



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

“RT-PCR EN TIEMPO REAL PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL
VIRUS DE LA NECROSIS PANCREÁTICA INFECCIOSA
EN TRUCHA ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*)”

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

DIANA PATRICIA NERIA ARRIAGA

TUTORA PRINCIPAL: Dra. EDITH ROJAS ANAYA-INIFAP

COMITÉ TUTORAL: Dra. ELIZABETH LOZA RUBIO-INIFAP

Dr. JOSÉ JUAN MARTÍNEZ MAYA-FMVZ

CIUDAD DE MÉXICO.

AGOSTO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mi familia...

A Yatziri, porque eres y serás la luz en mi camino, gracias por tu comprensión, amor e inspiración infinita. Te amo hija.

A Rodrigo, por tu incansable apoyo, gracias por todos los momentos compartidos y por impulsarme a volar. Te amo amor.

A mis suegros, por todo el amor y dedicación que le han brindado a mi hija y por hacerla tan feliz, sin duda, no hubiera podido lograr esto sin su ayuda. Mil gracias.

A mi mamá, por apoyarme en cada momento.

A Dios, por sostenerme en sus manos y darme esta maravillosa oportunidad.

AGRADECIMIENTOS

Mi especial reconocimiento y gratitud a las instituciones que hicieron posible la realización de este trabajo de investigación, ya que por su labor nos brindan herramientas que nos permiten formular proyectos en beneficio de nuestra sociedad.

- **Universidad Nacional Autónoma de México**
- **Facultad de Medicina veterinaria y Zootecnia**
- **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**
- **Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias**

Se agradece infinitamente a los profesionales que dirigieron este proyecto con sumo compromiso.

- **Dra. Edith Rojas Anaya**
- **Dra. Elizabeth Loza Rubio**
- **Dr. José Juan Martínez Maya**

Me es grato agradecer a mis estimados amigos y colaboradores por sus valiosas sugerencias, aportaciones y gran apoyo.

M. en C. Rocío Parra Laca

M en C. Catalina Tufiño Loza

M en C. Rodrigo Barrón

M.V.Z. Zulema Téllez Velázquez

M.V.Z. Ephrain Verde Rojo

El presente trabajo de investigación fue realizado en las instalaciones del laboratorio de Biotecnología en Salud Animal, del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal (CENID-MA), perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en la Carretera Federal México-Toluca, Km 15.5, colonia Palo Alto, delegación Cuajimalpa, México D.F.

Este trabajo fue desarrollado con apoyo del proyecto CONACYT No. 134099 “Clonación y expresión de la proteína VP2 de un aislado del virus de la necrosis pancreática infecciosa en un sistema de baculovirus y su evaluación *in vivo* con fines de prevención”, siendo responsable del proyecto, la Dra. Elizabeth Loza Rubio.

Se agradece la colaboración del Comité Estatal de Sanidad Acuícola del Estado de Morelos (CESAEM), para la obtención de las muestras de campo a través la M. en C. Rocío Parra Laca.

RESUMEN

La enfermedad conocida como Necrosis Pancreática Infecciosa (NPI por sus siglas en inglés), fue introducida en México en el año 2001 en huevo oculado de trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* proveniente de E.E.U.U. Es un padecimiento altamente contagioso en las etapas tempranas del desarrollo de diferentes especies de salmónidos, siendo más frecuente en sistemas de cultivo intensivos. El objetivo del presente trabajo fue, estandarizar y validar la técnica de RT-qPCR para detectar y cuantificar el virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI). Las muestras biológicas se obtuvieron a partir de diez peces inoculados de manera experimental con un aislamiento del VNPI, además, se utilizaron diez organismos provenientes de muestreos aleatorios de granjas del Estado de Morelos, obteniendo un pool de órganos (riñón, bazo, sacos pilóricos e hígado) de cada espécimen. A partir de cada pool de órganos se realizaron macerados para intentar aislamiento viral en células Bf-2; y para obtener ARN total. Con el ARN se realizó una RT-PCR anidada y la RT-PCR en tiempo real, usando como testigo positivo un transcrito *in vitro* para mejorar la detección del gen VP2 del virus. Los resultados demostraron que el 100% de las muestras de laboratorio y de campo fueron positivas al aislamiento, RT-PCR anidado y RT-qPCR del VNPI. Lo anterior demostró que para este virus cepa MNX-CSM-05 mexicana, la prueba de RT-qPCR, tiene un 100% de sensibilidad y 100% de especificidad. En conclusión la RT-qPCR podría ser utilizada como un método efectivo de detección del VNPI.

Palabras clave: VNPI, gen VP2, RT-qPCR.

ABSTRACT

The disease known as Infectious Pancreatic Necrosis was introduced to Mexico in 2001 on egg of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, from the U.S.A. At the early stages of development of different salmonid species is a highly contagious disease, being more frequent in intensive farming systems. The aim of this study was to standardize and validate the technique of RT-qPCR to detect and quantitate the infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). Biological samples were obtained from ten fishes that were inoculated experimentally with an isolated strain of IPNV, and also ten organisms from random sampling of farms in the State of Morelos were used, obtaining a pool of organs (kidney, spleen, pyloric sacks and liver) of each specimen. From each pool of organs a macerate was made for the isolation of the virus in Bf-2 cells. On the other hand, total RNA was obtained for nested RT-PCR and RT-qPCR, using as positive control a transcribed *in vitro* to improve detection of VP2 gene of the virus. The results showed that 100% of the samples of laboratory and field were positive for the isolation, RT-qPCR and nested RT-PCR of IPNV. This showed that RT-qPCR has a 100% sensitivity with a 100% specificity for the Mexican virus strain MNX-CSM-05 that was tested. In conclusion, the RT-qPCR could be used as an effective method for detecting IPNV.

Key words: IPNV, gen VP2, RT-qPCR.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	12
1.1. Antecedentes	12
1.2. Propiedades fisicoquímicas del virus de la necrosis Pancreática infecciosa.....	16
1.3. Ciclo de replicación viral.....	18
1.4. Patogenia.....	18
1.5. Modo de transmisión.....	20
1.6. Tratamiento, prevención y control.....	20
1.7. Diagnóstico del virus.....	21
1.8. PCR en tiempo real como método diagnóstico.....	22
2. JUSTIFICACIÓN.....	24
3. OBJETIVO.....	25
3.1. Objetivo general.....	25
3.2. Objetivos específicos.....	25
4. HIPÓTESIS.....	26
5. MATERIAL Y METODOS.....	27
5.1. Virus.....	27
5.2. Obtención de muestras biológicas.....	27
5.3. Diseño de iniciadores.....	28
5.4. Obtención del transcrito <i>in vitro</i>	30
5.5. Optimización de las condiciones de la RT-qPCR.....	32
5.6. Curva de calibración estándar.....	32
5.7. Extracción del material genético.....	33

5.8. Condiciones del aislamiento en cultivo celular.....	33
5.9. RT-PCR y PCR anidada de muestras biológicas.....	34
5.10. RT-PCR del gen de constitutivo: Factor de elongación α	35
5.11. RT-PCR en tiempo real de muestras biológicas.....	35
5.12. Análisis estadístico.....	36
6. Resultados.....	37
6.1. Obtención del transcrito <i>in vitro</i>	37
6.2. Aislamiento en cultivo celular de las muestras biológicas..	38
6.3. RT-PCR y PCR anida de las muestras de biológicas.....	40
6.4. Gen de constitutivo.....	41
6.5. Establecimiento de la RT-qPCR.....	42
6.6. Curva de calibración.....	42
6.7. RT-PCR en tiempo real de las muestras biológicas	43
6.8. Análisis estadístico.....	45
7. Discusión.....	46
8. Conclusión.....	49
9. Lista de abreviaturas.....	50
10. Bibliografía consultada.....	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Relación de muestras de campo.....	28
Tabla 2. Iniciadores para la identificación del gen VP2 del VNPI.....	30
Tabla 3. Registro de los resultados obtenidos en pase celular de los macerados de cada pool de tejido de las truchas de laboratorio, de campo y negativas.....	40
Tabla 4. Resultado de las técnicas utilizadas para la identificación del gen VP2 del VNPI.....	45
Tabla 5. Comparación de los tiempos de realización de las técnicas de detección para el VNPI.....	46
Tabla 6. Concordancia de los resultados obtenidos por RT-qPCR y aislamiento en cultivo celular, de acuerdo a la prueba de Kappa de Cohen.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Captura de peces y de producción acuícola mundial.....	12
Figura 2. Anuario estadístico de pesca (SAGARPA-CONAPESCA, 2014).....	13
Figura 3. Esquema del VNPI y sus proteínas estructurales.....	16
Figura 4. Estructura del genoma esquematizada por segmentos y genes	17
Figura 5. Trucha infectada experimentalmente con el VNPI, donde se observan exoftalmia, distención abdominal y obscurecimiento de la piel, características de la enfermedad de NPI.....	19
Figura 6. Amplificación del gen VP2 (1359 pb), para generar transcrito <i>in vitro</i> ...37	
Figura 7. RT-qPCR de transcrito <i>in vitro</i> del gen VP2 del VNPI.....	38
Figura 8. Células Bf2 sin infectar y células infectadas con aislamientos del VNPI.....	39
Figura 9. PCR anidada de las muestras de laboratorio y de campo.....	40
Figura 10. PCR anidada para muestras obtenidas del aislamiento en cultivo celular.....	40

Figura 11. PCR del gen constitutivo.....	41
Figura 12. RT-qPCR del transcrito <i>in vitro</i> del gen VP2 del VNPI.....	42
Figura 13: Curva estándar del gen VP2 del VNPI.....	43

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

La acuicultura constituye una fuente importante de alimentos, no solo a nivel nacional, sino también a nivel mundial. Diversas especies son producidas y después capturadas para abastecer el consumo humano. Según las últimas estadísticas realizadas por la FAO (por sus siglas en inglés “*Food and Agricultural Organization of the United Nations*”), la producción acuícola mundial logró un record de 90,4 millones de toneladas de peso vivo (Figura 1), de las cuales 66,6 millones de toneladas son de “pescado de alimento” en los que se incluyen, peces, crustáceos, moluscos, anfibios, tortugas y otros animales acuáticos (FAO, 2014).

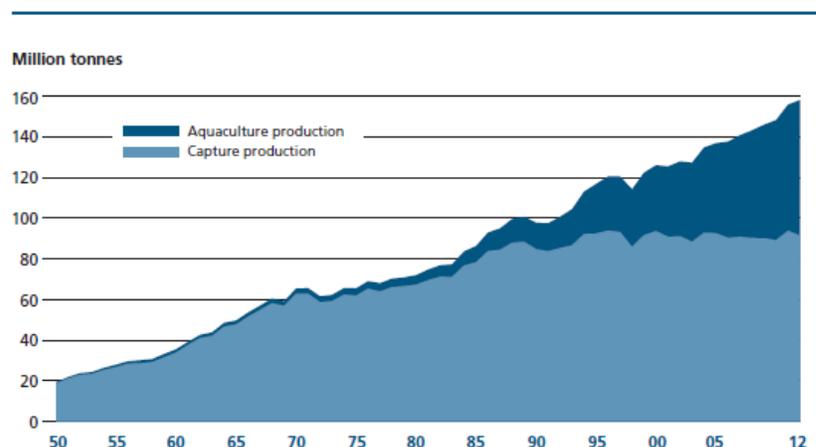


Figura 1. Captura de peces y de producción acuícola mundial (FAO, 2014).

