Leong JC y Dobos P. (1991): Sequence analysis of infectious pancreatic necrosis virus genome segment B and its encoded VP1 protein: A putative RNA-dependent RNA polymerase lacking the Gly-Asp-Asp motif. *Virology*, 191(2):541-552.
- Economon PP. (1973): Polyvinylpyrrolidone-iodine as a control for infectious pancreatic necrosis (IPN) virus of brook trout. *Symposium on the Major Communicable Fish Diseases in Europe and Their Control*, London, 59-66.
- Eskildsen UK y Vestergård-Jørgensen PE. (1973): On the possible transfer of trout pathogenic viruses by gulls Italy. *Rivista Italiana di Piscicoltura e Ittiopatologia*, 8(4):104-105.
- Espinoza E, Farías G, Soler M y Kuznar J. (1985): Identity between infectious pancreatic necrosis virus VR-299 and a Chilean isolate. *Intervirology*, 24(1):58-60.
- Eterradossi N y Saif YM. (2013): Infectious Bursal Disease. En: *Diseases of poultry* 13ª edición. Editado por Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL y Nair V, 219-246, Wiley-Blackwell, Estados Unidos de América.
- Evensen O, Stagg R, Brun E, Midtlyng P, Rimstad E, Skjelstad B, Johanssen LH y Jense I. (2003): IPNV in salmonids: a review. *Fisheries and Aquaculture Industries Research Fund*, Oslo, 115.

- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). (2014): El estado mundial de la pesca y la acuicultura: oportunidades y desafíos. Roma, 2014.
- Fauquet C, Mayo M, Maniloff, Desselberger U y Ball L. (2005): Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press. San Diego, CA.
- Fernández-Trujillo A, Ferro P, Garcia-Rosado E, Infante C, Alonso MC, Béjar J, Borrego JJ y Manchado M. (2008): Poly I:C induces Mx transcription and promotes an antiviral state against sole aquabirnavirus in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup). Fish and Shellfish Immunology, 24(3):279-285.
- Fijan N, Sulimanovic D, Bearzotti M, Muzinic D, Zwillenberg LO, Chilmonczyk S, Vautherot JF y de Kinkelin P. (1983): Some properties of the *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cell line from carp *Cyprinus carpio*. Annales De l'Institut Pasteur. Virology, 134:207-220.
- Follett JE y Schmitt MK. (1990): Characterization of a cell line derived from inconnu. Journal of Aquatic Animal Health, 2(1):61-67.
- Fridholm H. (2008): Infectious pancreatic necrosis virus. Immunogenicity, virion integrity and virus/cell interaction. Doctoral Dissertation in Microbiology, Department of Cell and Organism Biology, Lund University, Lund, Sweden.
- Frost P Børsheim K y Endresen C. (1998): Analysis of the antibody response in Atlantic salmon against recombinant VP2 of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). Fish and Shellfish Immunology, 8:447-456.
- Frost P, Havarstein LS, Lygren B, Stahl S, Endresen C y Christie KE. (1995): Mapping of neutralization epitopes on infectious pancreatic necrosis viruses. Journal of General Virology, 76(Pt 5):1165-1172.
- Gahlawat SK, Munro ES y Ellis AE. (2004): A non-destructive test for detection of IPNV-carriers in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.). Journal of Fish Diseases, 27(4):233-239.

- García-Mondragón D, Gallego-Alarcón I, Espinoza-Ortega A, García-Martínez A y Arriaga-Jordán CM. (2013): Desarrollo de la producción de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en el Centro de México. *AquaTIQ*, 38:46-56.
- Ghittino P. (1972): Malattie esotoche dei pesci che minacciano trotticoltura e carpicoltura italiane. *Rivista Italiana di Piscicoltura e Ittiopatologia*, 7:53-62.
- Gómez-Casado E, Estepa A y Coll JM. (2011): A comparative review on European-farmed finfish RNA viruses and their vaccines. *Vaccine*, 29(15):2657-2671.
- Grove J y Marsh M. (2017): The cell biology of receptor-mediated virus entry. The Rockefeller University Press. *Journal of Cell Biology*, 195(7):1071-1082.
- Gutiérrez M y Lopez S. (2010): Mecanismos de entrada de virus: una manera de conocer a la célula. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 13(1):26-34.
- Haenen OLM, Schuetze H, Cieslak M, Oldenburg S, Spierenburg MAH, Roozenburg-Hengst I, Voorbergen-Laarman M, Engelsma MY y Olesen NJ. (2016): First evidence of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in the Netherlands. *Journal of Fish Diseases*, 39(8):971-979.
- Hah YC, Hang SW, Kim MH, Fryer JL, Winton JR. (1984): Isolation of infectious pancreatic necrosis virus from goldfish (*Carassius auratus*) and chum salmon (*Oncorhynchus keta*) in Korea. *Korean Journal of Microbiology*, 22(2):85-90.
- Hastein T, Krogsrud J. (1976): Infectious pancreatic necrosis. First isolation of virus from fish in Norway. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 17(1):109-111.
- Hedrick RP, Fryer JL, Chen SN, Kou GH. (1983): Characteristics of four birnaviruses isolated from fish in Taiwan. *Fish Pathology*, 18(2):91-97.
- Hedrick RP, McDowell T, Rosemark R, Aronstein D y Chan L. (1986): A comparison of four apparatuses for recovering infectious pancreatic necrosis virus from rainbow trout. *Progressive Fish-Culturist*, 48(1):47-51.
- Hill BJ y Way K. (1980): Properties and interrelationship of bisegmented double-stranded RNA viruses of fish and shellfish. *Proceedings of the Conference on Aquatic Animal Viruses*. Paris, 22-24.

