

T
1124

AXIA XOCOMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

123923

123923



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

Genotipificación del Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa
(IPNV) que afecta a la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en la
zona central de México

TESIS

(Idónea Comunicación de Resultados)

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA

BIOL. HORTENCIA HERNÁNDEZ RUIZ

COMITÉ TUTORAL

M. EN C. MARTHA RODRÍGUEZ GUTIÉRREZ

DR. JAIME A. BUSTOS MARTÍNEZ

DR. EDUARDO LÓPEZ ORDUÑA

MÉXICO, D.F.

FEBRERO 2011

*A mi madre por su incondicional apoyo y amor infinito y a la memoria de mi
padre por su ejemplo y eterno amor.*

*Te fuiste de mi lado.
En silencio fue tu partida.
Mi corazón se ha desangrado
por tan súbita despedida.*

*Tu espíritu luchador
a la vida se aferraba.
Más Dios, desesperado,
a su lado te llamaba.*

*En ángel te has convertido.
Velando por nosotros estás.
Aguardando que se cumpla la cita
de reunirnos en la eternidad.*

*Sin embargo, me parece tan lejos...
Quisiera ahora poderte abrazar.
Te busco, te llamo. No te encuentro.
Dime... ¿Cómo me he de consolar?*

*Tu amor incalculable
mis faltas por alto pasó.
Porque el querer de un padre,
ese, no tiene comparación.*

*Sé que en el cielo habitas.
Al lado de Dios has de estar.
Aguardaré paciente el día
en que nos volvamos a encontrar.*

*Entonces será para siempre.
Nada ni nadie nos podrá separar.
No temeré cuando llegue mi momento
pues tu presencia me confortará.*

*Me esforzaré por ganar el cielo
para no perderte nunca más.
Mientras tanto, guía mis pasos.
Ilumina mi senda, enséñame el camino*

*Que tu presencia y tu amor me rodee siempre
hasta que se cumpla mi destino*

Agradecimientos

Agradezco a Dios por brindarme el maravilloso don de la vida, y a esta por demostrarme que cuando una puerta se ha cerrado otra más grande me espera abierta al final del camino.

Agradezco a mis padres porque desde el principio de mi existencia ya se preocupaban por mí. Gracias porque detrás de mis éxitos y derrotas siempre estuvieron con los brazos abiertos para consolarme, porque dedicaron su vida a cuidarme, pero sobre todo por darme su infinito amor.

Agradezco a mi papi todos los valores y principios que me enseñó porque gracias a eso soy un mejor ser humano y aunque él ya no está conmigo su ejemplo y cariño siempre estarán en mi corazón y mi pensamiento y sus enseñanzas jamás quedarán en el olvido.

A mis hermanos Jazmin y Raúl porque me acompañan siempre en cada proceso de mi vida, por su apoyo y por su cariño. A mi cuñadita Yolotzin, por su amistad y cariño. A Julia por compartir conmigo los buenos, malos y peores momentos, por su apoyo y confianza.

A Karina mi otra hermana que si bien nos une un lazo de sangre si nos une un enorme cariño, por su incondicional apoyo, por estar dispuesta a escucharme y tener siempre una palabra oportuna para aconsejarme por esto y muchas cosas más, gracias.

Agradezco a unos seres maravillosos: Jaime y Aida por ser para mí, mis otros padres, porque siempre se han preocupado por mi bienestar no sólo académico si no también personal, mostrando su apoyo cuando lo he necesitado pero sobre todo porque me brindan su cariño.

A un hombre maravilloso y único, por ser mi amigo, mi confidente y mi corazón; porque con su ejemplo me ha enseñado que todo se puede realizar cuando en verdad se desea y por compartir conmigo su conocimiento.

A las personas que ejercen la profesión de enseñar: Mis profesores, ya que a lo largo de este sendero han aportado un granito de conocimiento y sabiduría para mi formación. En especial agradezco a mi Comité integrado por la M. Martha Rodríguez, Dr. Jaime Bustos y Dr. Eduardo López, por compartir sus conocimientos y experiencia, por dedicarme tiempo, tiempo para demostrar preocupación por mí, tiempo para escuchar mis problemas y ayudarme a darles solución y sobre todo tiempo para sonreír y mostrarme su afecto y cariño.

Agradezco a Martha Rodríguez por abrirme las puertas de su laboratorio, por contribuir a mi crecimiento académico, por regalarme la oportunidad de compartir juntas muchas travesías, por ser parte de mi familia, además de ser mi amiga y confidente.

Al Posgrado en Ciencias Agropecuarias, en particular al Coordinador el Dr. Luis Arturo García por todo el apoyo que me brindó en la elaboración de esta tesis y por todo el afecto que siempre mostró hacia mi persona.

A mis grandes amigos: Jacqueline, Oswaldo, Faby, Minerva, Adriana y Joaquín por compartir conmigo los éxitos y fracasos, los agradables momentos vividos, pero sobre todo por su afecto y cariño.

A mis amigos Margarita, Denise, Víctor y Araceli por ser compañeros de grandes travesías y aventuras en el laboratorio de Reproducción Genética y Sanidad Acuicola y por colaborar en algún momento en este trabajo y por estar siempre conmigo animándome.

A Conacyt, por el apoyo económico otorgado y a la Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco por hacer uso de sus instalaciones y por contribuir para mi formación profesional.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. MARCO DE REFERENCIA	4
II.1. Pesca	4
II. 2. Acuicultura	5
II.3. Estado actual de la acuicultura en México	6
II.4. Aspectos generales de la trucha arco iris	7
II. 4. 1. Origen	7
II. 4. 2. Taxonomía	8
II. 4. 3. Descripción	9
II. 4. 4. Biología de la especie	10
II. 5. Sanidad Acuicola	14
II. 6. Normatividad Internacional	15
II. 7. Normatividad Nacional	15
II. 7.1. Normas Oficiales Mexicanas	16
II. 8. Enfermedades certificables y notificables	16
II. 9. Necrosis Pancreática Infecciosa	17
II. 10. <i>Bimavirus</i>	17
II. 11. Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa	18
II. 12. Factores de virulencia del IPNV	18
II. 13. Métodos de Detección para el Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV)	19
II. 13. 1. Identificación indirecta del virus	19
II. 13. 2. Identificación directa del virus	20
III. ANTECEDENTES	24
IV. PROBLEMÁTICA A RESOLVER	26

V.	FACTORES QUE INTERVIENEN EN EL PROBLEMA DE ESTUDIO	26
VI.	UBICACIÓN DEL PROBLEMA	26
VII.	IMPACTO	27
VIII.	PREGUNTAS BIOLÓGICAS	27
IX.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
X.	JUSTIFICACIÓN	27
XI.	OBJETIVOS	27
XII.	HIPÓTESIS	28
XIII.	METODOLOGÍA	29
XIII. 1.	Caracterización molecular de IPNV	29
XIII .2.	Distribución de granjas de trucha arco iris de la zona central de México positivas a IPNV	29
XIII. 3.	Definición de posibles cepas de IPNV presentes en México	29
XIII. 4.	Comparación de las secuencias de las cepas de IPNV con el software Clustal W	30
XIII. 5.	Detección del IPNV con primers universales utilizando la Técnica de RT-PCR en dos pasos y en un paso	30
XIII.5.1.	Muestreo	30
XIII.5.2.	Obtención de la Muestra	31
XIII.5.3.	Procesamiento de la Muestra	32
XIII.6.	Diseño de oligonucleótidos específicos para Genogrupo I y II	33
XIII.7.	Detección de los genotipos de IPNV	34
XIII.7.1.	Detección de IPNV con oligonucleótidos para Genogrupo I	34
XIII.7.2.	Detección de IPNV con oligonucleótidos para Genogrupo II	34
XIII. 8.	Purificación de productos de PCR	35
XIII. 9.	Secuenciación	35
XIII. 10.	Análisis de la relación que existe entre el genogrupo y el origen geográfico de los organismos	35
XIV.	RESULTADOS	36

XIV. 1.	Caracterización molecular de IPNV	36
XIV.2.	Distribución de las granjas de trucha arco iris de la zona central de México positivas a IPNV	38
XIV. 3.	Definición de las posibles cepas de IPNV presentes en México	40
XIV. 4.	Comparación de las secuencias de las diferentes cepas de IPNV	48
XIV. 5.	Detección del IPNV con primers universales utilizando la técnica de RT-PCR en dos pasos y en un paso	54
XIV.5.1.	Detección del IPNV en muestras procedentes de granjas trutícolas de los Estados de Hidalgo y Puebla	57
XIV. 6.	Diseño de Oligonucleótidos para los Genogrupos I y II	58
XIV.7.	Detección de los genotipos de IPNV	63
XIV.7.1.	Detección del IPNV con oligonucleótidos para Genogrupo I	63
XIV. 7. 2.	Detección del IPNV con oligonucleótidos para Genogrupo II	65
XIV.8.	Purificación de amplificadores	67
XIV.9.	Secuenciación	67
XIV. 10.	Relación que existe entre el genogrupo y el origen geográfico de los organismos	67
XV.	DISCUSIÓN	70
XVI.	CONCLUSIONES	73
XVII.	RECOMENDACIONES	74
XVIII.	LITERATURA CITADA	75

RESUMEN

Se realizó un estudio para la detección y genotipificación del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV).

Se realizó una consulta en el Sistema de Información del Programa Nacional de Sanidad Acuicola (PRONALSA), lo cual permitió detectar las principales importaciones que se han realizado a México en el período 2001-2005. El resultado de esta consulta determinó que se han realizado importaciones principalmente de Estados Unidos y Dinamarca. Con la información antes mencionada se identificaron los posibles genotipos que existen en México, determinándose el genogrupo I y al genogrupo II como supuestos genotipos existentes en la zona central de México, ya que un elemento importante en este estudio era determinar si existía una relación entre el genotipo y el origen geográfico de los organismos.

Para la detección del IPNV se muestrearon 22 granjas trutícolas del Estado de Hidalgo y 39 granjas del Estado de Puebla, de cada una de ellas se analizaron dos muestras. La detección del virus se realizó mediante la técnica de RT-PCR en uno y dos pasos, el virus fue detectado en 19 muestras de las granjas del Estado de Hidalgo y 35 muestras de granjas de Puebla.

A partir del genoma del virus se diseñaron oligonucleótidos específicos que identificarán al genogrupo I y II. Una vez detectado el IPNV en algunas de las granjas trutícolas, se seleccionaron muestras para detectar los dos genogrupos. La detección del IPNV para genogrupo I y II se realizó mediante la técnica de RT-PCR en dos pasos.