<http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf>

La trucha “arco iris” (*Oncorhynchus mykiss*), es una especie que pertenece a la familia *Salmonidae*. Su origen se remonta en la costa del Pacífico desde Alaska

hasta la península de Baja California en México. Debido a su fácil adaptación al cautiverio, su crianza ha sido ampliamente difundida casi en todo el mundo. En México, se formalizó su reproducción en 1937 y partir de 1970 la actividad comenzó a diversificarse para su comercialización (SAGARPA, 2012).

La truticultura representa una actividad de crecimiento continuo, debido a su rentabilidad con un crecimiento anual en los últimos 10 años del 3.98%. Su volumen de producción se encuentra posicionada en el lugar 17 de la producción pesquera en México. Sin embargo, de acuerdo a su valor económico y sociocultural, se posiciona en el séptimo lugar. La producción de trucha puede obtenerse por acuicultura o por captura; la primera aporta más del 80% de la producción total que hasta el 2014 fue de 1,650 miles de toneladas de peso vivo, siendo el estado de México el mayor productor (SAGARPA-CONAPESCA, 2014) (Figura 2).

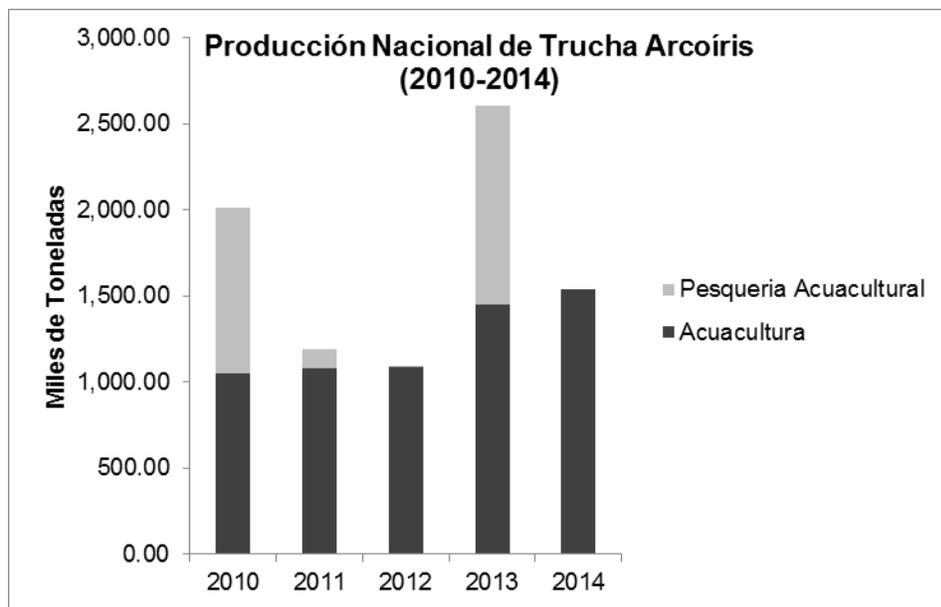


Figura 2. Anuario Estadístico de Pesca SAGARPA-CONAPESCA, 2014.

http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona_anuario_estadistico_de_pesca

El volumen de producción en México de huevo oculado de trucha es muy bajo por lo que no alcanza para abastecer los requerimientos del mercado local y se requiere importar. En el 2010, se importaron 11,570,000 huevos oculados de trucha procedentes de los Estados Unidos de América (SAGARPA, 2012). Sin embargo, esto es un riesgo, ya que el huevo oculado y crías de truchas son fuente importante de la diseminación de enfermedades (Torres-Rojo, 2009).

Aunque la truticultura es considerada una fuente rentable de alimento, es afectada por diferentes enfermedades que merman su producción; entre estos padecimientos las patologías causadas por agentes virales consideradas las de mayor importancia, debido a las dificultades asociadas tanto al diagnóstico como al control, además de la inexistencia de tratamiento terapéutico para dichas infecciones (Fernández-Carriel, 2005). Dentro de las enfermedades virales reportadas en esta especie están la necrosis pancreática infecciosa (NPI), necrosis hematopoyética infecciosas (NHI), necrosis eritrocítica viral (NEV), septicemia hemorrágica viral (SHV) y enfermedad viral por herpes (EVH). Siendo la NPI la de mayor importancia debido al impacto que provoca por su alta mortalidad en peces de primera alimentación. (OIE, 2014; SAGARPA, 2012).

La NPI es una enfermedad aguda altamente contagiosa que puede presentarse en diferentes organismos acuáticos de agua dulce y marina. Es causada por un agente viral miembro de la familia *Birnaviridae* del género *Aquabirnavirus* (Rodríguez S-JS, *et al.*, 2003). La enfermedad asociada a la trucha cultivada fue reconocida en 1940, pero no fue nombrada como NPI hasta mediados de 1950, cuando fue aislado el virus por primera vez en teleósteos por Wolf y colaboradores (Crane y Hyatt, 2011).

Se considera de distribución mundial y aunque no es una zoonosis, su importancia radica en la alta mortalidad, fácil diseminación y falta de tratamiento, considerándose una enfermedad de alto impacto económico. Es por ello que cuando ocurre un brote este debe ser notificado a través de los Comités de Sanidad Acuícola Estatales, los cuales son agentes auxiliares del Sistema Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) para determinar el posible sacrificio del lote infectado así como evitar la movilización de los mismos.

En la actualidad la clasificación de estos virus se lleva a cabo por medio de la prueba de seroneutralización, en la que la mayoría de los *Birnavirus* acuáticos se encuentran antigénicamente relacionados y pertenecen a un serogrupo simple “serogrupo A”; el cual contiene 10 serotipos: A1 (West Buxton, WB, o VR-299), A2 (Spjarup, Sp), A3 (Abild, Ab), A4 (Hecht, He), A5 (Telliana, Te), A6 (Canadá 1, C1), A7 (Canadá 2, C2), A8 (Canadá 3, C3) y A9 (Jasper, Ja), A10 (N1). Sin embargo, unos pocos aislados presentan variabilidad antigénica respecto del serogrupo anterior por lo que han sido clasificados como pertenecientes a otro serogrupo “serogrupo B”, que contiene un serotipo TV-1 (Fernández-Carriel, 2005).

En México el VNPI fue identificado por primera vez en el año 2000, a partir de crías procedentes de Estados Unidos, y se logró aislar en granjas reproductoras de truchas arco iris (Ortega, *et al.*, 2002). En el 2011, Barrera y colaboradores realizaron la genotipificación de los aislamientos e identificaron que ambos se encuentran clasificados en el grupo perteneciente a cepas norteamericanas, de acuerdo a este análisis se reporta diversidad genética entre las regiones productoras del Estado de México. En 2014 Salgado-Miranda y colaboradores, realizaron un análisis filogenético para caracterizar molecularmente aislados de las

principales regiones trutícolas del país, los aislamientos obtenidos entre el 2005 y 2007 confirman que su relación con cepas norteamericanas; Por otra parte el análisis de aminoácidos de la VP2 reveló que todos los aislamientos son de baja virulencia.

1.2. Propiedades fisicoquímicas del virus de la necrosis pancreática infecciosa

El virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI) es un virus de forma icosaédrica, sin envoltura, mide entre 60 y 74 nm de diámetro. Su genoma está conformado por ARN de doble cadena el cual se encuentra organizado en los segmentos A y B, que codifican para las cinco proteínas que lo conforman: VP1, VP2, VP3, VP4 y VP5 (Dobos, 1995; Salgado C., 2006) (Figura 3).

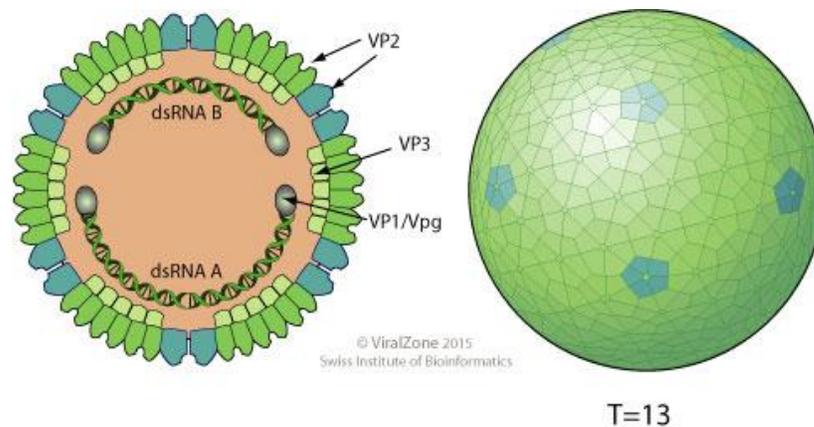


Figura 3. Esquema del VNPI y sus proteínas estructurales.

<http://viralzone.expasy.org>, (noviembre 2015).

El segmento A tiene aproximadamente 2962-3104 pb y presenta dos marcos de lectura abiertos (ORF, por sus siglas en inglés *Open Reading Frame*). El ORF mayor codifica para la poliproteína precursora (PP) formada por pVP2-VP4-VP3- y tiene una masa de alrededor de 106 kDa. Esta poliproteína es fragmentada para generar tres polipéptidos: pVP2 (precursor de la proteína principal de la cápside);

VP3 (proteína menor de la cápside), y NS (proteína no estructural). La proteína pVP2, escinde a VP2 durante la maduración del virus (Rodríguez S-SJ *et al.*, 2003).

El ORF-1 codifica para un polipéptido pequeño de 17-kDa que corresponde a la proteína VP5, es sintetizada en la fase inicial de la replicación viral y se sugiere que inhibe la apoptosis, por lo que favorece la supervivencia del virus (Ortega, 2007).

El segmento B del genoma tiene un tamaño entre los 2731-2784 pb y codifica para la proteína VP1, con una masa de 94 kDa. La VP1 se encuentra como un polipéptido libre de actividad asociada a la ARN polimerasa ARN dependiente, y como una proteína anclada al genoma nombrada como VPg, la cual se liga al extremo 5' de cada segmento (Rodríguez S-SJ, *et al.*, 2003; Crane y Hyatt, 2011) (Figura 4).