- Hill BJ y Way K. (1995): Serological classification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and other aquatic birnaviruses. *Annual Review of Fish Diseases*. 5:55-77.
- Hill BJ, Way K y Alderman DJ. (1982): Further investigations into the pathogenicity of IPN-like viruses for oysters, in: *Invertebrate Pathology and Microbial Control*. Proceedings of the 3rd International Conference on Invertebrate Pathology. Brighton, UK, 273-274.
- Hill BJ. (1976): Procedures for the isolation and identification of IPN, VHS, IHN and SVC viruses from diseased fish. MAFF, Fisheries Research Technical Report, No.27:13.
- Hill BJ. (1982): Infectious pancreatic necrosis virus and its virulence. En: *Microbial Diseases of Fish*. Editado por Roberts R, 91-114, Blackwell Reino Unido.
- Horner GW. (2003): Reports from MAF Biosecurity Authority – National Centre for Disease Investigation. *Surveillance*, 30(2):14-15.
- Hudson EB, Bucke D y Forrest A. (1981): Isolation of infectious pancreatic necrosis virus from eels, *Anguilla anguilla*, in the United Kingdom. *Journal of Fish Diseases*, 4:429-431.
- Jiang Y, Xu B, Li W, Li Z, Hu Q. (1989): Isolation and identification of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) from imported rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in PR China. *Acta Hydrobiologia Sinica*, 13:353-358.
- Johansen LH, Eggset G y Sommer AI. (2009): Experimental IPN virus infection of Atlantic salmon parr; recurrence of IPN and effects on secondary bacterial infections in post-smolts. *Aquaculture*, 290:9-14.
- John KR, Richards RH. (1999): Characteristics of a new birnavirus associated with a warm-water fish cell line. *Journal of General Virology*, 80(Pt 8):2061-2065.
- Jorgensen PEV y Kehlet NP. (1971): Infectious pancreatic necrosis (IPN) viruses in Danish rainbow trout. Their serological and pathogenic properties. *Nordisk Veterinaermedicin*, 23(11):568-575.
- Keen EC. (2012): Paradigms of pathogenesis: targeting the mobile genetic elements of disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14(2):161.

- Kelly RK y Loh PC. (1972): Some properties of an established fish cell line from *Xiphophorus helleri* (red swordtail). *In Vitro*, 9(2):73-80.
- Kelly RK, Nielsen O y Yamamoto SC. (1980): A new herpes-like virus (HLV) of fish (*Stizostedion vitreum vitreum*). *In Vitro*, 16:255.
- Kelly RK, Souter BW y Miller HR. (1978): Fish cell lines: comparisons of CHSE-214, FHM, and RTG-2 in assaying IHN and IPN viruses. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 35(7):1009-1011.
- Klontz GW, Yasutake WT y Parisot TJ. (1965): Viruses diseases of the *Salmonidae* in western United States. III. Immunopathological aspects. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 126(1):531-542.
- Kohlmeyer G, Ahne W y Thomsen I. (1986): Plaque size, virulence and immunogenicity of infectious pancreatic necrosis virus subtypes Sp, Ab and He. *Tierärztliche Umschau*, 41(8):535-541.
- Kusuda R, Kado K, Takeuchi Y y Kawai K. (1989): Characteristics of two virus strains isolated from young Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Suisanzoshoku*, 37:115-120.
- Kuznar J, Soler M, Farias G y Espinoza JC. (1995): Attachment and entry of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) into CHSE-214 cells. *Archives of Virology*, 140(10):1833-1840.
- Labraña R, Espinoza J y Kuznar J. (2008): Detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en sedimentos de agua dulce. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 40(2):203-205.
- Lannan CN, Winton JR y Fryer JL. (1984): Fish cell lines: establishment and characterization of nine cell lines from salmonids. *In Vitro*, 20(9):671-676.
- LaPatra, SE, Barone L, Jones, GR y Zon LI. (2000): Effects of infectious hematopoietic necrosis virus and infectious pancreatic necrosis virus infection on hematopoietic precursors of the zebrafish. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 26(5):445-452.
- Lee J, Feldman AR, Delmas B y Paetzel M. (2006): Expression, purification and crystallization of a birnavirus-encoded protease, VP4, from blotched