Se encontró que 4 muestras de las granjas del Estado de Hidalgo y 3 muestras del Estado de Puebla amplificaron para el genogrupo I y para el genogrupo II solo una muestra de cada Estado.

En lo que se refiere a la relación que existe entre el genotipo y el origen geográfico de los organismos, se encontró que si existe una relación entre el genotipo y el origen geográfico de los organismos, ya que de las muestras analizadas, algunas estaban conformadas por organismos que procedían de importaciones en las cuales se detectó el IPNV y posteriormente al realizar la genotipificación el resultado correspondió al genotipo presente en el país del que procedían.

ABSTRACT

A study was conducted for the detection and genotyping of the virus infectious pancreatic necrosis (IPNV).

First of all was consulted a database with Information of System of the National Aquaculture Health (PRONALSA), which allowed identifying the main imports were made to Mexico in 2001-2005. The result of this consultation determined that imports have taken mainly in the U.S. and Denmark. With the above information identified possible genotypes of virus that exist in Mexico, determining the genogroup I and genogroup II genotypes as assumptions that exist in the central area of Mexico as an important element in this study was to determine whether there was a relationship between genotype and geographical origin of organisms.

For detection of IPNV were sampled 22 trout farms in the Hidalgo State and 39 in the Puebla State, of each one were analyzed two samples. The virus detection was performed using the RT-PCR in one or two steps; the virus was detected in 19 samples from the farms of Hidalgo and 35 samples from farms in Puebla.

From the genome of the virus-specific oligonucleotides that identify the genogroup I and II. Once was detected IPNV in some of the trout farms was selected samples for the two genogroups. Detection of IPNV for genogroup I and II was performed by the RT-PCR in two steps.

It was found that 4 samples from the farms of the State of Hidalgo and 3 samples of the State of Puebla amplified for genogroup I and genogroup II for just a sample of each state.

Respect to the relationship between genotype and geographic origin of the fish was found that there is relationship between these because some of the samples tested were imports from countries in which IPNV was detected and then to perform the genotyping results corresponded to genotype present in the country from which they came.

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) se inició en México a finales del siglo XIX, cuando se introdujo huevo oculado procedente de Norteamérica; desde entonces la truiticultura ha tenido un notable desarrollo en algunas regiones del país, caracterizadas por el incremento en el número de granjas, uso de nuevas tecnologías y aumento de la producción (Enríquez *et al.*, 2000). La truiticultura es una actividad productiva importante en nuestro país, porque es rentable y en cuanto a la producción de organismos acuáticos fue una de las primeras que se desarrolló (Rodríguez, 2000).

Al igual que otras actividades pecuarias, la truiticultura no ha estado exenta de enfrentarse a distintos tipos de enfermedad entre éstas, las virales que son de difícil control y erradicación y los organismos portadores están restringidos tanto en el comercio nacional como internacional, tal es el caso del Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV), que produce una enfermedad sistémica contagiosa y aguda que ataca principalmente a alevines y crías, razón por la que en la norma oficial mexicana NOM-10-PESC-1993, está considerada como enfermedad certificable (Ortega, 2000; NOM-010-SEPES-1993).

Este agente etiológico pertenece al género *Aquabimavirus* y a la familia *Birnaviridae* (Murphy *et al.*, 1995); el virus está formado por dos segmentos de RNA, el largo y el corto, denominados A y B, respectivamente. El segmento A codifica tres proteínas, una poliproteína precursora que se escinde para proporcionar la proteína de la cápside: la proteína VP2 que es una proteína no estructural NS, y la proteína estructural más interna VP3 que se caracteriza por su gran variabilidad antigénica y genotípica. El segmento B codifica para una polimerasa de RNA conocida como VP1 (Hill, 1982; Brown, 1986).

La virulencia, definida como la habilidad del agente patógeno para causar enfermedad, es una manifestación de la interacción entre los procesos de los componentes del virus y los mecanismos de defensa desarrollados por las células del huésped para tratar de eliminar la infección; sin embargo, el resultado de tal interacción siempre es determinado por el virus a través de sus factores de virulencia (Lyles, 2000). La virulencia para el caso del IPNV refiere al grado de daño—mortalidad provocado por el patógeno y evoluciona con base en los mecanismos de variación genética y selección natural, pero se acepta que esta evolución viene dirigida fundamentalmente por la interacción con el huésped y la producción de la enfermedad (Read, 1994, Dobos, 1995).

Al respecto en México, se desconoce el grado de virulencia y el genotipo que presenta este virus, lo cual ha permitido plantear diversas interrogantes, por ejemplo; ¿Por qué algunos organismos son resistentes al virus? ¿Por qué la presencia de IPNV en México no ha causado mortalidades devastadoras? ¿Cuál de los nueve serotipos afecta con mayor intensidad a la trucha arco iris?, para ello en este trabajo se plantea aclarar la identidad genética del serotipo de IPNV en la zona central de México.

II. MARCO DE REFERENCIA

II.1. Pesca

El 80 por ciento de la pesca marina a nivel mundial se encuentra plenamente explotada, sobreexplotada y agotada, y las repercusiones del cambio climático están afectando la estabilidad de los recursos pesqueros según el último informe de Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) sobre el Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura 2008, donde se señala que el 19 % de las poblaciones de peces marinos sujetos a la pesca están sobreexplotadas, el 8 % agotadas, el 1 % en recuperación, el 2 % infraexplotados, el 18 % moderadamente explotados y el 52% plenamente explotados (FAO, 2008).

Por otra parte, también señala que la mayor parte de las poblaciones de las diez especies más pescadas y que en términos de cantidad representan 30 % de la captura marina mundial, se hallan plenamente explotadas o sobreexplotadas y, por ello, no existen aumentos en sus capturas (FAO, 2008).

Además, se menciona que el cambio climático está modificando la distribución de las especies marinas y de agua dulce. En general, las especies de aguas más cálidas están siendo desplazadas hacia los polos y están experimentando cambios en el tamaño de su hábitat y en su productividad (FAO, 2008).

El cambio climático está afectando ya a la estacionalidad de determinados procesos biológicos, modificando con ello las redes tróficas marinas y de agua dulce, con consecuencias imprevisibles en la producción de la pesca y la acuicultura. Es también motivo de preocupación el aumento del riesgo de invasión por parte de otras especies y la difusión de enfermedades transmitidas a través de vectores (FAO, 2008).

Las diferencias de calentamiento entre la tierra y los océanos y entre las regiones polares y las tropicales afectarán a la intensidad, frecuencia y estacionalidad de los patrones climáticos, así como a los fenómenos meteorológicos extremos y, por tanto, a la estabilidad de los recursos marinos y de agua dulce adaptados a ellos o que sufren su influencia (FAO, 2008).

De acuerdo a la FAO, (2008), durante las tres últimas décadas, el número de pescadores y acuicultores ha crecido más rápidamente que la población mundial y el empleo en el sector pesquero ha aumentado con mayor rapidez que el de la agricultura tradicional, lo cual ha incrementado la presión pesquera en algunos recursos, lo cual ha originado el colapso de muchas pesquerías.

Ante el colapso de las pesquerías se ha planteado a la acuicultura como la solución, sin embargo, esta actividad que ha crecido a pasos agigantados, sigue dependiendo de la pesca para la producción de alimentos a partir de harina de pescado (FAO, 2008).

En México el 70 % de las pesquerías se encuentran catalogadas como explotadas al máximo o en deterioro. En el Golfo de México pesquerías como la de tiburón, cazón, sierra, robalo, guachinango tienen una tendencia descendente desde la década de los noventa (FAO, 2008).

II. 2. Acuicultura

La Acuicultura se define como el conjunto de actividades que tienen por objetivo la producción, crecimiento, conservación y comercialización de organismos acuáticos, animales o vegetales de aguas dulces, salobres o saladas (CONAPESCA, 2006).

El origen de las actividades relacionadas con la acuicultura data desde los tiempos de Aristóteles, quien menciona el cultivo de ostras en Grecia, mientras que Plinio da detalles del mismo en Roma. En el caso de México, los orígenes de la acuicultura se remontan a la época prehispánica; sin embargo, prácticamente es hasta finales de 1884 cuando Esteban Cházari publica el primer tratado de piscicultura donde se apuntan las bases para iniciar su desarrollo (Ceballos y Velásquez, 1988).

De esta manera, al término del siglo XX la acuicultura se constituye a nivel mundial en un mecanismo alterno para la producción de alimentos tanto en aguas continentales, como en aguas marinas, con el cultivo de diversas especies de importancia no solo alimentaria y comercial, incluso de aquellas especies en riesgo o en peligro de extinción que son recuperadas mediante técnicas de cultivo (Álvarez, 2000).

En América Latina la acuicultura ha iniciado un desarrollo significativo en los últimos años y numerosos países empiezan a destacar en la materia, debido a la demanda de alimentos con buena calidad de proteína y de bajo costo (Ceballos y Velásquez, 1988).

Por otro lado, la FAO señala que "la acuicultura crece con mayor rapidez que todos los demás sectores de producción de alimentos de origen animal, tomando en cuenta que desde el año de 1984 la producción acuícola ha aumentado a una tasa media anual de casi el 10%, en comparación con el 3% correspondiente a la carne de bovino y el 1.6% de la pesca" (FAO, 2004).

Derivado de lo anterior, la acuicultura constituye una contribución importante, no sólo para la producción y comercialización; sino también para la conservación de muchas especies del mundo, debido a que la pesca, consistente en la recolección de organismos acuáticos a partir de las existencias silvestres, está llegando a sus límites máximos por la sobreexplotación, la degradación del ambiente y la contaminación de las aguas (Hepher y Prugini, 1991).

La truiticultura ha representado en el ámbito de la producción dulceacuícola una actividad en crecimiento continuo en México, por otro lado, la trucha arco iris en la actualidad es considerada como una especie resistente, fácil de cultivar, con rápido crecimiento y un alto índice de fecundidad; además tiene carne de excelente calidad y es codiciada en la pesca deportiva (Rodríguez y Cortés, 2003).

En términos generales, se puede decir que la acuicultura, y en particular la truiticultura adquiere especial atención y requiere de un impulso decidido y dirigido que permita que su desarrollo y crecimiento se realice en forma equilibrada con el entorno ambiental, socioeconómico y cultural (Álvarez, 2000).

II.3. Estado actual de la acuicultura en México

En las últimas décadas, ante deterioro de las pesquerías a nivel mundial y el excesivo esfuerzo pesquero concentrado en algunas pocas especies, la acuicultura se ha ido convirtiendo de manera paulatina en una alternativa de producción, considerándose al mismo tiempo como un sector prioritario y estratégico para el suministro de alimentos, el abasto de insumos a la agroindustria, la generación de recursos, empleos e ingresos, principalmente para los países en desarrollo, además aporta la tercera parte de la producción pesquera mundial y es uno de los sectores de más rápido crecimiento desde finales de la década de 1980 (Guerra, 2005).