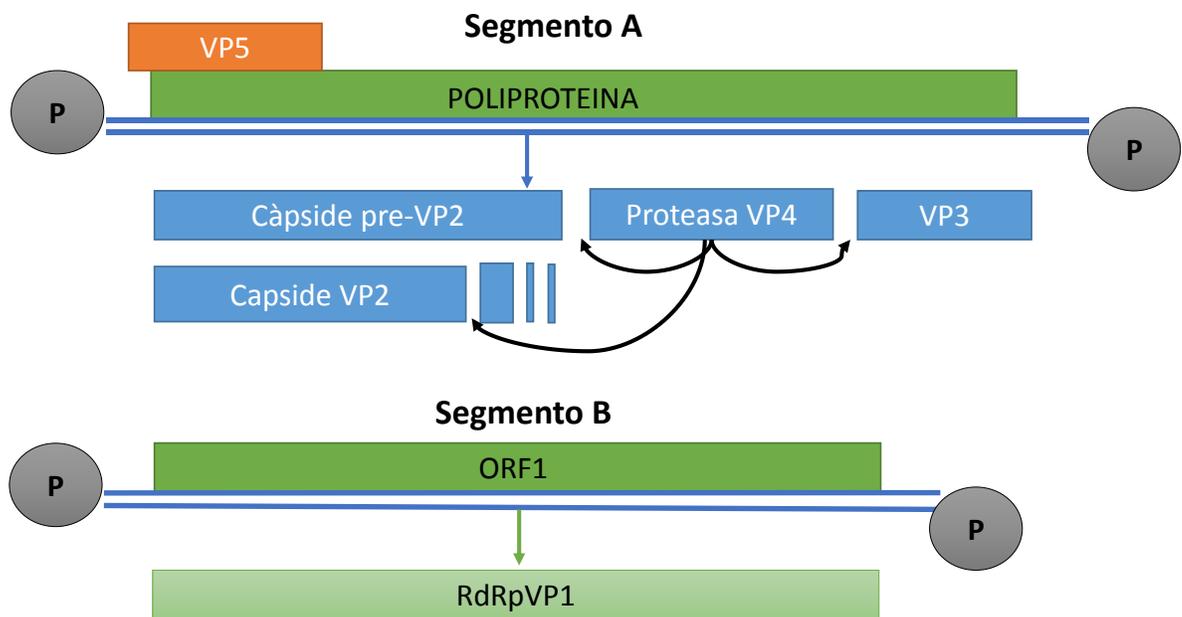


Figura 4. Estructura del genoma esquematizada por segmentos y genes.

1.3. Ciclo de replicación viral

Los *Birnavirus* son los únicos virus de doble cadena de ARN (ARNds) con una proteína ligada al genoma y al ser un virus ARN, se replica en el citoplasma (Maclachlan N. J. y Dubovi E. J, 2011).

El ciclo infectivo inicia con la unión del virus a la membrana celular; posteriormente, ocurre la adsorción o penetración, donde el virus entra a la célula por endocitosis, las proteínas de la cápside sufren una pequeña rotura y liberan el ARN al citoplasma, lugar donde se realiza la replicación del virus, iniciando con la replicación de las proteínas VP1, VP2, VP3 y VP4 o NS y terminando con la replicación del genoma viral (Ortega, 2007). Posteriormente el virus es liberado por lisis celular debido a la acumulación de viriones en el citoplasma (Dobos, 1995; Maclachlan y Dubovi, 2011). En cultivos *in vitro*, podemos observar ECP entre 16 a 20 horas post-infección (pi) a 22 °C. (Ortega, 2007).

1.4. Patogenia

Clínicamente la infección causada por el VNPI, varía dependiendo del serotipo, etapa de cultivo, condición fisiológica de los peces; así como también, condiciones ambientales de las zonas de cultivo, tales como temperatura, contenido de oxígeno del agua y densidad de cultivo (Fernández-Carriel, 2005; Rodríguez, *et al.*, 2003).

La enfermedad se caracteriza por cambios de comportamiento que incluyen anorexia y movimientos natatorios circulares intercalados con ataxia, además de observar pigmentación oscura de la piel (hiperpigmentación), distensión abdominal, exoftalmia leve o moderada, branquias pálidas; se pueden presentar hemorragias en la zona ventral, incluidas las aletas y presencia de pseudofecas

de color blanquecino (Rodríguez, *et al.*, 2003). Sin embargo, en algunos casos pueden no manifestar ningún signo aparente (Figura 5).



Figura 5. Trucha con exoftalmia, distensión abdominal y obscurecimiento de la piel, características de la enfermedad de NPI.

Imagen: Catalina Tufiño Loza, Proyecto CONACyT 134099

Al realizar la necropsia se observa que el lumen gástrico e intestinal carece de alimentos y contiene un moco de color blanco considerado patognomónico (Rodríguez, *et al.*, 2003), lo que asegura la presencia del virus y su patogenicidad. En algunos peces infectados se observan petequias en el ciego pilórico y tejido adiposo, y ascitis en la cavidad. A menudo se observan aumentados de tamaño y pálidos los órganos como: bazo, corazón, hígado y riñones, además de petequias y hemorragias en toda la masa visceral.

Los hallazgos histopatológicos incluyen focos de necrosis coagulativa en páncreas, riñón e intestino, así como enteritis catarral aguda. La enfermedad tiene un impacto considerable en la salmonicultura y truticultura debido a que causa una elevada mortalidad en alevines y crías, ya que puede afectar al 90% de la población infectada; al término de la enfermedad los organismos sobrevivientes se convierten en portadores y diseminadores del virus por largos periodos de tiempo (Ortega, 2007).

1.5. Transmisión

La transmisión es tanto por vía vertical como horizontal. La transmisión horizontal ocurre por contacto directo con agua contaminada con las heces y orina de peces infectados, por lo que es el principal mecanismo de propagación entre alevines, se dice que un mililitro de descarga intestinal de un pez enfermo con VNPI, contiene aproximadamente un millón de partículas víricas (Ortega, 2005). La transmisión vertical es por medio de productos sexuales, en donde ocurre una adsorción viral a la superficie del espermatozoide y en los gametos femeninos a través del líquido folicular (Rodríguez, *et al.*, 2003). Bebak y McAllister (2009) reportaron que el virus se transmite a partir de crías infectadas en un periodo mínimo de dos días con un 75% de infección de la población total expuesta.

El VNPI ha sido aislado a partir de fluido ovárico y ovas lavadas (Rodríguez, *et al.*, 2003), también ha sido aislado a partir de alimento comprimido húmedo y sedimento marino y en heces de aves silvestres piscívoras que se consideran vectores (Cutrin, *et al.*, 2000).

1.6. Tratamiento, prevención y control

En la actualidad, no existe ningún tratamiento terapéutico efectivo para el control de la enfermedad, por ello la aplicación de medidas de bioseguridad, desinfección de ovas, sistemas de incubación individual, aplicación de vacunas y realización de pruebas de detección del virus en reproductores, son primordiales para la prevención (Fernandez-Carriel, M.B., 2005).

Algunas de las buenas prácticas de control y prevención inmediatas, son evitar la introducción de huevos oculados que provengan (o se tenga la sospecha) de

reproductores que pudieran ser portadores del VNPI, así como, evitar la movilización en zonas donde la enfermedad es endémica.

A partir del 2010 el Instituto Nacional de Pesca (INAPESCA) lleva a cabo un programa de producción de huevo de trucha arcoíris con fotoperiodo, que permite contar con más de un desove al año, reduciendo así el volumen de importación y con ello el riesgo de introducción de enfermedades (INAPESCA, 2010). Además se han desarrollado programas de inspección sanitaria piscícola para identificar a las poblaciones infectadas; sin embargo, el éxito de tales programas depende de la detección e identificación rápida de patógenos específicos.

1.7. Diagnóstico del virus

El manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos, publicado por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), indica que las técnicas para la identificación de virus de peces sin signos, se fundamentan en el aislamiento viral en líneas celulares de peces como Fibroblasto de alevín *Lepomis Macrochirus* (BF-2) y Células Embrionarias de *Salmón Chinook* (CHSE-214), seguido de pruebas inmunológicas. El diagnóstico a partir de peces enfermos inicia con la histología en los tejidos infectados, confirmado posteriormente por el aislamiento viral y la identificación inmunológica en cultivo celular (OIE, 2006). Sin embargo, el aislamiento es una técnica relativamente cara y el tiempo requerido para su identificación es alrededor de tres semanas, lo que retrasa el diagnóstico.

La necesidad de ofrecer resultados más rápidos y exactos, han dirigido a los laboratorios de diagnóstico a llevar a cabo procedimientos tales como fluorescencia indirecta de anticuerpos (IFAT, por sus siglas en inglés) y técnicas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa convencional (PCR, por sus siglas en inglés) entre otras (Tapia D., *et al.*, 2015).

En los últimos años la PCR ha surgido como una metodología ampliamente utilizada en investigación biomédica, ya que puede detectar o cuantificar cantidades muy pequeñas de secuencias específicas de ácidos nucleicos (López-Lastra, *et al.*, 1994; Dorak, 2007; Mauren, *et al.*, 2011). Estos ensayos facilitan la identificación de muchos patógenos, lo que permite el procesamiento de grandes cantidades de muestras en un periodo de tiempo muy corto, siendo esto un instrumento de vital importancia para el diagnóstico oportuno de diversas enfermedades (Maclachlan N. J. y Dubovi E. J., 2011).

Existen diversas variantes de la técnica de PCR, tales como la transcripción reversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa convencional (RT-PCR) o en tiempo real (RT-qPCR); Para fines del presente trabajo nos enfocaremos a la RT-qPCR, que cuantifica los fragmentos amplificados del DNA complementario.

1.8. RT-qPCR como método diagnóstico

La RT-PCR, se ha convertido en el método de elección para el diagnóstico e identificación de virus ARN, debido a su alta sensibilidad, reproducibilidad y rapidez de la obtención del resultado; además, de ser una prueba cuantitativa cuando se realiza en tiempo real (Maclachlan N. J. y Dubovi E. J., 2011).

La identificación de secuencias específicas de interés, pueden detectarse mediante una sonda que emite fluorescencia de manera proporcional a la cantidad de ADN presente en cada muestra y un software que correlaciona la emisión de esa fluorescencia (Dorak, 2007; Mauren, *et al.*, 2011).

Actualmente la RT-qPCR es una técnica ampliamente utilizada en diagnóstico para detectar virus ARN, debido a que su aplicación es simple, exacta y ofrece

resultados más rápidos en comparación con otros métodos de detección molecular (Tapia D. *et al.*, 2015).

En diversas investigaciones se ha utilizado esta técnica molecular para la detección y cuantificación de VNPI (Calleja, F., *et al.*, 2012; Tapia D. *et al.*, 2015;). También se ha realizado estudios sobre la expresión de genes después de la infección por VNPI (Guerrero L., *et al.*, 2008; Barrera-Mejia M., *et al.*, 2011), entre otros estudios, en donde se utiliza la RT-qPCR, como método diagnóstico (López-Lastra, *et al.*, 1994; Hirayama T., *et al.*, 2005; Mauren K., *et al.*, 2014).

Cuando los ensayos son desarrollados con el objetivo de diagnosticar o detectar una enfermedad o patógeno, se debe tomar en cuenta algunas variables como tipo y/o calidad de la muestra. Por lo que se recomienda realizar un método validación de la prueba (Órpetveit I., *et al.*, 2010, Mauren K., *et al.*, 2014).