- snakehead virus (BSNV), Department of Molecular Biology and Biochemistry, Simon Fraser University, South Science Building, 8888 University Drive, Burnaby, British Columbia, V5A 1S6, Canada, 62 (4):353-356.
- Lee MH y Loh PC. (1975): Some properties of an established fish cell line from the marine fish, *Caranx mate* (Omaka). Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 150(1):40-48.
- Levican J, Miranda-Cárdenas C, Soto-Rifo R, Aguayo F, Gaggero A, León O. (2017): Infectious pancreatic necrosis virus enters CHSE-214 cells via macropinocytosis. Scientific Reports, 7(1):3068.
- Liu M y Vakharia VN. (2004): VP1 protein of infectious bursal disease virus modulates the virulence *in vivo*. Virology, 330(1):62-73.
- Ljungberg O y Vestergård-Jørgensen PE. 1973. Infectious pancreatic necrosis (IPN) of salmonids in Swedish fish farms. En: Abstracts on the Symposium on the major communicable fish diseases in Europe and their control. Editado por Dill WA. EIFAC Technical Paper, 17(Suppl. 2):67-70.
- Lo CF, Wang CH, Lin MS, Kou GH. (1991): Viral peptides and RNA of defective interfering particles of IPNV virus generated by serial undiluted passaging in TO-2 cells. Fish Pathology, 26(3):119-125.
- Lockhart K, McBeath AJ, Collet B, Snow M y Ellis AE. (2007): Expression of Mx mRNA following infection with IPNV is greater in IPN-susceptible Atlantic salmon post-smolts than in IPN-resistant *Atlantic salmon* parr. Fish and Shellfish Immunology, 22(3):151-156.
- Lojkić I, Zrnčić S, Oraić D y Andrijanić Milan. (2012): Phylogenetic analysis of the infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) from Croatian and Bosnian and Herzegovinian farms. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 32(4):127-134.
- Lvov D, Shchelkanov M, Alkhovsky S y Deryabin P. (2015): Zoonotic Viruses of Northern Eurasia. Taxonomy and Ecology. Academic Press, India.
- M'Gonigle RH. (1940): Acute catarrhal enteritis of salmonid fingerlings. Transactions of the American Fisheries Society, 70:297-302.

- MacDonald RD y Kennedy JC. (1979): Infectious pancreatic necrosis virus persistently infects chinook salmon embryo cells independent of interferon. *Virology*, 95(1):260-264.
- MacKelvie RM y Artsob H. (1969): Infectious pancreatic necrosis virus in young salmonids of the Canadian Maritime Provinces. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 26(12):3259-3262.
- Maclachlan NJ y Dubovi EJ. (2017): *Fenners Veterinary Virology*. 5<sup>th</sup> edición. Elsevier, London.
- Magyar G y Dobos P. (1994): Expression of infectious pancreatic necrosis virus polyprotein and VP1 in insect cells and the detection of the polyprotein in purified virus. *Virology*, 198(2):437-445.
- Mahy BWJ. (2001): *A dictionary of Virology*. 3<sup>a</sup> ed., Academic Press, Londres.
- Malsberger R y Cerini C. (1965): Multiplication of infectious pancreatic necrosis virus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 126(1):320-327.
- Malsberger RG y Cerini CP. (1963): Characteristics of infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of Bacteriology*, 86:1283-1287.
- Mangunwiryo H y Agius C. (1988): Studies on the carrier state of infectious pancreatic necrosis virus infections in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Diseases*, 11(2):125-132.
- Manning DS y Leong JC. (1990): Expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology*, 179(1):16-25.
- Maret J. (1997): Virulence Characteristics of Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) in Brook Trout. *Salvelinus fontinalis* fry. Thesis for the degree of Master of Science in Fisheries, Oregon State University.
- Marsh M y Helenius A. (2006): Virus Entry: Open Sesame. *Cell*, 124(4):729-740.
- McAllister KW, McAllister PE. (1988): Transmission of infectious pancreatic necrosis virus from virus carrier striped bass to brook trout. *Diseases of Aquatic Organisms*, 4:101-104.
- McAllister PE y Owens WJ. (1992): Recovery of infectious pancreatic necrosis virus from the faeces of wild piscivorous birds. *Aquaculture*, 106(3-4):227-232.