A partir de ésta década las capturas han tendido a estancarse en todo el mundo, de acuerdo con la FAO el 47% de los bancos marinos del planeta están ya sobre explotados, es decir, están llegando casi a su límite máximo sostenible. Se prevé que la extracción decaerá entre 2015 y 2030, al tiempo que continuará creciendo la producción derivada de la acuicultura. Por otra parte, cerca del 25% de los recursos están explotados en forma insuficiente o moderada y esa es la única porción que puede ser fuente de expansión de las capturas (Guerra, 2005).

En el período 1996-2001, la actividad extractiva alcanzó en el mundo volúmenes cercanos a los 92 millones de toneladas, con una contracción importante en 1998 ocasionada por la sobreexplotación y los fenómenos climatológicos. En consecuencia, esto ocasiono un impulso a la acuicultura, entre 1997 y 2001 y creció a una tasa promedio de 7% al año. Esto obedeció en parte al aumento de la demanda de alimentos, derivada del hecho que la población mundial creció en ese período a una tasa anual de 1.2% (Guerra, 2005).

De esta forma, peces y mariscos están constituyendo una fuente vital de alimento para la población, particularmente en regiones donde las provisiones de carne son limitadas. De acuerdo con Avilés y Vázquez, (2006) "los mariscos aportan menos del 10% de la proteína consumida en Norteamérica y Europa, pero representan 17% en África y 26% en Asia. Mil millones de personas dependen de peces y mariscos como su principal fuente de proteína.

El consumo de mariscos ha crecido de 40 millones de toneladas en 1970 a 86 millones en 1998, y se espera que alcance 110 millones de toneladas en 2010, siendo el incremento en la población mundial el principal responsable de esta demanda. De este volumen, 40 millones de toneladas provendrán de la acuicultura (Avilés y Vázquez, 2006).

Por lo antes señalado la acuicultura se ha convertido en un factor importante para mejorar y elevar los estándares nutricionales, aliviar la pobreza y la economía de los países en desarrollo (Avilés y Vázquez, 2006).

En México, la pesca y la acuicultura han sido actividades promovidas principalmente por el Estado, su desarrollo también ha estado determinado por diversos factores de carácter político, económico y social (Guerra, 2005).

En la actualidad, México es reconocido como un país con gran potencial de desarrollo acuícola debido al clima, recursos naturales y especies nativas con potencial de cultivo. De acuerdo con el Atlas Pesquero de México y la Carta Nacional Pesquera 2000, el país cuenta con 11,500 kilómetros de litoral, tres millones de kilómetros cuadrados de Zona Económica Exclusiva, más 2.9 millones de hectáreas de aguas interiores, 358 000 Km²

de plataforma continental y un potencial máximo de captura de dos millones de toneladas anuales (Guarneros y Pérez, 2006).

La acuicultura en México se ha desarrollado en todas las regiones del país, usando prácticas diversas, extensivas con sistemas abiertos y cerrados, así como intensivas y semi intensivas, en jaulas, encierros, líneas suspendidas, estanques artesanales de tierra, canales de corriente rápida, estanques de concreto, cubiertas plásticas y otras tecnologías disponibles para criar especies acuáticas para el autoconsumo o comercio de productos.

Esta actividad se basa particularmente en el cultivo de siete especies introducidas: carpas chinas, tilapia, bagre, trucha, langostinos, ostras japonesas, mejillones y cinco especies nativas: camarón blanco del Pacífico, ostra americana, abulón, almejas y langostinos (SEMARNAT, 2005).

Como en otras partes del mundo, la acuicultura incluye actividades de repoblación en ambientes naturales y artificiales de crías y juveniles de peces producidos en centros piscícolas. La acuicultura extensiva de México se ha desarrollado exitosamente con impactos positivos sobre la captura pesquera en aguas continentales, donde los embalses son compartidos con acuicultores que utilizan jaulas y encierros para la engorda de tilapias, bagres y otras especies de valor comercial (SEMARNAT, 2005).

Los recursos que pueden ser aprovechados mediante esta actividad económica en el país incluyen 64 especies: 26 especies de peces dulceacuícolas (9 nativas, 14 introducidas y 3 híbridas), 5 especies de peces marinos nativos, 14 de moluscos marinos y salobres (12 nativas y 2 introducidas), 6 de crustáceos dulceacuícolas (4 nativos y 2 introducidos), 7 de crustáceos marinos nativos y 6 especies de anfibios (5 nativas y una introducida) (DOF, 2004).

II.4. Aspectos generales de la trucha arco iris

II. 4. 1. Origen

Esta especie es originaria de América del Norte, con una distribución natural que va desde Alaska, Canadá y Estados Unidos, hasta los fríos y montañosos ríos de México. En México de manera natural la trucha arco iris y por lo menos dos de sus variedades se distribuyen en la Sierra Norte de Chihuahua, Durango, Baja California, Sonora y Sinaloa, a su vez, desde finales del siglo XIX, han sido introducidos lotes de estas especies con el propósito de cultivo en las regiones montañosas y frías de los Estados de México, Morelos, Michoacán, Hidalgo, Puebla, Querétaro, Tlaxcala, Guerrero, Guanajuato, Distrito Federal, Jalisco, Veracruz, Tamaulipas, Nuevo León y Coahuila (Arredondo y Lozano, 2003).

En México, el cultivo de crías de trucha arco iris se inició a finales del siglo XIX, fecha en la que se reporta su primera introducción proveniente de Estados Unidos (Sosa *et al.*, 2000).

En 1883 oficialmente inició esta actividad con la construcción del vivero nacional de Chimalteapan en Ocoyoacac, Lerma, Estado de México, cuando se adquirieron 500, 000 huevos de trucha procedentes de Estados Unidos de Norteamérica. En el año de 1893 se

tiene información de que se produjeron crías en este vivero y fueron liberadas en algunos lagos y ríos (Medina *et al.*, 1976).

En 1937, la estación piscícola de Almoloya del Río, fue la segunda que operó en México; recibió 300, 000 huevos procedentes de Estados Unidos de Norteamérica (Arredondo y Lozano, 2003).

Sin embargo, es en 1943, con la inauguración del Centro Piscícola El Zarco, Edo. Méx., cuando se inició el desarrollo sostenido del cultivo de esta especie (Álvarez *et al.*, 1961; citado por Arredondo y Lozano, 2003).

A partir de 1976 la acuicultura recibió un fuerte impulso y se inicia el establecimiento de cultivos comerciales de producción semi-intensiva. En 1987, la Secretaría de Pesca contaba ya con 6 centros acuícolas dedicados a la producción de huevos y crías de trucha y la iniciativa privada contaba con nueve entidades federativas con 143 unidades de producción en sistemas de cultivo intensivo, localizándose principalmente en el Estado de México (Juárez, 1987).

En el ámbito de la producción dulceacuícola la trucha ha representado una actividad en crecimiento continuo en México, está sustentada por aproximadamente 1, 398 Unidades de Producción de las cuales 961 (68.7%) pertenecen a la acuicultura comercial y 437 (31.3%) a la acuicultura de autoconsumo o familiar (Rodríguez *et al.*, 2003).

II. 4. 2. Taxonomía

Existe evidencia paleontológica determinante, de que las especies de salmónidos aparecieron al concluir el Plioceno, extendiéndose ampliamente hasta el Pleistoceno. Sus ancestros probablemente correspondieron a peces cupleiformes (Nikolsky, 1971 citado por Rodríguez, 2003).

La mayor parte de los especialistas como Berg, 1948; Vladimirov, 1948; Neave, 1958; Vladykov, 1963, concuerdan que los salmónidos se originaron en agua dulce, aunque algunos otros han propuesto un origen marino (Smith, 1895; Zenkevich, 1933). Los estudios sobre evolución y origen de los salmónidos son numerosos, y muchos de ellos proporcionan esquemas de relaciones filogenéticas entre los géneros, los cuales están basados en morfología comparativa y datos de genética molecular. Los resultados de estos estudios mostraron que los géneros *Salmo* y *Oncorhynchus* son los géneros más avanzados evolutivamente.

En América, la fauna marina anádroma, incluyendo los salmónidos, se extendieron durante el Pleistoceno, desde el Norte del Pacífico Norteamericano hasta el sur de la meseta Central en México (Latitud 21° N) (Miller y Smith, 1986). Los fósiles de salmónidos mexicanos están fragmentados, por lo que sólo han sido referidas dos especies en los géneros modernos *Oncorhynchus* (Cavender, 1986; Cavender y Miller, 1982) y el extinto *Rhabdofario* (Smith, 1980; Smith, 1981).

En 1988, la *American Fisheries Society's Committee on Names of Fishes*, aceptó *Oncorhynchus* como nombre genérico más apropiado para designar a las truchas nativas de la cuenca del Pacífico, después de sustentar que los *Salmo*, truchas nativas en las vertientes del Pacífico Norte, se encuentran genéricamente más cercanas con el salmón del Pacífico *Oncorhynchus* que con las especie *Salmo* del Atlántico y Europa. Tal

evidencia pone de manifiesto que *Rhabdofario* (truchas fósiles), *Parasalmo* (propuesto para reemplazar *Salmo* al referirse a la cuenca del Pacífico Norte) y *Oncorhynchus* no son distintas a nivel de género. De estos nombres *Oncorhynchus* tiene prioridad histórica taxonómica para este grupo de peces (Smith y Stearley, 1988; Gall, 1990).

Paralelamente se aclaró que la trucha arco iris y la trucha "kamchatkan" *Salmo mykiss* de Asia, constituyen una única especie y que el nombre *mykiss* tiene prioridad en la nomenclatura. Por esta razón el *Names of Fishes Committee* adoptó *Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792, como nombre científico de esta especie, sustituyendo al anterior *Salmo gairdneri*, Richardson 1836 (Smith y Stearley, 1988; Gall, 1990).

Las especies de América del Norte afectadas por estos cambios son las siguientes: trucha apache, *Oncorhynchus gilae apache*; Cutthroat o trucha garganta cortada, *Oncorhynchus clarkii*; trucha Gila, *Oncorhynchus gilae gilae*, Golden Trout o trucha agua bonita, *Oncorhynchus aguabonita*, Trucha dorada mexicana, *Oncorhynchus chrysogaster* y trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* (Rodríguez y Cortés, 2003).