Hasta ahora, las pruebas moleculares de patógenos de animales acuáticos no han conseguido extender su aplicación, sin embargo es de considerarse, debido a que aportaría grandes beneficios en el ámbito de la acuicultura, ya que la inspección o diagnóstico de patógenos acuáticos, afecta principalmente la movilización tanto comercial como de recursos naturales y por ende a la producción.

2. JUSTIFICACIÓN

Debido a que el VNPI es un organismo patógeno que provoca pérdidas económicas en la acuicultura, y que en México, la trucha tiene un lugar importante en la producción nacional acuícola, es necesario implementar pruebas de diagnóstico eficientes que permita detectar y cuantificar al virus en poblaciones susceptibles.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general.

Estandarizar y validar la técnica de Transcripción Reversa seguida de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real, para detectar y cuantificar el virus de la necrosis pancreática infecciosa, a partir de muestras de truchas experimentalmente inoculadas con el virus, y compararlas con organismos provenientes de explotaciones acuícolas para evaluar la sensibilidad y especificidad de la técnica.

3.2. Objetivos específicos.

- 3.2.1. Realizar la síntesis *in vitro* de los ARNm del gen VP2 del VNPI, utilizando el promotor de la polimerasa T7.
- 3.2.2. Establecer las condiciones de la RT-qPCR del gen VP2 de VNPI a partir de una cadena molde originada en la síntesis *in vitro*, utilizando un sistema de detección secuencia específica de sonda Taqman.
- 3.2.3. Realizar aislamiento del VNPI en cultivo celular a partir del macerado de las muestras biológicas.
- 3.2.4. Realizar la detección del gen VP2 del VNPI, por medio de la técnica de RT-PCR anidada, a partir del ARN de las muestras biológicas.
- 3.2.5. Realizar la cuantificación absoluta del gen VP2 del VNPI por RT-qPCR a partir del ARN de las muestras biológicas.

4. HIPÓTESIS

La RT-qPCR podrá detectar la presencia del VNPI, con mayor rapidez y eficiencia que las pruebas estándar, como el aislamiento viral y la RT-PCR convencional o anidada, aun cuando las muestras posean una baja cantidad de partículas virales.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Virus

Para infección experimental de las truchas en el laboratorio y para la estandarización de la PCR, se utilizó el aislamiento mexicano del VNPI obtenido y caracterizado molecularmente en trabajos previos en el Laboratorio de Biotecnología en Salud Animal del CENID-MA del INIFAP (Salgado-Miranda, *et al.*, 2014).

5.2. Obtención de las muestras biológicas.

Muestras negativas: Se utilizaron cinco truchas arcoíris (*O. mykiss*), obtenidas del Centro Acuícola “El Zarco” que está certificado como “Centro libre del VNPI” por el SENASICA.

Muestras de laboratorio. Se utilizaron diez truchas arcoíris (*O. mykiss*), obtenidas del Centro acuícola “El Zarco”. Los organismos fueron inoculados experimentalmente con un aislamiento del VNPI caracterizado molecularmente en trabajos previos en el laboratorio de Biotecnología en Salud Animal del CENID-MA del INIFAP, para otros fines experimentales, con número de folio: CBCURAE-006. Para este trabajo fueron nombradas como “*muestras de laboratorio*”. Los especímenes presentaron signos presuntivos a una infección por el VNPI, llegando a la muerte en diferentes días post infección. A cada individuo se realizó la necropsia para obtener: bazo, hígado, riñón y sacos pilóricos, los cuales se maceraron volumen/ volumen con PBS estéril y los sobrenadantes se conservaron a -80°C hasta su uso.

Muestras de campo. Adicionalmente, se obtuvieron diez truchas arcoíris de cuatro granjas asociadas al padrón del Comité del Estado de Morelos (CESAEM),

nombradas en este estudio como “*muestras de campo*”. Las muestras fueron obtenidas por muestreos aleatorios realizados por el personal del CESAEM (Tabla 1).

Tabla 1. Relación de muestras de campo.

Oncorhynchus mykiss

Granja	Localidad	N	pH	T°C	No. de estanque
1	Santa María	5	8.1	16	1
2	Santa María	5	8.2	15.2	1
3	Ahueyocan	5	7.5	13.1	8
4	Ahueyocan	5	7	15.4	5

Los especímenes fueron transportados dentro de bolsas con agua y oxígeno que se colocaron dentro de contenedores con hielo y fueron mantenidos en las instalaciones del CENID-MA durante un día, para observar su comportamiento, y la posibilidad de la existencia de lesiones externas propias de la enfermedad. Posteriormente se les realizó la eutanasia con una sobredosis del sedante M-22 (Sigma, USA). A estos organismos se les realizó la necropsia obteniendo los mismos órganos que en las muestras de laboratorio y fueron macerados y conservados de la misma manera.

5.3. Diseño de iniciadores.

Iniciadores para el transcrito in vitro: Los iniciadores para amplificar el gen VP2 del VNPI completo, se diseñaron utilizando una secuencia consenso de secuencias mexicanas de dicho gen. Con el objetivo de sintetizar un transcrito *in vitro*, al iniciador sentido se le agregó una secuencia de reconocimiento al promotor T7 (iniciadores: Trans-VP2 y VP2topo-REV, tabla 2).

Iniciadores para la RT-PCR en punto final: Se utilizaron dos pares de iniciadores para llevar a cabo la detección del gen VP2 del VNPI por RT-PCR en punto final (Diag-VP1-F, Diag-VP1-R) y RT-PCR anidada (RT-PCRa) (Diag-an-F y Diag-an-R) (Salgado-Miranda, *et al.*, 2014).

Iniciadores para una RT-PCR en punto final del gen constitutivo: Finalmente se utilizó un par de iniciadores, para amplificar el gen Factor de elongación α de trucha arcoíris (*O. mykiss*), con el objetivo de confirmar que el material genético utilizado se encuentra en óptimas condiciones (iniciadores: REF1a-truF y REF1a-truR), (Martínez, *et al.*, 2012).

Iniciadores para la RT-qPCR: Se diseñaron un par de iniciadores que amplifican un fragmento de 104 pb del gen VP2, así como una sonda TaqMan (iniciadores: VP2-qF, VP2-qR y sonda: VP2PROBE). Las secuencias de todos los iniciadores se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Iniciadores para la identificación del gen VP2 del VNPI.

Prueba	Nombre	Tamaño del producto	Localización	Secuencia
Transcrito <i>in vitro</i>	Trans-VP2	1359 pb	1-19	5'CAATAATACGACTCACTATAGGGATG AGCACATCCAAGGCA-3'
	VP2-topoREV		1338-1359	5'-CCATCCCCATGCCTTTGAGGT-3'
RT-qPCR	VP2-qF	104 pb	478-500	5'-GGAATCACCGTCCTGAATCTAC-3'
	VP2-qR		562-582	5'-CTCATCCTTGCTCCGTTTCAT-3'
	Sonda		508-532	5'-TTTGACAAGCCATACGTCCGCCTA-3'
PCR anidada	Diag-VP1-F	682 pb	137-160	5'-CCGAATCAGGAAGTGGMMTTCTTG-3'
	Diag-VP1-R		796-818	5'-GTGACCACKGGGACGTCATTGTC-3'
	Diag-an-F	229 pb	482-503	5'-TCACCGTCCTGAATCTACCAAC-3'
	Diag-an-R		688-710	5'-GTTGTGGAGTTSACGATGTCGGC-3'
PCR gen constitutivo	EF1- α -F	150 pb	561-583	5'-GATCCAGAAGGAGGTCACCA-3'
	EF1- α -R		694-713	5'-TTACGTTTCGACCTTCCATCC-3'

5.4. Obtención del transcrito *in vitro*

La transcripción *in vitro* es un procedimiento que tiene como objetivo generar ARNm de un gen de interés, en este caso el gen VP2 del VNPI, que sería utilizado como control positivo del ensayo de RT-qPCR.

Para la síntesis del transcrito *in vitro* del gen VP2 del VNPI, se utilizaron iniciadores diseñados para amplificar el gen VP2 completo añadiendo una

secuencia adicional reconocida por la polimerasa T7 que es la encargada de realizar la transcripción *in vitro* de ADNc a ARNm.

Para la amplificación del gen VP2 se utilizó un plásmido que contenía la secuencia completa del gen VP2 (pUCVP2/VNPI). En la PCR se utilizaron los iniciadores Trans-VP2 y VP2-topoREV y el kit FastStart High Fidelity PCR System, dNTPack (Roche, Alemania), con la siguiente mezcla de reacción: FastStart High Fidelity Reaction Buffer 10X, 2 mM de DMSO, 25 mM de MgCl₂, 10 mM dNTPs, 10 μM de cada iniciador, 0.5 U de FastStart High Fidelity Enzyme, 1.5 ul de ADN y agua ultrapura. Para la PCR se utilizó un termociclador iCycler (BioRad, CA, USA) bajo las siguientes condiciones: 94 °C durante 1 minuto, 4 ciclos: 94 °C por 1 minuto, 40 °C por 1 minuto y 72 °C por 2 minutos; 35 ciclos 94 °C por 1 minuto, 60 °C por 1 minuto y 72 °C por 2 minutos; extensión final 72 °C por 2 minutos.

El producto de PCR obtenido fue purificado en gel de agarosa utilizando el kit QIAquick® gel extraction (Qiagen, Hilden, Germany), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Posteriormente el producto de PCR fue purificado y concentrado utilizando el kit Zymo Research DNA clean and concentrator (Zymo Research, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante y se cuantificó en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo scientific, USA).

Para la transcripción *in vitro* se utilizó el kit RiboMAX™ Large Scale RNA Production Systems SP6 and T7 (Promega, USA). Se preparó la siguiente mezcla de reacción: 5 μL T7 Transcripción 5X Buffer, 1.9 μL de cada nucleótido trifosfatado, 10 μg de ADN del gen VP2 purificado y 2.5 μL de la mezcla de enzimas. La reacción se incubó a 37 °C por 4 horas y al finalizar se adiciono 1 μL de ADNase RQ1 RNase-Free a una concentración de 1U/μg al templado de ADN incubando por 15 min a 37 °C para eliminar ADN contaminante. Para concentrar el

transcrito *in vitro* y limpiarlo de enzimas, se realizó una extracción con fenol:cloroformo:isoamílico. Al final el botón de transcrito *in vitro* se le añadió 70 μL de buffer TE y se almaceno a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

La PCR fue repetida varias ocasiones hasta alcanzar aproximadamente 5 μg de producto de PCR, posterior a la a la purificación y concentración se llevó a cabo la transcripción *in vitro*, en la cual que se obtuvieron 4.711 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ del transcrito del gen VP2 del VNPI, para utilizarse como plantilla en la RT-qPCR.

Para verificar que lo obtenido en la transcripción *in vitro* correspondía al gen VP2 del VNPI, se realizó una RT-PCR convencional, utilizando los iniciadores Diag-VP1-F y Diag-VP1-R que corresponden al primer fragmento (682 pb) de la proteína (Figura 7).