- McAllister PE, Newman MW, Sauber JH y Owens WJ. (1984): Isolation of infectious pancreatic necrosis virus (serotype Ab) from diverse species of estuarine fish. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 37(1-4):317-328.
- McAllister PE, Reyes X. (1984): Infectious pancreatic necrosis virus: isolation from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, imported into Chile. *Journal of Fish Diseases*, 7(4):319-322.
- Mertens PPC y Dobos P. (1982): Messenger RNA of infectious pancreatic necrosis virus is polycistronic. *Nature*, 297(5863):243-246.
- Minor PD. (2001): Viruses. *Encyclopedia of life sciences*. National Institute for Biological Standard and Control. Potters Bar, UK.
- Moewus-Kobb L. (1965): Studies with IPN virus in marine hosts. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 126(1):328-342.
- Moore KS, Wehrli S, Roder H, Rogers M, Forrest JN Jr, McCrimmon D, Zasloff M. (1993): Squalamine: an aminosterol antibiotic from the shark. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(4):1354-1358.
- Mortensen SH, Evensen Ø, Rødseth OM y Hjeltnes BK. (1993): The relevance of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in farmed Norwegian turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 115(3-4):243-252.
- Mortensen SH, Nilsen RK y Hjeltnes B. (1998): Stability of an infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) isolate stored under different laboratory conditions. *Diseases of Aquatic Organisms*, 33(1):67-71.
- Mulcahy D y Pascho RJ. (1984): Adsorption to fish sperm of vertically transmitted fish virus. *Science*, 225(4659):333-335.
- Munro ALS, Liversidge J y Elson KGR. (1976): The distribution and prevalence of infectious pancreatic necrosis virus in wild fish in Loch Awe. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh, B*, 75(4):223-232.
- Munro ES y Midtlyng PJ. (2011): Infectious pancreatic necrosis an associated aquatic birnavirus. En: *Fish diseases and disorders volume 3: Viral, bacterial*

- and fungal infections. Editado por Woo PTK, Bruno DW, 1-65, CABI Publishing, Reino Unido.
- Mutoloki S, Jøssund TB, Ridchie G, Munang'andu HM y Evensen Ø. (2016): Infectious pancreatic necrosis virus causing clinical and subclinical infections in Atlantic salmon have different genetic fingerprints. *Frontier in Microbiology*, 1393(7):1-10.
- Nagy E, Duncan R, Krell PJ y Dobos P. (1987): Mapping of the large RNA genome segment of infectious pancreatic necrosis virus by hybrid arrested translation. *Virology*, 158(1):211-217.
- Nathanson N y Tyler K. (2005): The pathogenesis of viral infections. En: Mahy BWJ, ter Meulen V, editores. *Topley and Wilson's Microbiology*. London.
- Nicholson BL, Thorne GW, Janicki C y Hanson A. (1979): Studies on a host range variant form different isolates of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Journal of Fish Diseases*, 2(5):367-379.
- Nishizawa T, Kinoshita S y Yoshimizu M. (2005): An approach for genogrouping of japanese isolates of aquabirnaviruses in a new genogroup, VII, based in the VP2/NS junction region. *Journal of General Virology*, 86(Pt 7):1973-1978.
- Noguera PA y Bruno DW. (2010): Liver involvement in post-smolt Atlantic salmon, *Salmo salar* L., infected with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV): a retrospective histopathological study. *Journal of Fish Diseases*, 33(10):819-832.
- NOM-059-SEMARNAT-2010 (Norma Oficial Mexicana, 059 de SEMARNAT 2010). Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 30 de diciembre de 2010. México.
- Novoa B, Barja JL y Figueras A. (1995): Entry and sequential distribution of an aquatic birnavirus in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 131(1-2):1-9.

- OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal). (2006). Necrosis pancreática infecciosa. En: Manual de Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos 2006. 6ª edición, 190-199, Organisation Mondiale de la Santé Animale, Francia.
- Okamoto N, Tayama T, Kawanobe M, Fujiki N, Yasuda Y y Sano T. (1993): Resistance of a rainbow trout strain to infectious pancreatic necrosis. *Aquaculture*, 117(1-2):71-76.
- Ørpetveit I, Küntziger T, Sindre H, Rimstad E y Dannevig BH. (2012): Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) from salmonid fish enters, but does not replicate in, mammalian cells. *Virology Journal*, 228 (9):1-6.
- Ortega C, Arguedas CD, Vega CL y Salgado MC. (2013): La necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en México. Un análisis a 13 años de su diagnóstico en el país. Memorias VIII Congreso Internacional de Epidemiología 2013. Asociación Mexicana de Epidemiología Veterinaria A. C. 25-28 septiembre 2013. León, Guanajuato, México.
- Ortega SC, Montes de Oca R, Groman D, Yason C, Nicholson B y Blake S. (2002): Case report: Viral infectious pancreatic necrosis in farmed rainbow trout from Mexico. *Journal of Aquatic Animal Health*, 14(4):305-310.
- Ozel M y Gelderblom H. (1985): Capsid symmetry of viruses of the proposed Birnavirus group. *Archives of Virology*, 84(3-4):149-61.
- Parisot TJ, Yasutake WT y Dressler V. (1963): A new geographic and host record for infectious pancreatic necrosis. *Transactions of the American Fisheries Society*, 92(1):63-66.
- Park JW y Jeong G. (1996): Identification of VP3 as an important neutralising epitope from DRT strain, a Korean isolate of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Fish and Shellfish Immunology*, 6(3):207-219.
- Pérez SI, Rodríguez S. (1997): Major viral diseases affecting fish aquaculture in Spain. *Microbiologia*, 13(2):149-60.
- Perez-Prieto S, Garcia-Rosado E, Rodriguez S, Castro D y Borrego JJ. (2001): Antigenic properties and experimental transmission to several fish species of

- a marine birnavirus isolated from sole (*Solea senegalensis*). *Veterinary Microbiology*, 82(1):11-25.
- Piper RG y Smith CE. (1973): Factors influencing formalin toxicity in trout. *The Progressive Fish-Culturist*, 35(2):78-81.
- Pospisil Z, Tomanek J, Valicek L, Zendulkova D. (1986): Izolate a identifikace viru infekcni nekrozy panckreatuy pstruhu. *Veterinárni medicína*, 31:95-104.
- PROY-NOM-045-PESC-2003 (Proyecto de Norma Oficial Mexicana, 045 de Pesca 2003). Que establece los requisitos y medidas para prevenir y controlar la introducción y dispersión de enfermedades de alto riesgo en el cultivo de salmónidos en la República Mexicana. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 29 de junio de 2004. México.
- Reno PW, Darley S y Savan M. (1978): Infectious pancreatic necrosis: Experimental induction of a carrier state in trout. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 35(11):1451-1456.
- Reno PW. (1999): Infectious pancreatic necrosis and associated aquatic birnaviruses. En: *Fish Diseases and Disorders. Volume 3 Viral, Bacterial and Fungal Infections*. Editado por Woo PTK, Bruno DW, 1-55, CABI Publishing, Reino Unido.
- Reschova S, Pokorova D, Hulova J, Kulich P, Vesely T. (2008): Surveillance of viral fish diseases in the Czech Republic over the period January 1999 - December 2006. *Veterinarni Medicina*, 53(2):86-92.
- Rexhepi A, Scheinert P, Bërxfholli K, Hamidi A, Sherifi K. (2009): Occurrence of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in farmed rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) in Kosovo. *Veterinaria*, 58(1-2):47-53.
- Riji K y Richards RH. (1999): Characteristics of a new birnavirus associated with a warm-water fish cell line. *Journal of General Virology*, 80(8):2061-2065.
- Rivas C. (1991): Estudio comparativo de Birnavirus de Salmónidos. Tesis de Licenciatura. Universidad de Santiago de Compostela. España.
- Roberts RJ y McKnight IJ. (1976): The pathology of infectious pancreatic necrosis virus. II. Stress-mediated recurrence. *British Veterinary Journal*, 132:209-213.