Por lo anterior, de acuerdo con la clasificación propuesta por Nelson, (1984) la trucha arco iris pertenece a:

Reino: Animal
Subreino: Metazoos
Phylum: Chordata
Subphylum: Vertebrata
Superclase: Gnathostomata
Clase: Osteichthyes
Subclase: Actinopterygii
Orden: Salmoniformes
Suborden: Salmonoidei
Familia: Salmonidae
Subfamilia: Salmoninae
Género: *Oncorhynchus*
Especie: *mykiss*

II. 4. 3. Descripción

La trucha arco iris tiene el cuerpo alargado, ligeramente comprimido; la cabeza representa del 15 al 20% de la longitud corporal; cuenta con una aleta caudal pigmentada con puntos oscuros; las aletas pélvicas en posición abdominal y una segunda dorsal modificada como adiposa situada equidistante a la anal y a la dorsal, y alineada aproximadamente con la anal; presenta coloración verdosa oscura con puntos negros en el dorso y se desvanece a la altura de los costados, hasta ser blanca amarillenta en toda la zona ventral. Es en los costados donde presenta la coloración que le da el nombre de "arco iris", franjas de células iridiscuentes situadas por debajo de las escamas que producen las tonalidades rosa, naranja y violeta, las cuales resultan más evidentes en la época de reproducción (Córdoba, 1994).

II. 4. 4. Biología de la especie

II. 4. 4. 1. Hábitat

La trucha arco iris en su ambiente natural, es un pez que habita espacios acuáticos con aguas puras y cristalinas, con cauces que presentan marcados desniveles topográficos que originan rápidos, saltos y cascadas que son muy comunes en los ríos de alta montaña, son estos rápidos con una pronunciada velocidad de corriente y suelo pedregoso los más frecuentados por las truchas. De manera que las truchas son peces nativos de regiones elevadas y montañosas donde existen aguas frías, claras y bien oxigenadas (Blanco, 1995).

II.4.4.2. Alimentación

La trucha es un pez carnívoro que en la naturaleza se alimenta de las presas que captura vivas, siendo la mayoría de ellas organismos acuáticos y algunos terrestres, como son los insectos que en primavera y verano revolotean sobre el agua. Los moluscos como los caracoles también son presas habituales, así como los crustáceos (cangrejos, etc.), gusanos, renacuajos y peces pequeños de la misma u otras especies (Blanco, 1995).

II.4.4.3. Reproducción

Los machos de la trucha arco iris siempre son de mayor tamaño y durante la etapa de reproducción suelen desarrollar dimorfismo sexual, la trucha tiene un ciclo reproductor anual, siendo una condición indispensable que el macho y la hembra sean adultos y sexualmente maduros. Los machos pueden adquirir la madurez sexual a los 15 o 18 meses, mientras que en las hembras es un poco más tardado, ya que necesitan un mínimo de dos años.

Durante el proceso de maduración sexual, las truchas van sufriendo una serie de cambios morfológicos en su aspecto, los cuales hacen que uno pueda distinguir fácilmente los machos de las hembras, dos de los cambios mas notorios sucede en el macho, uno de ellos es en el maxilar inferior debido a que este sufre un proceso de prolongación, así como una ligera curvatura dorsal del cuerpo.

La reproducción de las truchas al igual que la de los demás salmónidos es sexual y externa, esto quiere decir que la hembra como el macho, depositan libremente en el agua los gametos (espermatozoides y óvulos). En los ríos o arroyos, los óvulos procedentes de las hembras son depositados en el fondo en un nicho o nido previamente preparado por la hembra, donde inmediatamente después el macho deposita el esperma, dando lugar con esto a la fecundación. Al proceso natural de emisión de los productos sexuales al exterior comúnmente se le da el nombre de desove.

Es importante mencionar que la reproducción de los salmónidos es cíclica, esto significa que tiene lugar una vez al año y en una época determinada. Blanco (1995), menciona que el desove en la trucha arco iris se da en el periodo comprendido entre los meses de noviembre a febrero, pero que este fenómeno esta condicionado por la influencia de las condiciones climáticas ambientales.

En el ciclo de vida de la trucha arco iris se describen generalmente cinco etapas que son:

- ❖ Huevo: Una vez que se ha llevado la fertilización de los huevos, estos son incubados en el nido construido por la hembra; la velocidad de desarrollo de los

huevo depende en gran medida de la temperatura del agua, la óptima se sitúa entre los 8 y 12 °C. A una temperatura de 10 °C la eclosión del alevín será a los 31 días, mientras que a 15.6 °C la eclosión será a los 19 días.

- ❖ Alevín: Al concluir el desarrollo embrionario, el alevín eclosiona y se alimenta de las reservas nutricionales contenidas en el saco vitelino durante dos o cuatro semanas dependiendo de la temperatura. Una vez que estas reservas han sido agotadas y el saco vitelino ha sido absorbido, el alevín se transforma en cría y asciende a la superficie; esta fase dura entre 14 y 20 días.
- ❖ Cría: En esta fase empiezan a nadar más libremente y procurarse el alimento por sí mismos. Conforme crecen y sobreviven, las crías continúan su desarrollo, cuyo ritmo depende de una serie de factores, tales como la duración del día, la temperatura y la abundancia de alimento.
- ❖ Juvenil: En esta etapa los organismos tienen todas las características de los adultos, es decir, ya tienen hábitos propios de la especie, como ser activos y nadar contra la corriente, atrapar sus presas para alimentarse, haciéndolo con pequeños peces de otras especies, ranas, etc. Se diferencian de los adultos en que aún no han madurado sexualmente.
- ❖ Adulto: Dependiendo de las condiciones físicas del hábitat, una buena parte de las truchas de una determinada población maduran entre los 15 y 18 meses de edad, sin embargo, la mayoría alcanza su madurez dos meses después. Cuando ocurre la maduración, los peces cambian de coloración, de tal manera que adquiere las características típicas de la trucha adulta.

II. 4. 4. 4. Condiciones para el cultivo de la trucha arco iris

La biología de la especie ha permitido reproducir lo que ocurre en el medio natural bajo condiciones de cultivo, en que hay varios factores que inciden en su desarrollo entre los que se pueden citar:

II. 4. 4. 4. 1. Alimentación

En los sistemas de cultivo el punto fundamental para obtener una buena rentabilidad es la utilización del alimento adecuado que cubra los requerimientos nutricionales de la trucha, el uso y manejo inadecuado del alimento repercute en el rendimiento esperado, en la degradación del agua y en posibles enfermedades (Bonilla, 1998; citado por Arredondo y Lozano, 2003).

Es importante supervisar el Factor de Conversión de Alimento (FCA), el cual debe variar entre 1.0 y 2.0 para que sea rentable económicamente. Si este factor es mayor de 2 la práctica de alimentación debe ser ajustada o bien puede obedecer a un problema de enfermedad o estrés (Bonilla, 1998; citado por Arredondo y Lozano, 2003).

II. 4. 4. 4. 2. Parámetros ambientales para el cultivo de la trucha arco iris

El éxito del cultivo de la trucha depende de la calidad del agua, debido a que los salmónidos en general son muy susceptibles a las condiciones adversas del medio, por lo

tanto las características físicas y químicas deben satisfacer las demandas de esta especie; debido a sus exigencias la trucha arco iris puede ser considerada como indicador de la calidad del agua (Wedemeyer y Wood, 1974).

De acuerdo con Wedemeyer y Word (1974), los parámetros de calidad del agua permisibles para el cultivo de la trucha arco iris se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros de calidad del agua permisibles para el cultivo de la trucha arco iris

Parámetros	Nivel aceptable
Temperatura (°C)	13 a 15
Temperatura para crecimiento (°C)	7.2 a 17.6
Temperatura para reproducción e incubación (°C)	7.2 a 12.8
Oxígeno disuelto (mg/l)	> 5
pH	6.7 a 9.0
Alcalinidad (mg/l como CaCO ₃)	20 a 200
Dióxido de carbono (mg/l)	< 2
Calcio (mg/l)	> 52
Zinc (mg/l)	< 0.04 a un pH de 7.6
Cobre (mg/l)	< 0.006 en agua blanda < 0.3 en agua dura
Hierro (mg/l)	< 1.0
Amoníaco (NH ₃) (mg/l)	< 0.012
Nitrito (NO ₂) (mg/l)	< 0.55
Nitrato (NO ₃) (mg/l)	< 1.0
Nitrógeno total	< 110% de saturación total
Sólidos suspendidos (mg/l)	< 80
Sólidos disueltos (mg/l)	< 500
Sulfuro de hidrógeno (mg/l)	< 0.002

II. 4. 4. 3. Tecnologías de cultivo

Existen diversas tecnologías para el cultivo de la trucha arco iris, que van desde las técnicas extensivas hasta el cultivo intensivo que se practica principalmente en estanques, jaulas y en canales de corriente rápida.

❖ Cultivo extensivo

La trucha arco iris se cultiva de manera extensiva en embalses de diferentes dimensiones, inclusive en cuerpos de agua temporales en donde se ha demostrado que es posible realizar el cultivo sin muchos problemas y con costos de producción bajos. Algunas granjas han construido represas donde liberan organismos adultos para realizar la pesca deportiva, lo que permite un mayor atractivo y con ello obtener un valor agregado en la producción (Cabrera y García, 1982; citado por Arredondo y Lozano, 2003).

El rendimiento en este sistema, generalmente es incierto, ya que depende de la cantidad de crías o adultos que son sembrados en los cuerpos de agua (Cabrera y García, 1982; citado por Arredondo y Lozano, 2003).

❖ Cultivo semi-intensivo

Este tipo de cultivo es realizado principalmente por el sector social y en específico por pequeños productores. El éxito depende del suministro constante de crías y de alimento balanceado. Para este cultivo se utilizan pequeñas presas u otros cuerpos de agua, estanques rústicos o encierros en ríos, arroyos o canales de riego (Arredondo y Lozano, 2003).

Generalmente, se utilizan diversos cuerpos de agua pequeños tales como presas, bordos o jagüeyes, en donde se tiene un control del mismo. El rendimiento es superior al sistema extensivo y puede alcanzar hasta más de 500 kg por hectárea (Arredondo y Lozano, 2003).

❖ Cultivo intensivo

La mayoría de las granjas utilizan diversos dispositivos en sus instalaciones en función a la fase de cultivo de que se trate.

Hay cuatro modalidades de cultivo intensivo:

a) En estanques de concreto semi-rústicos, fibra de vidrio o de metal

El cultivo de la trucha en estanques es el más popular en nuestro país y también el más viejo. La ventaja de estos estanques es que son baratos y fáciles de construir (Anónimo, 1988; citado por Arredondo y Lozano, 2003).