5.5. Optimización de las condiciones de la RT-qPCR

Para la RT-qPCR se utilizó el kit iTaq™ Universal Probes One-Step Kit (Bio-Rad, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Utilizando los iniciadores de la tabla 2. Las condiciones de RT-qPCR fueron: 1 ciclo de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 minutos; 40 ciclos de $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 segundos y $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 segundos.

5.6. Curva de calibración o estándar

Para la realización de la curva estándar, se realizaron diluciones décuples seriadas del transcrito obtenido de manera *in vitro*, a partir de una concentración de $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$, el cual fue utilizado como templado de ARN. Este ARN fue transcrito y amplificado en un solo paso utilizando el iTaq™ Universal Probes One-Step Kit (Bio-Rad, CA, USA), tal como se especificó anteriormente.

Para garantizar los resultados de la curva, ésta se realizó por triplicado con las mismas condiciones, para evaluar el límite de detección, eficacia y sensibilidad del ensayo.

5.7. Extracción de material genético

La extracción de ARN de todas las muestras de laboratorio y de campo se realizó utilizando QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) siguiendo las indicaciones del fabricante, una vez obtenido el ARN fue cuantificado en un espectrofotómetro Nano Drop (Thermo scientific, USA), conservando el material a -80°C, hasta su uso.

5.8. Condiciones del aislamiento en cultivo celular

Para el aislamiento viral se realizaron macerados de pool de órganos (riñón, bazo, sacos pilóricos e hígado), de \pm 1.0 gramos en 900 μ l de PBS estéril elaborado con agua DEPC, homogeneizado con micromortero en tubo de microfuga estéril, para cada uno de los individuos analizados. A partir de cada macerado se realizaron diluciones 1:10 y 1:100 con medio Leibovitz L-15 para analizarlos como inóculos. La mezcla fue filtrada por 0.2 μ m y se mantuvo a -80 °C hasta su utilización.

Para el aislamiento viral se utilizó la línea celular Bf-2. En una placa 24 pozos (Corning, México) para lo anterior se sembraron 300,000 células por pozo y se utilizó medio Leibovitz L-15 (In Vitro, México) suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB) (Biowest, Mexico) adicionado con 100 IU/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomycin y 0.25 μ g/ml de anfotericina B (In vitro, México). Una vez que las placas mostraron un 90% de confluencia se inocularon dos pozos por muestra con

200 µL del sobrenadante de los macerados filtrados; uno con cada dilución. Las placas se incubaron una hora a 15 °C, y posteriormente se agregó un ml de Medio L-15 suplementado con SFB al 2% por pozo. Las placas se incubaron a 15 °C durante 7 días. Los resultados fueron observados por microscopía simple y registrados, comparándolos con la evolución de los controles positivos y negativos, determinando la presencia o ausencia del efecto citopático (EPC) (OIE, 2006).

Al presentar EPC se recolectó el sobrenadante y se mantuvo a -80 °C para posteriormente realizar el siguiente pase. Los sobrenadantes fueron descongelados y centrifugados a 1200 xg durante 10 minutos para sedimentar residuos de células y obtener virus. A todas las muestras se les realizaron tres pases consecutivos, para determinar el resultado (OIE, 2006).

5.9. RT-PCR y PCR anidada de muestras biológicas

Para la técnica RT-PCR se realizó la síntesis ADN complementario (ADNc) a partir del ARN de las muestras. Para este procedimiento se utilizó la enzima M-MLV Reverse transcriptase (Invitrogen, Canadá), siguiendo las instrucciones del proveedor y utilizando Oligo dT (Invitrogen, Canadá). Este ADNc fue conservado a -20°C, hasta su utilización.

Para la PCR se utilizó el kit Thermo Scientific Dream Taq DNA Polymerase (Thermo scientific, USA) con la siguiente reacción: 10X Dream Taq Buffer conteniendo 20 mM de MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 1 U Dream Taq Polimerase, 10 µM de cada iniciadores, 2.5 µl de ADN y agua ultrapura. La amplificación se realizó en un termociclador iCycler (BioRad, CA, USA) bajo las condiciones de ciclaje: 95°C

por 3 minutos, 35 ciclos: 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto; finalmente un ciclo de 72°C por 7 minutos. Los productos fueron visualizados en gel de agarosa al 1% teñidos con GelRed™ Nucleic Acid Stain (Biotium, USA) y documentados en un fotodocumentador GelDoc XR (Bio-Rad, CA, USA). El par de iniciadores utilizados en esta PCR amplifican 682 pb del gen VP2

Para la PCR anidada se utilizó el mismo kit y las condiciones descritas previamente. Los iniciadores para la PCR anidada se enlistan en el tabla 2. Los productos fueron visualizados como se describió previamente.

5.10. RT-PCR del gen constitutivo: Factor de elongación α .

Para la amplificación del gen del Factor de Elongación- α de la trucha arcoíris (Martínez S. *et al.*, 2012) se utilizó el ADNc (sintetizado previamente) de todas las muestras utilizando el kit Thermo Scientific Dream Taq DNA Polymerase (Thermo scientific, USA) con la siguiente reacción: 2.5 μ l de Dream Taq Buffer (10X) conteniendo 20 mM de MgCl₂, 1 μ l de 0.2 mM dNTPs, 0.125 μ l 1U de Dream Taq Polimerase, 1 μ l de cada iniciador a 10 μ M, 2.5 μ l de ADN y agua ultrapura. La amplificación se realizó en un termociclador iCycler (BioRad, CA, USA) bajo las condiciones de ciclaje: 94°C por 30 segundos, 35 ciclos: 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos; finalmente un ciclo de 72°C por 2 minutos. Los productos fueron visualizados en gel de agarosa al 1.5 % teñidos con GelRed™ Nucleic Acid Stain (Biotium, USA) y documentados en un fotodocumentador GelDoc XR (Bio-Rad, CA, USA).

5.11. RT-PCR en tiempo real de muestras biológicas

La técnica se realizó con ARN de muestras de laboratorio, muestras de campo,

controles positivos, controles negativos, y sobrenadantes del aislamiento en cultivo celular, se utilizó el kit iTaq™ Universal Probes One-Step Kit (Bio-Rad, CA, USA), tal como se describió en el punto 5.5.

5.12. Análisis estadístico

Se comparó estadísticamente el aislamiento en cultivo celular como prueba estándar de oro y la RT-qPCR como propuesta de una técnica para la identificación del VNPI.

El coeficiente de Kappa de Cohen, es una medida estadística que ajusta el efecto del azar, en la proporción de la concordancia observada para elementos cualitativos. Por lo que mide el acuerdo/concordancia entre dos observadores, en sus correspondientes clasificaciones (Thrusfield, M., 2005)

La fórmula que se aplicó fue la siguiente:

$$k = \frac{\text{Pr}(a) - \text{Pr}(e)}{1 - \text{Pr}(e)}$$

Donde:

Pr(a)= acuerdo observado relativo entre observadores.

Es el porcentaje de común acuerdo observado, tanto positivo como negativo.

$$\frac{\text{Positivos en común} + \text{Negativos en común}}{\text{Total de muestras}} = \text{Porcentaje de acuerdo observado}$$

Pr(e)= probabilidad hipotética de acuerdo por azar

Es la suma del resultado de la ecuación **Pr(a) * Pr(b)** de ambas variables

La concordancia entre resultados, es que tanto concuerdan. Comúnmente la concordancia se expresa como un número "0" donde no representa ningún acuerdo y 1 representa replicas completas.

6. Resultados

6.1. Transcripción *in vitro*

Una vez establecida la PCR del gen completo de VP2, los productos de amplificación se visualizaron en gel de agarosa como se muestra en la figura 6.

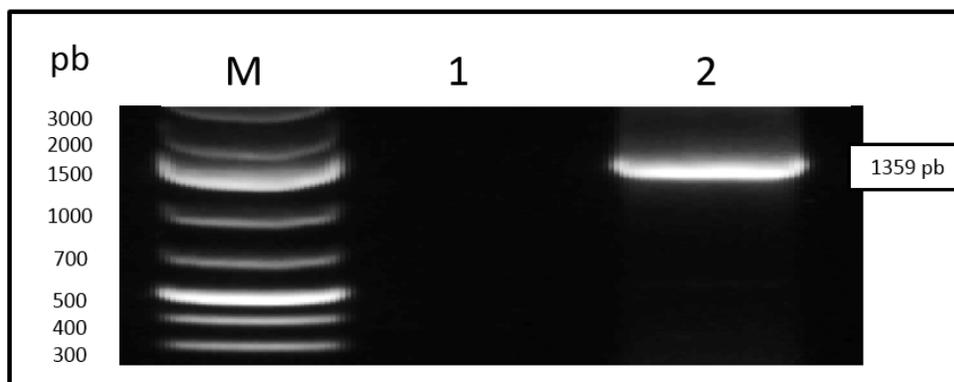


Figura 6. Amplificación del gen completo de VP2 (1359 pb) adicionando la secuencia del promotor.

M: Marcador de peso molecular de 1Kb Plus DNA Ladder (invitrogen); Carril 1: Control Negativo; Carril 2: ADN del gen VP2 mas la secuencia de 23 nt que reconoce el promotor.

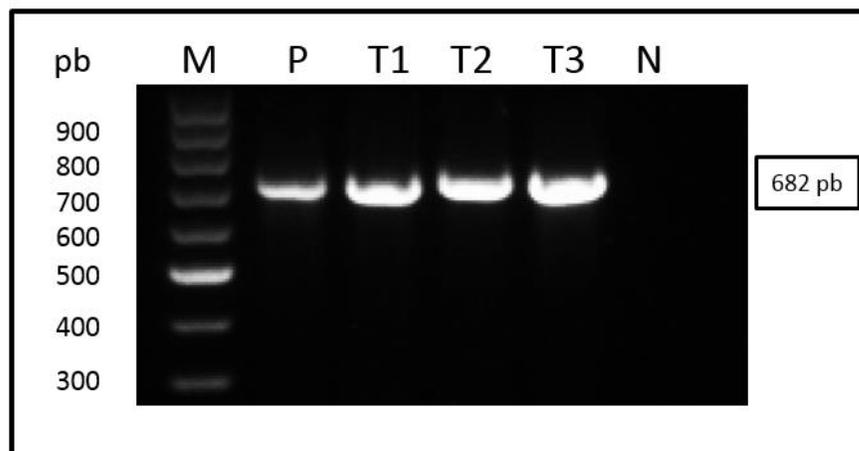


Figura 7. RT-PCR de transcritos *in vitro* correspondientes al primer fragmento de la PCR anidada de la VP2 del VNPI.