- Roberts RJ y Pearson MD. (2005): Infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 28(7):383-389.
- Rodger HD y Frerichs GN. (1997): Clinical infectious pancreatic necrosis virus infection in farmed halibut in the United Kingdom. *The Veterinary Record*, 140(15):401-402.
- Rodríguez S-JS, Pérez-Prieto SI. (2007): Effects of salmonid fish viruses on Mx gene expression and resistance to single or dual viral infections. *Fish and Shellfish Immunology*, 23(2):390-400.
- Rodríguez Saint-Jean S, Borrego JJ y Pérez-Prieto SI. (2001): Comparative evaluation of five serological methods an RT-PCR assay for the detection of IPNV in fish. *Journal of Virological Methods*, 97(1-2):23-31.
- Rodríguez Saint-Jean S, Borrego JJ y Pérez-Prieto SI. (2003): Infectious pancreatic necrosis virus: biology, pathogenesis, and diagnostic methods. *Advances in Virus Research*, 62:113-165.
- Ruane NM, Murray AG, Geoghegan F, Raynard RS. (2009): Modelling the initiation and spread of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in the Irish salmon farming industry: the role of inputs. *Ecological Modelling*, 220:1369-1374.
- Sadasiv E, Chang PW y Lin W. (1993): IPNV antibody as a means of detection of possible virus carriage in Atlantic salmon surviving virus challenge. *Journal of Shellfish Research*, 12:113-114.
- Sadasiv E. (1995): Immunological and pathological responses of salmonids to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Annual Review of Fish Diseases*, 5:209-223.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). (2010): *Experiencias Relevantes en la Prestación de Servicios Profesionales*.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). (2012a): *Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca*. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca.

- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). (2012b): ACUERDO mediante el cual se aprueba la actualización de la Carta Nacional Acuícola.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). (2013): Carta Nacional pesquera. Diario oficial (segunda sección).
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). (2014): Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca. Editado por la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. Sinaloa. México.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). (2018): Boletín de prensa. Impacta positivamente producción acuícola de trucha en economía del sector rural del país. BCS/027/2018. México.
- Sahoo PK y Goodwin AE. (2012): Viruses of freshwater finfish in the Asian-Pacific region. *Indian Journal of Virology*, 23(2):99-105.
- Salgado-Miranda C, Loza-Rubio E, Rojas-Anaya E y García-Espinosa G. (2013): Viral vaccines for bony fish: past, present and future. *Expert Review of Vaccines*, 12(5):567-578.
- Salgado-Miranda C. (2006): Necrosis pancreática infecciosa: enfermedad emergente en la truticultura de México. *Veterinaria México*, 37(4):467-477.
- Sano M, Okamoto N, Fukuda H, Saneyoshi M y Sano T. (1992): Virulence of infectious pancreatic necrosis virus is associated with the larger RNA segment (RNA segment A). *Journal of Fish Diseases*, 15(4):283-293.
- Sano T y Yamazaki T. (1973): Studies on viral diseases of Japanese fishes. V. Infectious pancreatic necrosis of amago trout. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*, 39(5):477-480.
- Sano T, Okamoto N y Nishimura T. (1981): A new viral epizootic of *Anguilla japonica* Temminck and Schlegel. *Journal of Fish Diseases*, 4(2):127-139.

- Sano T. (1971): Studies on viral diseases of Japanese fishes I. Infectious pancreatic necrosis of rainbow trout: first isolation from epizootics in Japan. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 37:499-503.
- Santi N, Song H, Vakharia VN y Evensen O. (2005): Infectious pancreatic necrosis virus vp5 is dispensable for virulence and persistence. *Virology*, 79(14):9206-9216.
- Santi N, Vakharia VN y Evensen O. (2004): Identification of putative motifs involved in the virulence of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology*, 322(1):31-40.
- Scherrer R y Cohen J. (1975): Studies on infectious pancreatic necrosis virus interaction with RTG-2 and FHM cells: selection of variant virus-type in FHM cells. *Journal of General Virology*, 28(1):9-20.
- Scherrer R, Bic E y Cohen J. (1974): Infectious pancreatic necrosis virus: a study of the influence of temperature and host-cell on virus replication and virus-induced interferon synthesis. *Annals of Microbiology*, 125(4):455-467.
- Schlotfeldt HJ, Leiss B, Frost JW. (1975): Erst isoleirung und identifizierung des virus der infektiösen pancreasnekrosi (IPN) der salmoniden in der Bundesrepublik Deutschland. *Berliner und Munchener Tierärztliche Wochenschrift*, 88:109-111.
- Seeley RJ, Perlmutter A y Seeley VA. (1977): Inheritance and longevity of infectious pancreatic necrosis virus in the zebra fish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan). *Applied and Environmental Microbiology*, 34(1):50-55.
- Shchelkunov IS. (200&): Epizootic situation on virus diseases of cultivated fishes. *Veterinariya*, (4):22-25.
- Shivappa RB, Song H, Yao K, Aas-Eng A, Evensen O y Vakharia VN. (2004): Molecular characterization of Sp serotype strains of infectious pancreatic necrosis virus exhibiting differences in virulence. *Diseases of Aquatic Organisms*, 61(1-2):23-32.