En términos de rendimiento expresado como kilogramos por metro cúbico, depende de la capacidad de carga del estanque, que a su vez está relacionado con algunos factores de la calidad del agua, como el contenido de oxígeno disuelto, temperatura, flujo de agua y volumen. La capacidad de carga es un término que se utiliza para expresar los kilogramos de trucha por metro cúbico de espacio aprovechable o flujo de agua (Arredondo y Lozano, 2003).

b) En canales de corriente rápida

Los canales de corriente rápida varían en sus dimensiones y generalmente son contruidos con cemento armado. Para su construcción se requiere un abasto suficiente de agua para que funcione adecuadamente sobre todo cuando se pretende incrementar la capacidad de carga (Arredondo y Lozano, 2003).

c) En jaulas

Algunos productores recomiendan el cultivo de trucha en jaulas, ya que no siempre es posible la construcción de estanques o canales de corriente rápida y esta tecnología representa una buena alternativa. Algunas ventajas que pueden ser consideradas en la aplicación de esta tecnología, es que son sistemas de cultivo más baratos; el crecimiento y estado de salud de los peces es más fácil de supervisar; la cosecha es sencilla y se elimina el costo de la construcción de estanques y canales de corriente rápida, ya que se aprovechan los cuerpos de agua que presentan características limnológicas apropiadas (Arredondo y Lozano, 2003).

Desde el punto de vista económico se ha demostrado que el cultivo intensivo de salmónidos en jaulas es más rentable que otros sistemas (Arredondo y Lozano, 2003).

Las formas más comunes de colocar las jaulas son: fijas, flotantes, sumergidas y subsumergidas (Beveridge, 1984).

Las jaulas deben ser seleccionadas de acuerdo con los siguientes criterios:

1. La especie y etapa del desarrollo que se va a cultivar
2. Condiciones limnológicas prevalentes en el medio ambiente
3. Intensidad del cultivo
4. Tenencia de la tierra
5. Costos disponibles de materiales
6. Experiencia del personal en el manejo de peces

La trucha arco iris puede ser fácilmente cultivada en jaulas cuyas dimensiones pueden ser de 3 x 3 m hasta 12 x 6 x 2 m. Generalmente se introducen juveniles de 10 a 15 cm de longitud total, cuando la temperatura del agua disminuye a 18° C y cosechando los peces cuando éstos alcanzan entre 23 y 25 cm (con peso de 300 a 400 g). Si las condiciones del agua son adecuadas y las jaulas son bien operadas durante todo el ciclo de cultivo es posible obtener una producción de 15 a 20 kg/m³ (Beveridge, 1984).

d) En sistemas cerrados de recirculación y reacondicionamiento de agua

Estos sistemas de producción ofrecen una buena alternativa, ya que utilizan menos del 10% del agua requerida por los estanques para obtener rendimientos similares. Esta tecnología se puede utilizar cuando no se dispone de grandes cantidades de agua, pero para mantener las condiciones de calidad de agua que requiere la trucha, está tiene que ser tratada para eliminar los metabolitos tóxicos como el amonio (NH₃) y el nitrito (NO₂), los sólidos disueltos y en suspensión y el dióxido de carbono (CO₂), además, de mantener el oxígeno disuelto en niveles cercanos a la saturación (Losordo *et al.*, 1992).

II. 5. Sanidad Acuicola

El desarrollo de tecnología y la cría de peces en condiciones intensivas genera factores de estrés ligados a las condiciones de la producción, es decir, altas densidades y mala calidad de agua favorecen el desarrollo de enfermedades que pueden ser de tipo ambiental, toxicológico e infeccioso, considerando a las últimas como uno de los problemas más severos que afectan a la truiticultura, lo cual trae como consecuencia en ocasiones la pérdida total de la población y con ello disminución de los recursos económicos que se generan de esta actividad (Reno, 1998).

Por lo anterior surge la sanidad acuicola que atiende todas aquellas enfermedades de origen infeccioso como son las ocasionadas por virus, bacterias, hongos, parásitos, etc. y enfermedades no infecciosas como las de tipo genético, nutricional o funcional. El objetivo primordial es mantener la salud de los peces para obtener el óptimo desarrollo y reproducción en el tiempo mínimo recomendable, lo cual es importante para alcanzar la tasa de crecimiento señalada para cada especie (Rodríguez *et al.*, 2001).

Para lograr lo anterior es necesario disponer de métodos de diagnóstico que permitan la detección oportuna de microorganismos patógenos y con ello la aplicación de medidas de control o prevención según sea el caso, desarrollando así una acuicultura sana donde se

mantengan condiciones adecuadas de la calidad del agua, una alimentación que reúna los requerimientos nutritivos de los organismos en calidad y cantidad, densidades adecuadas a la especie en cultivo y medidas profilácticas al final de cada ciclo de producción (Rodríguez *et al.*, 2001).

II. 6. Normatividad Internacional

Para tener control sanitario, se formularon regulaciones que permitieran identificar, mantener y evitar la propagación de patógenos a nivel mundial.

Para llevar a cabo esto, se creó la Oficina Internacional de Epizootias (OIE), en el Acuerdo internacional firmado el 25 de Enero de 1924, quien a partir de mayo de 2003 se convirtió en la Organización Mundial de Sanidad Animal, conservando las siglas de OIE, que es una organización intergubernamental encargada de regular el comercio con relación la sanidad animal.

Este organismo creó el Código Sanitario para los Animales Acuáticos (Código Acuático) cuyo objetivo es garantizar la seguridad sanitaria del comercio internacional de animales acuáticos: anfibios, crustáceos, moluscos y peces y productos derivados de animales acuáticos gracias a una descripción detallada de las medidas sanitarias que las Autoridades Veterinarias de los países importadores y exportadores deben aplicar para evitar la transmisión de agentes patógenos a los animales o a las personas e impedir la instauración de barreras sanitarias injustificadas (Código Acuático, 2006).

En este Código entre otras cosas se clasifican las enfermedades de acuerdo al grado de virulencia, en su evolución ha realizado cambios importantes tanto en la clasificación como en la lista de estas, en el primer caso, se suprimieron los términos notificables y certificables, que se venían usando, dejando solo la categoría de enfermedades de declaración obligatoria (OIE, 2006).

En cuanto a las enfermedades en la Sesión General de 2006, del Comité Internacional de la OIE se aprobó suprimir de la lista de enfermedades de declaración obligatoria a la Necrosis Pancreática Infecciosa, imponiendo la obligación de que los Países Miembros la reporten cuando se registre por primera vez en su país; ya que actualmente es considerada como una enfermedad que no cumple con los criterios para figurar en la lista de declaración obligatoria de OIE, pero se conservaría el capítulo de esta enfermedad en el Código Acuático para ayudar a los Países miembros que aun no la tienen a establecer sus normas de Importación (OIE, 2007).

II. 7. Normatividad Nacional

En el contexto Nacional en cuanto a sanidad, la legislación que rige la acuicultura principalmente se basa en la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos de 1917 y en la Ley General de Pesca y Acuicultura Sustentable (LGPAS) (2007), donde en el título undécimo con relación a la sanidad, inocuidad y calidad, en el capítulo I de la sanidad de especies acuícolas se refiere a que se establecerán las medidas de diagnóstico, detección, erradicación, prevención y control para evitar la introducción y dispersión de enfermedades, determinar y clasificar las patologías de alto riesgo; así como para evaluar los daños, restaurar las áreas afectadas y establecer procesos de seguimiento.

En cumplimiento de lo anterior, el Gobierno Federal se apoya en las normas oficiales mexicanas, entre ellas las relacionadas con sanidad acuícola son:

II. 7.1. Normas Oficiales Mexicanas

A partir de 1993, mediante la instalación del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Pesca, se han elaborado las siguientes disposiciones jurídicas que permiten el desarrollo armónico de la acuicultura, de las cuales siguen vigentes las normas específicas cuya aplicación incluye disposiciones prohibitorias en caso de riesgo notorio para el ambiente, la salud humana y en general para la calidad de vida. Su potencialidad se logra cuando los productores encuentran el beneficio propio al aplicarlas en la realización de proyectos propios

Dentro de las normas que se relacionan con la sanidad acuícola y que aun se encuentran vigentes son las siguientes:

NOM-010-PESC-1993. Establece los requisitos sanitarios para la importación de organismos acuáticos vivos en cuales quiera de sus fases de desarrollo, destinados a la acuicultura u ornato, en el territorio nacional (DOF 16/06/94).

NOM-011-PESC-1993. Se desarrollo para regular la aplicación de cuarentenas, a efecto de prevenir la introducción y dispersión de enfermedades certificables y notificables, en la importación y/ o movilización de organismos acuáticos vivos en cualesquiera de sus fases de desarrollo, destinados a la acuicultura y ornato en los Estados Unidos Mexicanos (DOF 16/06/94).

De estas normas se establece la clasificación de las enfermedades de organismos acuáticos dividiéndolas en enfermedades certificables y notificables, debido a que estas fueron publicadas y entraron en funciones en 1994 y aun son aplicables a pesar de haber sido actualizadas como es el caso de OIE en que se han hecho cambios en cuanto a la clasificación de enfermedades y eliminación de algunas.

II. 8. Enfermedades certificables y notificables

Por lo antes expuesto, en México se continua empleando la clasificación de enfermedades en: certificables y notificables, en las Normas Oficiales Mexicanas 010 y 011, entre las primeras incluidas en el "Apéndice C". Normativo. "Enfermedades Certificables de las Especies de Organismos Acuáticos Vivos Destinados a la Acuicultura y Ornato" son aquellas que no tienen tratamiento actual conocido o que son de difícil control y causan altas mortalidades. Mientras que las enfermedades Notificables, están incluidas en el "Apéndice D". Normativo. "Enfermedades Notificables de las Especies de Organismos Acuáticos Vivos en Cualquiera de sus Fases de Desarrollo Destinados a la Acuicultura u Ornato en los Estados Unidos Mexicanos"(Norma Oficial Mexicana NOM-011-PESC-1993).son aquellas susceptibles de tratamiento y que no causan altas mortalidades,

Tanto a nivel internacional como nacional se pretende que no se difundan estas enfermedades, debido a las grandes pérdidas económicas que ocasionan. En nuestro país, El Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) es un órgano desconcentrado de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo

Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), orientado a realizar acciones de orden sanitario para proteger los recursos agrícolas, acuícolas, y pecuarios de plagas y enfermedades de importancia cuarentenaria y económica, así como regular y promover la aplicación y certificación de los sistemas de reducción de riesgos de contaminación de los alimentos y la calidad agroalimentaria de éstos, para facilitar el comercio nacional e internacional de bienes de origen vegetal y animal.