M: Marcador de peso molecular de 100 pb DNA Ladder (Invitrogen); P: control positivo (plásmido pUCVP2/VNPI); T1: Transcrito 1; T2: Transcrito 2; T3: Transcrito 3; N: Control Negativo

6.2 Aislamiento en cultivo celular de las muestras biológicas.

Como se describe en Materiales y Métodos los sobrenadantes de los macerados de cada pool de tejidos (riñón, bazo, sacos pilóricos e hígado) de las truchas de laboratorio, de campo y negativas, fueron inoculadas en cultivos de la línea celular Bf2 y los resultados se muestran en la tabla 3. Muestras de campo, de las granjas 1 y 2 mostraron un efecto citopático moderado en el tercer pase, posiblemente debido a que contenían pocas partículas virales, por lo que se realizó un cuarto pase en todas las muestras de campo. Posterior a los 2 días del cuarto pase las muestras mostraron un efecto citopático evidente.

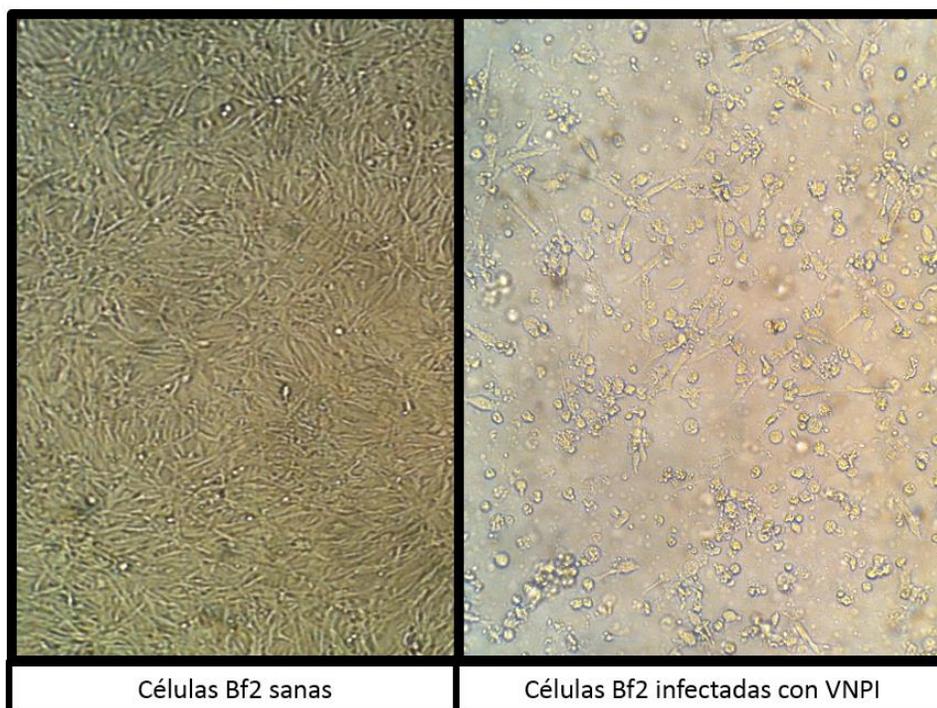


Figura 8. Células Bf2 sin infectar y células infectadas con un aislamiento del VNPI.

Tabla 3. Registro de los resultados obtenidos en pase celular de los macerados de cada pool de tejido de las truchas de laboratorio, de campo y negativas.

MUESTRAS	IDENTIFICACIÓN	Número de pase donde se observó efecto citopático
L A B O R A T O R I O	L 1	segundo pase
	L 2	Segundo pase
	L 3	Primer pase
	L 4	Primer pase
	L 5	Primer pase
	L 6	Segundo pase
	L 7	Primer pase
	L 8	Primer pase
	L 9	Primer pase
	L10	Primer pase
C A M P O	C 1	Tercer pase
	C 2	Cuarto pase
	C 3	Tercer pase
	C 4	Tercer pase
	C 5	Tercer pase
	C 6	Cuarto pase
	C 7	Cuarto pase
	C 8	Cuarto pase
	C 9	Cuarto pase
	C10	Cuarto pase
N E G A T I V O S	N1	No se observó
	N2	No se observó
	N3	No se observó
	N4	No se observó
	N5	No se observó

6.3. RT- PCR convencional y PCR anidada de las muestras biológicas

Una vez obtenidos los ADNc de las muestras de campo y de laboratorio, se procedió a realizarles la técnica de PCR en punto final utilizando los iniciadores Diag-VP1-F y Diag-VP1-R y los resultados se muestran en el Cuadro 2. Posteriormente con ese producto de PCR, se realizó la PCR anidada donde los iniciadores amplificaron un producto de 229 pb del gen. Los productos de amplificación se observan en la Figura 9 y Tabla 4; todas las muestras resultaron positivas a la PCR anidada.

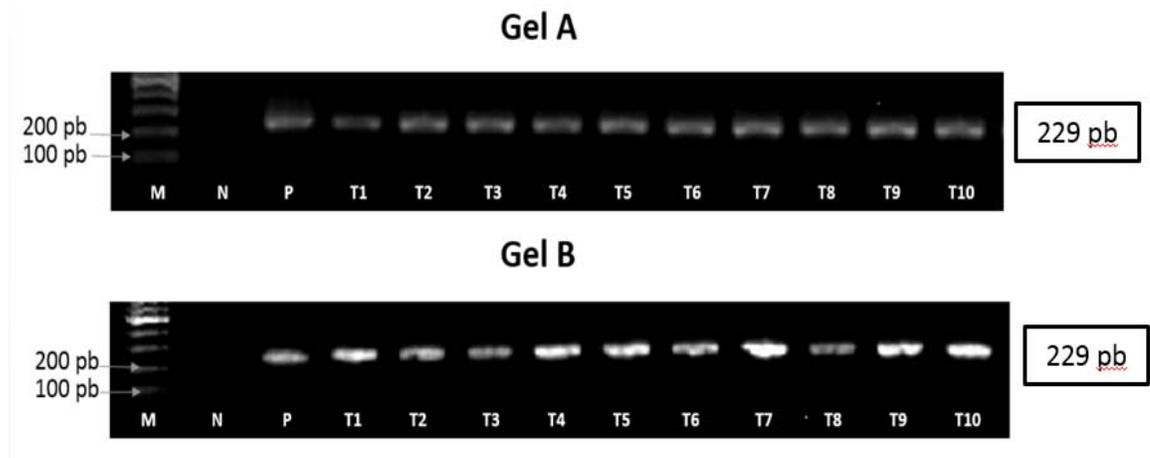


Figura 9. PCR anidada de muestras de laboratorio (gel A) y de campo (gel B).

M: marcador de peso molecular GeneRuler 100pb DNA Ladder (invitrogen); N: control negativo; P: control positivo; T1: trucha 1; T2: trucha 2; T3: trucha 3; T4: trucha 4; T5: trucha 5; T6: trucha 6; T7: trucha 7; T8: trucha 8; T9: trucha 9; T10: trucha 10.

Por otro lado, a partir de los sobrenadantes del aislamiento en cultivo celular se obtuvo el ARN y el ADNc para evaluarlo por ambas técnicas. Todas las muestras (20) fueron positivas a la RT-PCR anidada. En el caso de los controles negativos no se obtuvieron productos de amplificación en ninguna de las muestras por ambas pruebas (Figura 10).

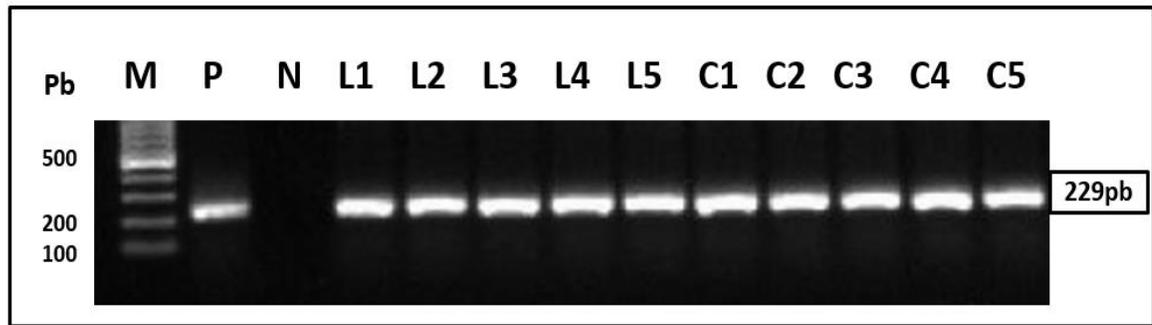


Figura 10. PCR anidada para muestras obtenidas de aislamientos en cultivo celular. M: marcador de peso molecular GeneRuler 100pb DNA Ladder (invitrogen); P: control positivo; N: control negativo; Muestras correspondientes a aislamientos provenientes de tejidos de trucha arcoíris correspondientes al laboratorio (L1-L5) y de campo (C1-C5).

6.4. RT-PCR del gen constitutivo

Para evaluar la positividad y calidad del ARN a utilizar en las pruebas moleculares, se detectó el gen constitutivo (Factor de Elongación α) en todas las muestras utilizadas. Todas las muestras amplificaron un fragmento de 150 pb de dicho gen (Martínez-Alonso S., *et al.*, 2012) con lo cual se determinó que los ARN eran viables para ser utilizados. En la figura 11, se muestran los amplicones de algunas de las muestras de trabajo tomadas al azar, de manera representativa.

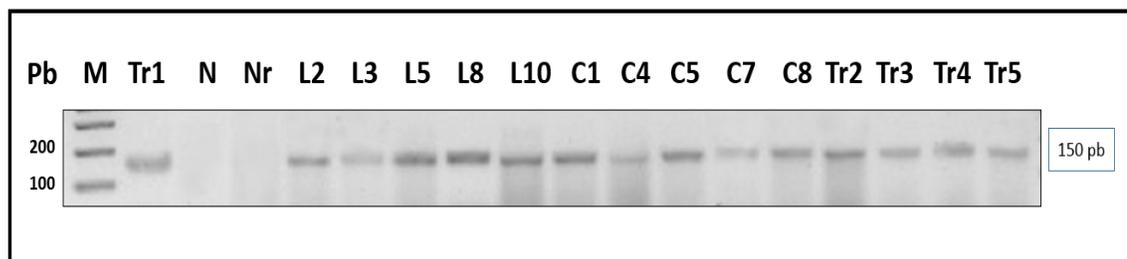


Figura 11. RT-PCR del gen constitutivo, factor de elongación α . M: marcador de peso molecular GeneRuler 100pb DNA Ladder (invitrogen); Tr1: Trucha 1; N: Control negativo de reacción; Nr; ARN de tejido de ratón; L2, L3, L5, L8, L10: ARN de muestras de laboratorio; C1, C4, C5, C7, C8: ARN de muestras de campo, Tr1-Tr5: ARN de controles negativos.

6.5. Establecimiento de la RT-qPCR

El ensayo de RT-qPCR se realizó utilizando el plásmido pUCVP2/VNPI como control positivo, elaborado por el CENID-MA perteneciente al INIFAP y dos lotes del transcrito *in vitro* como plantilla. En la figura 12, se muestra la amplificación del gen VP2 clonado en el plásmido y por los dos transcritos *in vitro*.