- Silim A, Elahary M y Lgace A. (1982): Susceptibility of trouts of different species and origins to various isolates of infectious pancreatic necrosis virus. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 39(12):1580-1584.
- Smail DA y Munro ALS. (1985): Chapter 28: Infectious pancreatic necrosis virus persistence in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). En: *Fish and Shellfish Pathology*. Editado por Ellis AE, 277-288, Academic Press, London.
- Smail DA, Bain N, Bruno DW y King JA. (2006): Infectious pancreatic necrosis virus in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts in the Shetland Isles, Scotland: Virus identification, histopathology, immunohistochemistry and genetic comparison with Scottish mainland isolates. *Journal of Fish Diseases*, 29(1):31-41.
- Smail DA, Grierson RJ y Munro ALS. (1986): Infectious pancreatic necrosis (IPN) virus in Atlantic salmon: Virulence studies and sub-clinical effects with respect to growth, smolting performance and condition. Copenhagen, Denmark: ICES Council Meeting, 1-10.
- Smail DA, Huntly PJ y Munro ALS. (1993): Fate of four fish pathogens after exposure to fish silage containing fish farm mortalities and conditions for the inactivation of infectious pancreatic necrosis virus. *Aquaculture*, 113(3):173-181.
- Smail DA, McFarlane L, Bruno DW y McVicar AH. (1995): The pathology of an IPN-Sp sub-type (Sh) in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts in the Shetland Isles, Scotland. *Journal of Fish Diseases*, 18(6):631-638.
- Somogyi P, Dobos P. (1980): Virus-specific RNA synthesis in cells infected by infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of Virology*, 33(1):129-139.
- Song H, Santi N, Evensen O y Vakharia VN. (2005): Molecular determinants of infectious pancreatic necrosis virus virulence and cell culture adaptation. *Virology*, 79(16):10289-10299.
- Soriano-Vargas E, Salgado-Miranda C, Suárez-Güemes F y Trigo TFJ. (2006): Patogenia microbiana: conceptos básicos en la interacción hospedador-microorganismo. *Veterinaria México*, 36(4):467-477.



- Sorimachi M y Hara T. (1985): Characteristics and pathogenicity of a virus isolated from yellowtail fingerlings showing ascites. *Fish Pathology*, 19(4):231-238.
- Sousa JA, Romalde JL, Ledo A, Eiras JC, Barja JL y Toranzo AE. (1996): Health status of two salmonid aquaculture facilities in North Portugal: characterization of the bacterial and viral pathogens causing notifiable diseases. *Journal of Fish Diseases*, 19(1):83-89.
- Southgate P. (2000): Enfermedades en acuicultura. En: *Acuicultura para veterinarios*. Editado por Brown L, 95-135, Acribia S. A., España.
- Stangeland K, Høie S y Taksdal T. (1996): Experimental induction of infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post smolts. *Journal of Fish Diseases*, 19(4):323-327.
- Stephens EB, Newman MW, Zachary AL y Hetrick FM. (1980): A viral aetiology for the annual epizootics of Atlantic menhaden, *Brevoortia tyrannus* (Latrobe) in Chesapeake Bay. *Journal of Fish Diseases*, 3(5):387-398.
- Swanson RN y Gillespie JH. (1982): Isolation of infectious pancreatic necrosis virus from the blood and blood components of experimentally infected trout. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 39(1):225-228.
- Taksdal T, Ramstad A, Stangeland K y Dannevig BH. (1998): Induction of infectious pancreatic necrosis (IPN) in covertly infected Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts by stress exposure, by injection of IPN virus (IPNV) and by cohabitation. *Journal of Fish Diseases*, 21(3):193-204.
- Tarrab E, Berthiaume L, Grothe S, O'Connor-McCourt M, Heppell J y Lecomte J. (1995): Evidence of a major neutralizable conformational epitope region on VP2 of infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of General Virology*, 76(Pt 3):551-558.
- Teninges D, Ohanessian A, Richard-Molard C y Contamine D. (1979): Isolation and Biological Properties of Drosophila X Virus. *Journal of General Virology*, 42(2):241-254.