II. 9. Necrosis Pancreática Infecciosa

La necrosis pancreática infecciosa es una enfermedad sistémica aguda y contagiosa que afecta a varias especies de salmónidos jóvenes, es ocasionada por un *bimavirus*, y tiene un impacto considerable debido a la mortalidad de crías y alevines (Roberts y Pearson, 2005).

Esta enfermedad ha sido identificada en varios países como: Australia, Canadá, Chile, Dinamarca, Escocia, España, Finlandia, Francia, Inglaterra, Italia, Japón Noruega y Suiza entre otros (Salgado 2006).

Los organismos infectados con el IPNV generalmente muestran anorexia y nadan de forma irregular, cambian a un color oscuro, presentan exoftalmia y distensión abdominal, también se observan las branquias pálidas y hemorragias en la parte ventral, incluidas las aletas (Wolf, 1988).

En lo que se refiere a los daños internos que puede causar este virus, se han observado hemorragias petequiales en vísceras, en algunas ocasiones se puede encontrar líquido ascítico en la cavidad abdominal. En el estómago e intestino anterior se ha encontrado un moco lechoso cohesivo (Wolf, 1988).

Las principales lesiones encontradas en estudios histopatológicos incluyen focos de necrosis coagulativa en páncreas, riñón e intestino. En muchos casos, el tejido renal contiene focos pequeños con cambios degenerativos (Smail *et al.*, 1995).

La forma de transmisión de esta enfermedad se puede realizar a través de dos vías: horizontal y vertical. La transmisión horizontal es cuando los peces eliminan el virus por medio de la orina y heces y se da la dispersión del virus a otros organismos (Billi y Wolf, 1969). En peces reproductores, se ha demostrado que el IPNV se transmite de manera vertical mediante la adsorción viral a la superficie de los espermatozoides (Mulcahy y Pascho, 1984) o puede estar presente en el líquido folicular pero no en el interior de las ovas no fertilizadas (Wolf, 1988).

II. 10. *Bimavirus*

Los *Bimavirus* forman una familia de virus de RNA de doble cadena (dsRNA), son virus que infectan a diferentes especies de animales como vertebrados, moluscos, insectos, y rotíferos (Delmas *et al.*, 2004). Los viriones no envueltos son partículas icosaédricas de triangulación T = 13 con un diámetro de aproximadamente 700 Å (Bottcher *et al.*, 1997). Un *bimavirus* económicamente importante en la acuicultura es el IPNV que ataca principalmente a salmónidos (Delmas *et al.*, 2004).

El esquema de clasificación serológica propuesto por Hill y Way (1995) reconoce nueve serotipos diferentes del IPNV en el serogrupo A, el serotipo A1 contiene aislados de

Estados Unidos de Norteamérica, los serotipos A6- A9 se han encontrado principalmente en Canadá y los serotipos A2- A5 encontrados en países europeos. El serogrupo B incluye un solo serotipo, representado por el arquetipo TV-1 aislado en trucha café (*Salmo trutta*) y carpa común (*Cyprinus carpio*).

II. 11. Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa

El IPNV es el agente etiológico de la necrosis pancreática infecciosa, enfermedad de distribución mundial que provoca severas pérdidas económicas en varias especies de peces, principalmente en salmónidos jóvenes (Wolf 1988, OIE 2005).

El IPNV pertenece a la familia *Birnaviridae* del género *Aquabimaviridae*, (Dobos 1995a). Fue aislado por primera vez en 1957 de la trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*) en Norteamérica (Wolf 1988) y se considera un agente infeccioso de riesgo en el cultivo de salmónidos; pero también puede causar enfermedad en otras especies de peces (Wolf 1988, Reno 1999, OIE 2005).

Como ya señaló el genoma de este virus es de doble cadena de RNA (dsRNA), contenidos dentro de una cápside icosaédrica sin envoltura de 60 nm de diámetro. El segmento A presenta dos marcos de lectura abiertos (ORF open reading frame); que codifica para cuatro proteínas. El ORF mayor codifica una poliproteína (pp) precursora de 106-kDa, que es escindida por la proteasa viral (VP4) para generar las proteínas mayores de la cápside: pVP2, VP3 y la propia VP4 (Duncan *et al.*, 1987). Durante la maduración viral, la pVP2 de 62-kDa es escindida a VP2 (54 kDa) (Villanueva *et al.*, 2004, Song *et al.*, 2005). Vp2 es la principal proteína de la cápside viral a la cual se dirigen los anticuerpos neutralizantes específicos, y también actúa como la proteína de unión a las células (Granzow *et al.*, 1997). VP3 es una proteína interna de la cápside y participa en el ensamblaje de la partícula viral; su extremo C-terminal, se une al RNA viral formando la estructura central de la ribonucleoproteína (Maraver, *et al.*, 2003). El ORF menor del segmento A, precede al ORF mayor y lo solapa parcialmente en su extremo aminoterminal, codificando una proteína no estructural de 17 kDa, rica en arginina llamada VP5 (Santi *et al.*, 2005a).

El segmento B de IPNV codifica sólo una proteína de 94 kDa, conocida como VP1, que en el virión se encuentra en forma de polipéptido libre de ambos segmentos del RNA genómico (VPg) (Song *et al.*, 2005); actúa como RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp), con función de polimerasa para la transcripción o síntesis de mRNA y para la multiplicación, participando también en el ensamblaje de la partícula viral (Maraver *et al.*, 2003).

II. 12. Factores de virulencia del IPNV

Existen dos serogrupos de IPNV, el serogrupo A incluye 9 serotipos patógenos para peces; el serogrupo B comprende un solo serotipo, avirulento para peces. Las cepas del serogrupo A presentan variación en su nivel de virulencia; no obstante, la variación también se presenta entre cepas del mismo serotipo (Dobos, 1995a).

Las proteínas VP2 y VP5 codificadas por el segmento A, se consideran los principales factores de virulencia de IPNV. La primera es una proteína que raramente se O-glicosila en al menos tres sitios del tercio central de su región hipervariable. Las evidencias indican que la glicosilación se realiza libremente en el citoplasma y no en el retículo endoplásmico

o el complejo de Golgi (Espinoza *et al.*, 2000). A este respecto, la virulencia de las distintas cepas y su relación con la glicosilación no se ha definido (Park y Reno 2005).

La proteína VP5 es una proteína no estructural, su función en la actividad biológica del virus es poco concluyente. Esta proteína se detecta sólo en células infectadas, no es evidente en virus purificado, siendo frecuente la existencia de cepas de campo carentes del codón de inicio de la traducción. La ausencia de su expresión no influye para establecer el proceso de infección y la multiplicación viral tanto *in vitro* como *in vivo* (Santi *et al.*, 2005 a y b).

Una característica de esta proteína es su probable efecto antiapoptótico, limitando la expresión de proteínas virales estimuladoras de apoptosis, al posponer dicho proceso VP5 ejerce efecto positivo de sobrevivencia viral (Ortega y Enríquez, 2007).

Por otra parte, las mutaciones pueden considerarse parte de las habilidades de los virus de RNA para adaptarse al medio, e influyen en el reconocimiento de receptores, adhesión y los pasos de ingreso a la célula, el crecimiento viral y el tropismo. Las adaptaciones de virus sin envoltura generalmente ocurren en las proteínas externas de la cápside (VP2); estas alteraciones pueden modificar el tropismo y la patogenicidad dado que usualmente participan en la unión y reconocimiento de proteínas receptoras.

II. 13. Métodos de Detección para el Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV)

Una herramienta importante para el diagnóstico de las enfermedades en peces, es sin duda la historia clínica o anamnesis y el examen anatomopatológico, ya que pueden proporcionar indicios sobre la presencia de una infección vírica (Salgado, 2000).

La identificación del agente causal virológico se puede realizar utilizando técnicas diagnósticas indirectas y directas.

II. 13. 1. Identificación indirecta del virus

Existen técnicas serológicas con el uso de antígenos y anticuerpos como la inmunofluorescencia y el ELISA.

La detección del IPNV por inmunofluorescencia se puede realizar utilizando el kit comercial Ensayo de Inmunofluorescencia (IPNV-FluoroTest Indirecto) (BIOS Chile) en muestras de tejidos de peces así como en líneas celulares infectadas con el patógeno. Utiliza una mezcla de anticuerpos monoclonales que son específicos el tipo Sp como VR-299, al agregar este reactivo a preparaciones de tejidos que contienen el patógeno, los anticuerpos reaccionan con las proteínas VP2 y VP3 del virus, después de una etapa de lavado para remover el anticuerpo libre, la presencia del virus se detecta con un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con FITC y se observa en un microscopio de fluorescencia. La presencia de virus se visualiza como una intensa fluorescencia verde en el citoplasma de las células infectadas.

Para la detección de IPNV mediante la prueba de ELISA existen Kits comerciales como el producido en la República Checa por Test- Line.

II. 13. 2. Identificación directa del virus

Para la identificación directa del virus existen técnicas rápidas, sensibles y específicas. Estas técnicas pueden ser por medio de cultivos celulares o sin ellos, siendo el cultivo celular el estándar de oro.

Para realizar el aislamiento del virus, se debe cultivar el virus en líneas celulares específicas, siendo esta técnica la recomendada en el Manual de Diagnóstico de las Enfermedades de los Animales Acuáticos, editado por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (Salgado, 2000).

Para el caso de la propagación, cuantificación e identificación del IPNV se han utilizado las siguientes líneas celulares: *Chinook salmon embryo cells* (CHSE-214), Bluegill *Lepomis macrochirus* (BF-2), Steelhead trout *Salmo gairdneri* Richardson embryo (STE-137) y la Epithelioma Papillosum Cyprini (EPC) (Espinoza y Kuznar, 2002; Alonso *et al.*, 1999; Hedrick *et al.*, 1978 y Salgado, 2000).

Mediante los cultivos celulares se puede identificar el virus a través de su efecto citopático que producen para su posterior aislamiento y tipificación con métodos inmunológicos, serológicos o moleculares (Salgado, 2000).

Dentro de las técnicas sin cultivo de células, se tiene; observación directa por medio de microscopía electrónica (con sus variantes), inmunofluorescencia en cortes o improntas del tejido afectado, técnicas biológicas moleculares para la identificación de los ácidos nucleicos por medio de PCR y RT-PCR (Salgado, 2000).