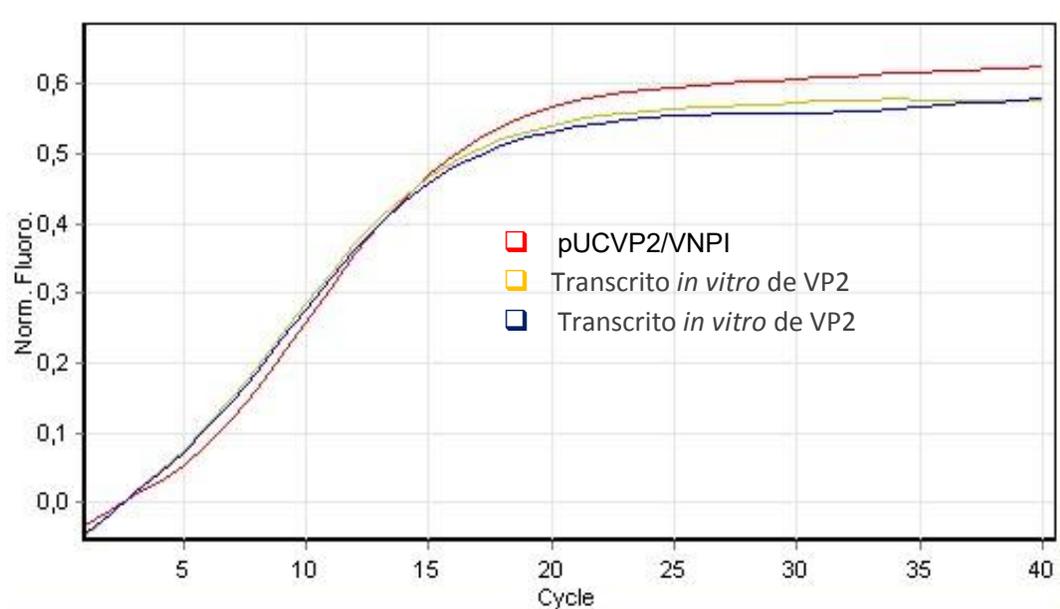


Figura 12. RT-qPCR del transcrito *in vitro* del gen VP2 del VNPI. En color rojo se observa la amplificación del pUCVP2/VNPI, en amarillo y azul la amplificación de dos transcritos *in vitro* de VP2/VNPI.

6.6. Curva estándar

La RT-qPCR establecida en este estudio detectó un fragmento del gen VP2 del VNPI a partir de una concentración de 1000 ng/ μ l, con una eficiencia de 1.09, la ecuación de la curva obtenida se muestra en la figura 13. Con esta ecuación se determinó que el límite de detección es de 1×10^7 μ g/ μ l de ARN viral lo cual corresponde a 8.91×10^5 copias de virus/mg de tejido según la ecuación que se muestra abajo tomada de <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>:

$$\text{Número de copias (moléculas)} = \frac{X \text{ ng} * 6.0221 * 10^{23} \text{ moléculas/mole}}{N * 660 \text{ g/mol} * (1 * 10^9 \text{ ng/g})}$$

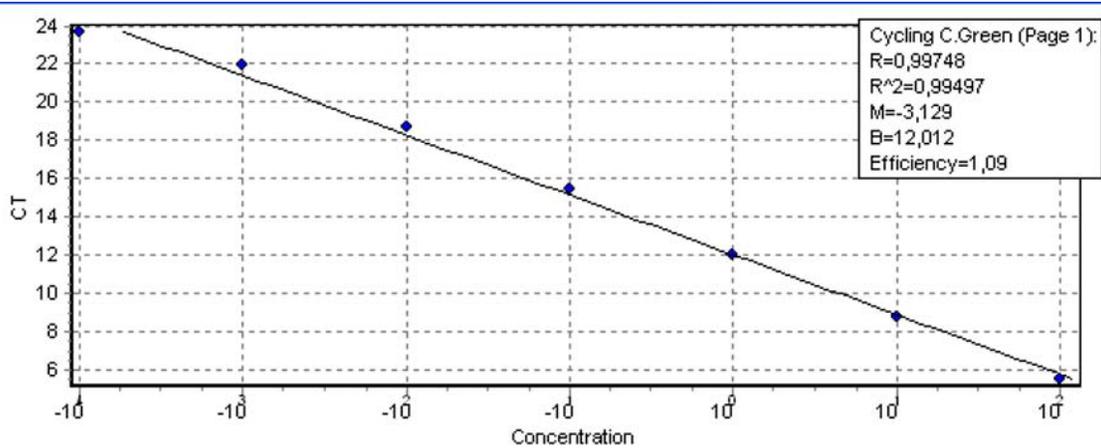


Figura 13. Curva estandar del RT-qPCR del gen VP2 de VNPI.

6.7. RT-PCR en tiempo real de muestras biológicas

Las muestras de laboratorio y de campo utilizadas en la RT-qPCR establecida, mostró que todas las muestras de trucha tanto las experimentalmente inoculadas, como las de campo fueron positivas (confirmando los ensayos de aislamiento viral) y se determinó el número de copias por cada muestra, los resultados de este cálculo se muestran en la tabla 4. El número de copias fue calculado utilizando la ecuación de la pendiente de la curva. Por otra parte, también se evaluaron los aislamientos en cultivo celular, los resultados fueron positivos tanto para muestras de campo como de laboratorio. Finalmente, es de resaltar que el ensayo mostró ser específico, ya que todas las muestras utilizadas como control negativo no mostraron amplificación.

Tabla 4. Resultado de las técnicas utilizadas para la identificación del gen VP2 del VNPI.

	ID	Aislamiento	RT-PCR	PCRn	RT-qPCR (#copias)
L A B O R A T O R I O	1	+	-	+	4.66x10 ⁷
	2	+	-	+	2.59x10 ⁸
	3	+	-	+	3.39x10 ⁷
	4	+	-	+	1.08x10 ⁸
	5	+	-	+	3.38x10 ⁸
	6	+	+	+	3.21x10 ⁸
	7	+	+	+	4.69x10 ⁷
	8	+	+	+	2.01x10 ⁷
	9	+	+	+	5.94x10 ⁷
	10	+	+	+	1.64x10 ⁷
C A M P O	1	+	-	+	3.71x10 ⁷
	2	+	-	+	2.45 x10 ⁷
	3	+	-	+	2.58 x10 ⁷
	4	+	-	+	3.65 x10 ⁷
	5	+	-	+	2.16 x10 ⁷
	6	+	-	+	7.33 x10 ⁶
	7	+	-	+	1.43 x10 ⁷
	8	+	-	+	1.00 x10 ⁸
	9	+	-	+	3.18 x10 ⁷
	10	+	-	+	2.03 x10 ⁷
N E G A T I V O S	1	-	-	-	N/A
	2	-	-	-	N/A
	3	-	-	-	N/A
	4	-	-	-	N/A
	5	-	-	-	N/A

(-)=Negativo; (+) = Positivo; N/A: No aplica

Con la finalidad de comparar y validar los resultados de la técnica de RT-qPCR se realizó una RT-PCR anidada y el aislamiento en cultivo celular en todas las muestras. Los resultados obtenidos de las tres técnicas realizadas, concuerdan; sin embargo, el tiempo de elaboración cambia, demostrando que la RT-qPCR es la técnica más rápida en detectar al virus (Tabla 5).

Tabla 5. Comparación de los tiempos de realización de las técnicas de detección para el VNPI

Técnica de detección	Tiempo de realización
RT-PCR en tiempo real	4 horas
RT-PCR anidada	10 horas
Aislamiento en cultivo celular	± 21 días

6.8. Análisis estadístico

Con estos resultados se realizaron los cálculos necesarios para determinar el porcentaje de concordancia, mediante el coeficiente de Kappa de Cohen de las técnicas de detección analizadas, como es el caso de RT-qPCR y el aislamiento en cultivo celular.

Tabla 6. Concordancia de los resultados obtenidos por RT-qPCR y aislamiento en cultivo celular, de acuerdo a la prueba de Kappa de Cohen.

RT-qPCR	Aislamiento	
	Positivo	Negativo
Positivo	20	0
Negativo	0	5

Ambas técnicas concuerdan con los resultados positivos y negativos, así que la concordancia entre la RT-qPCR y el aislamiento en cultivo celular es del 100%. Lo que se traduce en este estudio como el 100% de sensibilidad y especificidad para la técnica de RT-qPCR para la detección de gen VP2 del VNPI en comparación con la prueba estándar de aislamiento en cultivo celular utilizando la cepa testigo positivo MNX-CSM-05.

7. Discusión

Los avances en las técnicas de biología molecular han permitido una mayor sensibilidad y especificidad para la detección de virus de peces. Diferentes procedimientos de RT-PCR y RT-qPCR, se aplican para detectar fragmentos del genoma viral específicos y determinar sus niveles de expresión. Dichas técnicas se realizan con muestras que provienen de diferentes fuentes como: agua, tejidos y cultivos celulares infectados, demostrando así que la RT-qPCR es una técnica altamente sensible para la detección viral, así como una prueba que permite tener resultados en menor tiempo en comparación con otras técnicas de biología molecular como la PCR convencional o anidada, técnicas serológicas y técnicas de cultivo celular. (Hirayama T., *et. al.*, 2005; Calleja *et. al.*, 2012).

En este estudio se desarrolló y validó un ensayo de RT-qPCR para la detección de un fragmento del gen VP2 del VNPI cepa MNX-CSM-05, en riñón, bazo, hígado y sacos pilóricos de truchas arcoíris. Para ello se diseñaron oligonucleótidos y una sonda a partir de una secuencia consenso de aislamientos del VNPI, reportadas en el GenBank con número de acceso AF343573, AF342728, JX1741178, M18049 y los resultados fueron comparados con los obtenidos con la prueba

estándar de oro para el diagnóstico del VNPI, la cual es el aislamiento viral en cultivo celular, siguiendo los lineamientos expuestos por la OIE.

Para la técnica de RT-qPCR uno de los factores importantes para dar certeza a los resultados obtenidos es conocer el límite de detección. Este fue evaluado con una curva estándar calculada, usando diluciones decuples seriadas de ARNm obtenido en el laboratorio de Biotecnología en salud animal mediante transcripción *in vitro* del gen VP2 del VNPI, esta técnica permitió obtener ARNm concentrado específico del gen VP2. Es importante tomar en cuenta, que los kits de transcripción *in vitro* no trabajan con oligonucleótidos específicos de un gen, es muy probable que pueda llegar a contaminarse debido a que la enzima se dedica a “leer y transcribir a ARN” de cualquier cadena de ADN, por lo que es recomendable trabajar en una cabina de bioseguridad. Una vez terminado el procedimiento es necesario tratar nuestro producto con ADNasas para eliminar la cadena molde. Para el presente estudio el límite de detección obtenido fue de hasta 1 fg de ARNm del transcrito *in vitro*, comparado con otros reportes donde el límite de detección es de 100 a 250 fg (Hiramaya T, *et al.*, 2005; Tapia *et al.*, 2010; Ørpetveit *et al.*, 2010).