- Tisdall DJ y Phipps JC. (1987): Isolation and characterisation of a marine birnavirus from returning quinnat salmon (*Oncorhynchus tshawtscha*) in the South Island of New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, 35(12):217-218.
- Toranzo AE y Hetrick FM. (1982): Comparative stability of two salmonid viruses and poliovirus in fresh, estuarine and marine waters. *Journal of Fish Diseases*, 5(3):223-231.
- Varvarigos P, Vendramin N, Cappellozza E, Bovo G. (2011): First confirmation of Herpes Virus Anguillae (HVA) and Infectious Pancreatic Necrosis (IPN) virus infecting European eels *Anguilla anguilla* farmed in Greece. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 31(3):101-111.
- Varvarigos P, Way K. (2002): First isolation and identification of the infectious pancreatic necrosis (IPN) virus from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fingerlings farmed in Greece. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 22(3):195-200.
- Vega LF, Montes de Oca R, Valladares B, Martínez-Castañeda S, Alonso U, Enríquez R y Ortega C. (2011): Evaluación de la respuesta clínico-patológica e inmune humoral en crías de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) infectadas experimentalmente con el virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV). *Archivos de Medicina Veterinaria*, 43(1):27-34.
- Vega RMT, Moreno LMC, García FV y López SR. (2010): Respuesta inmune en peces. En: *Inmunología Veterinaria*. Editado por Morales SJL, 309-314, El Manual Moderno S. A. de C. V., México.
- Vestergård-Jørgensen PE y Grauballe PC. (1971): Problems in the serological typing of IPN virus. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 12(1):115-117.
- Vestergård-Jørgensen PE, Bregnballe F. (1969): Infectious pancreatic necrosis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in Denmark. *Nordisk Veterinærmedicin*, 21:142-148.
- Vestergård-Jørgensen PE. (1973): Inactivation of IPN and Egtved virus. *Rivista Italiano di Piscicoltura e Ittiopatologia*, 8:107-108.

- Wallace IS, Gregory A, Murray AG, Munro ES y Raynard RS. (2008): Distribution of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in wild marine fish from Scottish waters with respect to clinically infected aquaculture sites producing Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 31(3):177-186.
- Watanabe RA, Fryer JL y Rohovec JS. (1988): Molecular filtration for recovery of waterborne viruses of fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(6):1606-1609.
- Wattanavijarn W, Torchy C, Tangtronpiros J y de Kinkelin P. (1988): Isolation of a birnavirus belonging to Sp serotype, from South East Asia fishes. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 8(5):106-108.
- Wechsler SJ, McAllister PE, Hetrick FM y Anderson DP. (1986): Effect of exogenous corticosteroids on circulating virus and neutralizing antibodies in striped bass (*Morone saxatilis*) infected with infectious pancreatic necrosis virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 12(1-4):305-311.
- Wechsler SJ, Woods LC, Kraeuter JN, Hetrick FM y McAllister PE. (1987): Transmission of infectious pancreatic necrosis virus in striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 10(1):29-34.
- Wolf K y Mann JA. (1980): Poikilotherm vertebrate cell lines and viruses: a current listing for fishes. *In Vitro*, 16(2):168-179.
- Wolf K y Pettijohn LL. (1970): Infectious pancreatic necrosis virus isolated from Coho salmon fingerlings. *Progressive Fish-Culturist*, 32(1):17-18.
- Wolf K y Quimby MC. (1969): Infectious pancreatic necrosis: clinical and immune response of adult trouts to inoculation with live virus. *Journal of the Biological Board of Canada*, 26(9):2511-2516.
- Wolf K, Quimby MC y Bradford A. (1963): Egg-associated transmission of IPN virus of trouts. *Virology*, 21(3):317-321.
- Wolf K, Snieszko SF, Dunbar CE y Pyle E. (1960): Virus nature of infectious pancreatic necrosis in trout. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 104:105-108.

- Wolf K. (1988): Infectious pancreatic necrosis. En: Fish Viruses and Fish Diseases, Cornell University, Press, Ithaca, New York, 115-157.
- Woo PTK y Bruno DW. (2006): Infectious pancreatic necrosis and associated aquatic birnaviruses. En: Fish Diseases and Disorders. 2ª edición. Volume 3 Viral, Bacterial and Fungal Infections. Editado por Woo PTK, Bruno DW, 27-29, CABI Publishing, Reino Unido.
- Yamamoto T y Kilistoff J. (1979): Infectious pancreatic necrosis virus: quantification of carriers in lake populations during a 6-year period. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 36(5):563-567.
- Yamamoto T. (1975): Frequency of detection and survival of infectious pancreatic necrosis virus in a carrier population of Brook trout. Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 32(4):568-570.