II. 13. 2. 1. Detección del IPNV por RT-PCR

En las últimas décadas se han desarrollado diversas técnicas para la identificación de virus tanto de RNA como de DNA, a partir de la especificidad de las moléculas de los ácidos nucleicos por medio de técnicas de Biología Molecular, que cuentan con una gran sensibilidad, entre las que se encuentra el RT-PCR para la detección del IPNV (Rodríguez *et al.*, 2001).

Esta técnica requiere de varios pasos entre los que se encuentra:

Purificación de ácidos nucleicos

La extracción y purificación de ácidos nucleicos constituye la primera etapa de la mayoría de los estudios moleculares.

Los métodos de extracción permiten obtener ácidos nucleicos a partir de diversas fuentes de origen orgánico para después realizar análisis específicos de modificaciones genéticas mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La calidad y pureza de los ácidos nucleicos son dos de los elementos más importantes en este tipo de análisis (Hernández *et al.*, 1994). Dada la gran variedad de métodos de extracción y purificación de ácidos nucleicos, la elección de la técnica más adecuada suele efectuarse mediante:

- Tipo de ácido nucleico

- Tipo de organismo
- Material de inicio (tejido, sangre)
- Resultado deseado (Rendimiento, pureza)
- Uso posterior (PCR, RT-PCR, Clonación).

Para el caso del IPNV por estar constituido su genoma de RNA, la extracción del RNA se puede llevar a cabo utilizando métodos como el de Trizol, solución monobásica de fenol e isotiocianato de guanidina; propuesto por Chomczynsky y Sacchi en 1987.

Otros productos comerciales que permiten la extracción del RNA es el Kit QIAam Viral RNA de la marca QIAGEN que combina las propiedades de una membrana con Silica – gel a través del proceso de centrifugación (QIAamp® Viral RNA Mini Handbook, 2007).

Síntesis de cDNA ó RT-PCR

Reacción de la Cadena de Polimerasa en Transcripción Reversa (RT-PCR del inglés Reverse transcription polymerase chain reaction) es una variante de la PCR, técnica usada en biología molecular para generar una gran cantidad de copias de ADN, proceso llamado "amplificación". En el RT-PCR, sin embargo, una hebra de ARN es retrotranscrita en ADN complementario (ADNc) usando una enzima llamada transcriptasa reversa (Marone *et al.*, 2001).

La transcripción reversa, tanto utilizando RNA total como mRNA, es la etapa clave en una Transcriptasa Reversa de la Reacción en Cadena de la polimerasa (RT-PCR). Existen factores que influyen la eficiencia del proceso, como la acción de la enzima que va a llevar a cabo esta reacción, la presencia de estructuras secundarias en el RNA, etc (Marone *et al.*, 2001).

Las transcriptasas reversas virales, tales como las presentes en Moloney Murine Leucemia Virus (M-MLV) y la del Virus de la Mieloblastosis Aviar (AMV), son enzimas termolábiles, y no pueden llevar a cabo la transcripción reversa cuando existen estructuras secundarias en el RNA. En este caso, se suelen utilizar transcriptasas reversas termoestables, que pueden llevar a cabo la reacción a 55-70 °C, permitiendo la desnaturalización de las estructuras secundarias, y aumentando la eficiencia global de la reacción (Marone *et al.*, 2001).

Para la síntesis de cDNA del IPNV se ha utilizado la enzima de Moloney Murine Leucemia Virus (M-MLV) por alcanzar altas temperaturas incrementando así su especificidad (Invitrogen, 2003).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Esta técnica permite amplificar pequeñas cantidades de ADN en cientos de miles y millones de veces. El tramo destinado a reproducirse puede tener desde cincuenta hasta más de dos mil nucleótidos de longitud (Rodríguez y Barrera, 2004).

El método se basa en la realización de tres reacciones sucesivas llevadas a cabo a distintas temperaturas. Estas reacciones se repiten cíclicamente entre veinte y cuarenta veces en un periodo de 1 a 2 horas. La muestra se calienta, en el primer paso, hasta lograr la separación de las dos cadenas que constituyen el DNA, hecho que se conoce como "desnaturalización" (Rodríguez y Barrera, 2004).

En el segundo paso, la temperatura se reduce para permitir el "apareamiento" de las dos cadenas cortas de nucleótidos (oligonucleótidos) con cada una de las hebras separadas del DNA molde. Los oligonucleótidos son segmentos de DNA de cadena simple, sintetizados en el laboratorio y diseñados de manera tal que permiten definir los límites del tramo de DNA que se desea replicar. Para que se pueda producir el apareamiento, cada uno de estos oligonucleótidos, a los que se denomina "iniciadores" o *primers*, debe ser complementario del tramo al que tienen que unirse en las cadenas separadas del ADN molde (Rodríguez y Barrera, 2004).

En tercer lugar, una enzima DNA polimerasa (Taq- polimerasa) extiende los *primers* en el espacio comprendido entre ambos, sintetizando las secuencias complementarias de las hebras del DNA molde. Para ello, la DNA polimerasa usa desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) agregados a la mezcla de reacción. La temperatura a la que se realiza el tercer paso está condicionada por aquella a la cual "trabaja" la enzima. Al cabo del primer ciclo de tres reacciones (desnaturalización, apareamiento, extensión) el tramo de DNA elegido se ha duplicado y el doble de la cantidad original se encuentra disponible para ser nuevamente replicado en un segundo ciclo. El resultado de la aplicación de numerosos ciclos "en cadena" da lugar a la amplificación geométrica del segmento de ADN delimitado por los *primers* (Rodríguez y Barrera, 2004).

Para la amplificación de un segmento de 524 pb cuya secuencia codifica para la proteína VP2 del IPNV se realiza con los primers Forward 5'-GCCGACATCGTCAACTCCAC-3' y Revers 5' GACAGGATCATCTTGGCATA-3' propuestos por Lee *et al.*, 1994.

Una vez amplificado el segmento de interés, para confirmar que la secuencia del segmento corresponde al esperado es necesario realizar la secuenciación.

Secuenciación

Es una técnica que permite saber el orden o secuencia de los nucleótidos que conforman parte de la estructura de un gen.

A lo largo del tiempo se han desarrollado diferentes métodos para obtener la secuencia de nucleótidos del ADN, sin embargo, actualmente los métodos más utilizados son el de secuenciación automática y el método enzimático de terminación de cadena de Sanger también conocido por el método didesoxi (Hall, 2007).

El método automático utiliza fluorescencia y realiza cuatro mezclas de reacción, cada una con 1 nucleótido trifosfato (dTTP) marcado con un fluorocromo distinto. Este sistema permite automatizar el proceso de manera que es posible leer al mismo tiempo los DNAs de nueva síntesis producto de las cuatro mezclas de reacción (Hall, 2007).

El método enzimático se realiza en cuatro tubos diferentes, cuatro mezclas de reacción. Cada mezcla de reacción contiene los cuatro nucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dTTP y dGTP), ADN polimerasa I, un cebador marcado radiactivamente y un nucleótido dideoxi, por ejemplo ddATP, a una concentración baja. El nucleótido dideoxi utilizado (ddATP en este ejemplo) competirá con su homólogo (dATP) por incorporarse a la cadena de ADN que se está sintetizando, produciendo la terminación de la síntesis en el momento y lugar donde se incorpora (Hall, 2007).

Por este sistema, en cada mezcla de reacción se producen una serie de moléculas de DNA de nueva síntesis de diferente longitud que terminan todas en el mismo nucleótido y marcadas todas radiactivamente por el extremo 5' (todas contienen en el extremo 5' el cebador utilizado) (Hall, 2007).

Para comparar la secuencia del fragmento de interés con otras secuencias ya identificadas es necesario contar con herramientas informáticas que permitan realizar un análisis y dar una interpretación biológica.

Para ello surge la Bioinformática que es la rama de las Ciencias de la Computación, que estudia sistemas de cómputo y tratamiento de la información para el análisis de datos experimentales a nivel molecular de sistemas biológicos, así como la simulación de los mismos. Una de las principales aplicaciones de la bioinformática es la simulación, el análisis de los datos obtenidos en el estudio de moléculas relevantes para la vida, principalmente del DNA/RNA/genoma o de las proteínas (cuyo conjunto en un determinado organismo biológico forma su proteoma), así como el diseño y desarrollo de herramientas tales como bases de datos, directorios web, etc (Chapman y Hall, 2006).

Con lo anterior se han podido determinar las similitudes y diferencias entre enzimas, proteínas y moléculas estructurales importantes de los organismos. Con el desarrollo de técnicas de secuenciación de las moléculas de DNA y RNA, se han podido comparar organismos a través de los genes.

Actualmente la Filogenia expresa las interrelaciones de los componentes de una especie o grupo como resultado de la evolución debida a la descendencia y a la transformación de los caracteres hereditarios (López y Pérez, 1999).

III. ANTECEDENTES

A nivel mundial la presencia de IPNV ha causado un fuerte impacto económico ya que la mayoría de las pérdidas afectan generalmente a organismos jóvenes, para los cuales los costos de producción se ven aumentados por el tiempo de cuidado y la cantidad de alimento consumido. Por esta razón se han realizado diversos estudios que han permitido realizar la identificación de este patógeno y con ello contar con un análisis que permita evaluar el efecto que tiene la presencia de este virus en países dedicados a la salmonicultura (Fernández, 2005).

Para la identificación de virus que atacan a los salmónidos se han realizado estudios como el que llevaron a cabo Maganja *et al.*, 2002; quienes compararon la eficiencia y sensibilidad del aislamiento y su identificación a través de métodos moleculares del virus de la necrosis pancreática infecciosa y del virus de la necrosis hematopoyética infecciosa.

Los resultados de este estudio son que de las 320 muestras de trucha arco iris inoculadas, 54 presentaron efecto citopático. Los primers utilizados amplificaron secuencias de los genes de la proteína VP2, el fragmento obtenido fue de 1180 pb para la primera amplificación y en la anidada 509 y 524 pb respectivamente.

Por otra parte, también se han realizado estudios que han permitido aislar el IPNV en otras especies de peces, tal es el caso del estudio de Adair *et al.*, 1981 quienes aislaron y caracterizaron el virus de la necrosis pancreática infecciosa a partir de peces de aleta dorada de aproximadamente 1 kg, procedentes de hábitats contaminados.

Paralelamente se han desarrollado otros estudios como el de Williams *et al.*, 1999; quienes realizaron un ensayo molecular múltiple para detectar simultáneamente otros birnavirus del serogrupo A: IHNV, IPNV y VHSV. Para ello utilizaron la cepa IPNV West Buxton, propagada en la línea celular *Chinook Salmon Embryo* 214. Realizaron extracción de RNA total con Trizol LS, sintetizaron la cDNA a partir de la RT- moloney Murine Leucemia virus de Promega y; para la amplificación usaron primers que codificaran fragmentos de la proteína VP2 de los birnavirus utilizando la enzima Ampli taq polimerasa de Perkin Elmer.