Como parte del proceso de validación de la técnica de RT-qPCR, se confirmaron los resultados obtenidos con la RT-PCRa y el aislamiento viral en cultivo celular. Por otra parte, se notifica que la RT-qPCR disminuye el riesgo de contaminación por el manejo reducido del material genético, además al ser una prueba cuantitativa que demuestra la cantidad de partículas virales contenidas en cada muestra (Mauren K., *et al.*, 2014).

El método recomendado para la detección y/o diagnóstico del VNPI, es el aislamiento en cultivo celular, seguido de la identificación del agente por Inmunofluorescencia (OIE, 2006). Estas pruebas son de suma importancia ya que

determinan la presencia de partículas virales viables con capacidad de generar una infección y daño tisular evidente.

Cabe mencionar que el aislamiento viral en cultivo celular requiere de laboratorios especializados, materiales altamente costosos y de un periodo de tiempo de aproximadamente 21 días para su realización; lo que incrementa el costo de la técnica, y no siempre, se obtienen resultados oportunos por el tiempo en que se lleva a cabo dicha técnica. Además se han realizado diversos estudios donde se observa que no siempre detecta a virus subclínicos o peces latentemente infectados (en particular adultos portadores asintomáticos o peces recién infectados), ya que los bajos niveles de virus no siempre permiten la detección por este método (Tapia *et al.*, 2105; Ørpetveit *et al.*, 2010). Sin embargo en la RT-qPCR se detectan concentraciones muy bajas del virus, lo que demuestra una alta sensibilidad y además se ha demostrado que también es altamente específica, ya que si existe el genoma, lo puede detectar, y eso minimiza los posibles resultados falsos negativos (Joquera E., *et al*, 2016). Varios estudios se han realizado con esos resultados, donde continuamente los peces infectados pueden ser dados como negativos cuando son examinados por cultivo celular y positivos a la RT-qPCR (Tapia *et al.*, 2105; Ørpetveit *et al.*, 2010, Joquera E., *et al*, 2016).

En este estudio se realizó la detección de la presencia del VNPI en tejidos de riñón, bazo, hígado y sacos pilóricos de truchas arcoíris, clínicamente enfermas y de truchas clínicamente sanas. La repetibilidad y reproducibilidad de los resultados aquí descritos, se confirmaron con la realización de tres ensayos independientes.

Los resultados se evaluaron con el método estadístico de Kappa de Cohen, en el que nos indica, que tanto concuerdan los resultados entre una técnica de referencia y nuestra técnica de estudio. En este caso particular, al realizar el cálculo se obtuvo un acuerdo del 100% debido a que todos los resultados concuerdan.

8. Conclusión

En este estudio se demostró que el uso de la RT-qPCR, es una alternativa eficaz para detectar al genoma del VNPI en muestras tanto inoculadas experimentalmente, como en muestras de campo que además provenían de animales clínicamente sanos. El ensayo demostró ser sensible y específico en comparación con la prueba de referencia de la OIE que es el aislamiento viral en cultivo celular además de tener la misma capacidad de detección que una PCR anidada, con las ventajas de ser más rápida y cuantitativa

El ensayo establecido aquí, puede ser una alternativa para la vigilancia activa del virus en explotaciones trutícolas en organismos de cualquier edad, aunque la infección sea inaparente.

9. Lista de abreviaturas

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

CN: Control negativo

CP: Control positivo

Ct: Ciclo umbral

DEPC: dietil-pirocarbonato

INIFAP: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias

ORF: Marco de lectura abierto

Pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PCRa: Reacción en cadena de la polimerasa anidada

Pi: Post-infección

PP: Proteína precursora

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

RT: Transcripción reversa

RT-qPCR: Transcripción reversa y Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

VP2: Proteína viral 2

VNPI: Virus de la necrosis pancreática infecciosa

10. Bibliografía consultada

1. Barrera MM, Martinez S., Ortega C., Ulloa AR. Genotyping of infectious pancreatic necrosis virus isolates from Mexico State. *Journal Aquatic Animal Health*. 2011; 23: 200-206.
2. Bebak J, McAllister PE. Continuous exposure to infectious pancreatic necrosis virus during early life stages of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Fish Dis*. 2009; 32:173-81.
3. Bustin. Real-Time PCR. *Encyclopedia of diagnostic genomics and proteomics*. Marcel Dekker. New York. 2005; 1117-1125 pp.
4. Calleja F, Godoy MG, Cárcamo JG, Bandin I, Yañez AJ, Dopazo CP, y col. Use of reverse transcription-real time polymerase chain reaction (real time RT-PCR) assays with universal probe library (UPL) probes for the detection and genotyping of infectious pancreatic necrosis virus strain isolated in Chile. *Journal of virological methods*. 2012;183:80-85.
5. Crane M., Hyatt A. *Viruses of fish: An Overview of significant pathogens*. Viruses. 2011; ISSN 1999-4915
6. Cutrin JM, Oliveira JG, Barja JL, Dopazo CP. Diversity of infectious pancreatic necrosis virus strains isolated from fish, shellfish, and other reservoirs in Northwestern Spain. *Appl. Environ. Microbiol*. 2000;66:839-843.

7. Dobos P. The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Ann. Rev. Fish. Dis.* 1995; 5:25-54
8. Dorak M.T. editor. *Real Time PCR (Bios Advanced Methods)*. Taylor & Francis, New York, 2007
9. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura; Oportunidades y desafíos*. 2014. Roma. 3-22 pp.
10. Fernández-Carriel, MB; Estudio epidemiológico del virus de la necrosis pancreática infecciosa en salmones. Tipificación molecular de los distintos serotipos existentes en Chile. (Tesis de licenciatura) Valdivia, (Chile). Universidad Austral de Chile, 2005. p....
11. Fleige, S., Pfaffl M.W., RNA integrity and the effect on the Real Time RT-PCR performance. *Molecular aspects of medicine*. 2006; 27: 126-139.
12. Guerrero L, Herrera E, Salinas J, Torres J, Montero AB, Barrón B. Detection and genotyping of an infectious pancreatic necrosis virus from asymptomatic rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) facilities in México. *Intervirology*. 2008; 51:285-292.
13. Hirayama T, Imajoh M y Oshim S-I. Quantification of aquabirnavirus isolated from different host species by Real-Time RT-PCR. *Microbio. Immunol.* 2005; 49: 361-371.

14. Instituto Nacional de Pesca (INAPESCA). Tecnología del INAPESCA, garantiza reproducción de trucha. Publicado: 18 de Septiembre de 2010. Consultado: Noviembre de 2015. Disponible en URL. <http://www.inapesca.gob.mx/portal/sala-de-prensa/comunicados/89-tecnologia-del-inapesca-garantiza-reproduccion-de-trucha>
15. Joquera E., Morales P., Tapia D., Torres P., Eissler Y., Espinoza J.C., Conejeros P., Kuznar J.. Chilean IPNV isolates: Robustness analysis of PCR detection. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2016; 20:28-32.
16. López-Lastra M, González M, Jashes M y Sandino AM. A detection method for infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) based on reverse transcription (RT) polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Fish Disease*. 1994; 17: 269-282.
17. Maclachlan N J, y Dubovi E J. Fenner`s Veterinary Virology. Fourth Edition, Academic Press, United Kingdom. 2011; 102-122 y 293-198
18. Martínez-Alonso S, Vakharia VN, Saint-Jean SR, Pérez-Prieto S, Tafalla C. Immune responses elicited in rainbow trout through the administration of infectious pancreatic necrosis virus-like particles. *Developmental and comparative immunology*. 2012; 36: 378-384.
19. Maureen KP, Rodman GG, Carol AM, Kyle AG. Quantitative Polymerase Chain Reaction for Detection of Aquatic Animal Pathogens in a Diagnostic Laboratory Setting. *Journal of Aquatic Animal Health*. 2011. 23:3, 148-161.

20. OIE, Organización Mundial de la Sanidad Animal. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. 2014 (7th Edition).
21. OIE (2006): Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos.
http://web.oie.int/esp/normes/fmanual/pdf_es/2.1.08_Necrosis_pancreatica_infecciosa.pdf.
22. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Departamento de pesca y acuicultura. The State of World Fisheries and Aquaculture 2014, opportunities and challenges. FAO, 2014. Rome; pp 21-25.
23. Ortega SC, Montes de Oca R, Groman D, Yason C, Nicholson B, Blaks S. Case report: viral infectious pancreatic necrosis in farmed rainbow trout from Mexico. Journal of Aquatic Animal Health. 2002; 14: 305-310.
24. Ørpetveit I, Mikalsel AB, Sindre H, Evensen Ø, Dannevig BH, Midtlyng PJ. Detection of IPNV in subclinically infected Atlantic Salmon by virus isolation in cell culture or real-time reverse transcription polymerase chain reaction: influence of sample preservation and storage. J. Vet. Diagn. Invest. 2010; 22: 886-895.
25. Ortega C., Enríquez R. Factores asociados a la infección celular por el virus de la necrosis pancreática infecciosa. Revista Medicina Veterinaria. 2007; 39: No.1.

26. Pfaffl Michael W. Quantification Strategies in Real-time Polymerase Chain Reaction. Appl. Microbiol. Chapter 3. 2012.
27. Rodríguez S-JS, Borrego JJ, Pérez DS. Infectious pancreatic necrosis virus: Biology Pathogenesis and Diagnostic methods. Adv Virus Res 2003; 63: 113-165.
28. Salgado-Miranda Celene. Virulencia de virus de la necrosis pancreática infecciosa en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) a partir de aislamientos mexicanos. Tesis doctoral en ciencias de la producción y salud animal, UNAM-FMVZ, 2015.
29. Salgado-Miranda C, Corona-Barrera E, Marín GRA, Palomares SME, Jurado CM, Ortega SC, Soriano-Vargas E. Prevalence and distribution of infectious pancreatic necrosis virus in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* from commercial farms in Mexico. Book of Abstracts World Aquaculture 2009. 25-29 September 2009. Veracruz, Veracruz.
30. Salgado-Miranda C., Rojas-Anaya E. Garcia-Espinoza G. Loza-Rubio E. Molecular characterization of the VP2 gene of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) isolates from Mexico. Journal Aquatic Animal Health. 2014; 26:1, 43-51.
31. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación. Acuerdo mediante el cual se aprueba la actualización de la Carta Nacional Acuícola. SAGARPA Junio, 2012: 70-73.
32. SAGARPA. (2011): 2011. Secretaría de

33. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca. Anuario estadístico de acuacultura y pesca. SAGARPA-CONAPESCA, 2014. México; 70-73.

34. Tapia D, Eissler Y, Torres P, Jorquera E, Espinoza JC, Kuznar J. Detection and phylogenetic análisis of infectious pancreatic necrosis virus in Chile. Dis. Aquat. Org.; 2015; 116: 173-184

35. Torres-Rojo, MC; Sánchez-Ramírez, BE; Infante-Ramírez, R; González-Horta MC; Erosa-Vega, G. Necrosis Pancreática Infecciosa. Su importancia y perspectiva hacia la vacunación. Universidad Autónoma de Chihuahua. Aventuras del pensamiento. 2008; 42:1-7pp