Los resultados fueron la detección de tres fragmentos virales de diferente tamaño, para VHSV 625 pb, para IHNV 371 pb y para IPNV 206 pb.

Otro estudio importante fue el realizado por Rodríguez *et al.*, 2001 quién comparó métodos de diagnóstico como: la inmunofluorescencia indirecta, la citometría de flujo, la inmunoperoxidasa, inmuno dot blot, RT-PCR etc.

En México unos de los antecedentes con que se cuenta es el de Guerrero *et al.*, 2002 quien menciona que en 1996 y 1997 en el municipio de Amanalco de Becerra, Edo. de México ocurrió un brote que tenía varias características compatibles con la necrosis pancreática infecciosa. En este brote se presentó una mortalidad acumulada del 60% de un lote de 100, 000 crías provenientes de una importación.

En los organismos analizados se presentaron signos de la enfermedad como distensión abdominal, oscurecimiento de la piel, estudios histopatológicos evidenciaron lesiones severas en páncreas, intestino y ciegos pilóricos, pero no se encontraron evidencias de bacterias.

La evaluación al microscopio electrónico evidenció algunas partículas hexagonales en el citoplasma de células infectadas. Otro método utilizado para la identificación del patógeno fue la prueba de ELISA con 5 pools de tejido de 6 riñones, los resultados obtenidos de esta prueba fueron negativos. También se realizó Citometría de Flujo, los resultados indicaron que en las muestras no existían linfocitos infectados con el IPNV.

Posteriormente en enero del 2000 en una granja de truchas de la región central de México cerca de Toluca se reportaron los signos típicos de la necrosis pancreática infecciosa en crías de trucha arco iris de 5.0-5.5 cm y con un peso de 3 g aproximadamente que fueron importadas como huevo oculado en noviembre de 1999. Los peces enfermos presentaron alta mortalidad, signos y lesiones no observados ni documentados antes en la región. Se realizaron estudios para determinar la enfermedad, resultando positiva la infección por el virus de la necrosis pancreática infecciosa (Ortega *et al.*, 2002).

Estos fueron los primeros casos del IPNV diagnosticado en trucha arco iris en México, la cepa viral identificada tiene un 95% de similitud con la cepa Buhl del IPNV, que pertenece al serogrupo A de los birnavirus acuáticos (Ortega *et al.*, 2002). La cepa Buhl pertenece al genogrupo 1 de los *Aquabimavirus* (Nishizawa *et al.*, 2005).

IV. PROBLEMÁTICA A RESOLVER

En México una vez confirmada la presencia del IPNV, en el laboratorio de Sanidad Acuicola del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), el cual en un principio se constituyó como el único laboratorio de diagnóstico de esta enfermedad a través de la técnica de cultivo celular con la línea CHSE- 214 (*Chinook salmon embryo*).

Ante la necesidad de resolver la problemática de los productores de trucha para detectar de forma rápida al IPNV, se considero necesario incrementar el número de laboratorios y estandarizar pruebas de detección rápida como la RT-PCR (Ortega *et al.*, 2002; Salgado 2000).

Por otro lado, no solo la detección del IPNV es importante por considerarse dentro de la normatividad nacional, si no determinar el o los genotipos presentes en México ya que de ello dependerá el control y/o prevención que se pueda realizar en el sector trutícola del país.

V. FACTORES QUE INTERVIENEN EN EL PROBLEMA DE ESTUDIO

Factores Ambientales. Ubicación geográfica de las unidades de producción, calidad del agua, fuente de abastecimiento y factores físico-químicos.

Factores Genéticos. Expresión de genes resistentes a la presencia de patógenos, o modificación de la expresión genética por cambios climáticos que se presenten en el medio ambiente.

Factores Epidemiológicos. Consecuencia de la contaminación o bien del estrés al que están sometidos por las altas densidades en los estanques.

Factor microbiológico: Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa.

VI. UBICACIÓN DEL PROBLEMA

❖ Económico

En México el cultivo de la trucha arco iris ocupa los primeros lugares de producción en entidades federativas como el Estado de México (53%), Puebla (24%) e Hidalgo (9%); y la presencia de enfermedades infecciosas ocasionadas por virus, trae como consecuencia deficiencias en el crecimiento de los organismos o bien la muerte de éstos, mermando los recursos económicos que de estos se puede tener.

❖ Biológico

La presencia del IPNV afecta a la trucha arco iris en condiciones de cultivo ya que los organismos pueden desarrollar la infección a partir de desechos biológicos como heces y otros que se generen dentro del agua, lo cual trae como consecuencia la diseminación del virus a otras granjas acuícolas o bien a cuerpos de agua naturales.

VII. IMPACTO

❖ Económico

El cultivo de la trucha es altamente rentable y la presencia del virus de la necrosis pancreática infecciosa trae como consecuencia grandes pérdidas económicas.

❖ Biológico

La introducción de organismos portadores con IPNV puede traer como consecuencia la diseminación de genotipos virulentos.

VIII. PREGUNTAS BIOLÓGICAS

¿El genogrupo del IPNV presente en la zona central de México está relacionado con el origen geográfico de las truchas?

¿Cuáles y cuántos son los genotipos del IPNV que afectan a la trucha arco iris de la zona central de México?

¿A que genogrupos pertenecen los IPNV que están presentes en la zona central de México?

IX. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Qué genogrupos del virus de la necrosis pancreática infecciosa están presentes en la zona central de México?

X. JUSTIFICACIÓN

En México la truiticultura es una actividad productiva generadora de fuentes de empleo, de alimentos que se vio impactada por la presencia del IPNV, contando con solo un laboratorio para la detección a partir de cultivo celular.

Ante este escenario se planteo la posibilidad de crear un laboratorio en la Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, que desarrollará una metodología de rápida detección de patógenos, siendo este el Laboratorio de Reproducción, Genética y Sanidad Acuícola, capaz de detectar por la técnica de RT-PCR al IPNV.

Razones por las que se realizó la presente investigación con el objetivo de estandarizar la técnica de RT-PCR para la detección del IPNV y confirmar a través de la secuenciación el genogrupo presente en México.

XI. OBJETIVOS

Objetivo General

- ❖ Detectar e identificar los genogrupos de las cepas vírales de IPNV que afectan a la trucha arco iris en la zona central de México

Objetivos particulares

- ❖ Detectar el IPNV en trucha arco iris de granjas acuícolas de la zona central de México.
- ❖ Genotipificar las cepas de IPNV encontradas en granjas acuícolas de la zona central de México.
- ❖ Establecer la relación que existe entre el genotipo y el origen geográfico de los organismos.

XII. HIPÓTESIS

En las granjas trutícolas de la zona central de México se espera encontrar al Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa dentro de los Genogrupos I y II, de los *Aquabimavirus*.

XIII. METODOLOGÍA

Este estudio es descriptivo ya que cuenta con una población que se describió en función de un grupo de variables, es observacional porque solo puede describir y no se pueden modificar los factores que intervienen en el proceso y es experimental porque evalúa a través de la experimentación a las variables.

Para este estudio se realizaron algunas actividades tales como búsqueda de información de la distribución genética y geográfica del IPNV, búsqueda de información en el Sistema de Información del Programa Nacional de Sanidad Acuicola (PRONALSA) de las principales importaciones de huevo oculado de trucha arco iris así como la identificación de granjas positivas a su presencia, selección de cepas de IPNV, búsqueda de Genomas de las cepas seleccionadas, alineamiento múltiple con las secuencias de los genomas seleccionados de IPNV, identificación de la variabilidad genética de las cepas de IPNV, diseño de oligonucleótidos específicos para 2 genogrupos.

XIII. 1. Caracterización molecular de IPNV

La caracterización molecular de IPNV se obtuvo mediante la búsqueda de información en artículos científicos de las diferentes revistas que abordan temas de enfermedades en organismos acuáticos. Dicha búsqueda permitió identificar el trabajo realizado por Nishizawa *et al.*, (2005) en el que se plantea con base a la comparación de secuencias nucleotídicas de la región de unión de la proteína VP2 y la proteína NS del IPNV la caracterización molecular de las diferentes cepas aisladas en América, Europa y Asia; estableciendo con ello siete genogrupos de este virus y otros *aquabirnavirus*.

XIII. 2. Distribución de granjas de trucha arco iris de la zona central de México positivas a IPNV

La obtención de la información se realizó ingresando en el Sistema de Información del Programa Nacional de Sanidad Acuicola (PRONALSA), a la página web <http://xcsc.xoc.uam.mx/pronalsa/>, previa autorización de la Coordinación del Programa, se accedió al icono de listar servicios, se seleccionó la opción de las consultas y se pidió al sistema realizar un listado múltiple de los servicios realizados a las importaciones de trucha arco iris; obteniéndose como resultado, los países de origen de los que se había importado huevo oculado, y en los que se detectó la presencia de IPNV.

Con auxilio de este mismo programa fue posible la ubicación de las granjas de trucha de la zona central de México que habían realizado importaciones y el país de origen del que procedían las que fueron positivas a IPNV.

XIII. 3. Definición de posibles cepas de IPNV presentes en México

La selección de cepas de IPNV se realizó a través de la búsqueda de literatura científica en la que se estableció la distribución mundial que este virus tiene, así como la relación comercial existente entre los países en los que se ha detectado este patógeno y el origen de importaciones que se han realizado a nuestro país.

La búsqueda de las secuencias genéticas de las cepas seleccionadas se realizó accediendo a la página web del Genbank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> en la cual se solicitó en todas las bases de datos el número de referencia para cada una de las cepas, obteniéndose así las secuencias de estas.

XIII. 4. Comparación de las secuencias de las cepas de IPNV con el software Clustal W

Para la realización de los alineamientos múltiples, se ordenaron las secuencias genéticas posteriormente en el software Clustal W de la red cuya página web es <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html> se realizó el alineamiento múltiple con las 4 secuencias de IPNV.

XIII. 5. Detección del IPNV con primers universales utilizando la Técnica de RT-PCR en dos pasos y en un paso

La detección de cualquier genotipo de IPNV se realizó a través de la técnica de RT-PCR en dos pasos y en un paso, para esto se utilizaron primers universales propuestos por Lee *et al.*, 1994, que parten de la posición 807-1330 de la proteína VP2.

Para la detección del IPNV fue necesario salir a campo a muestrear para la obtención de las muestras.

Una vez ubicadas las granjas, la selección de los estanques de muestreo fue aleatorio tomando de cada uno 2 muestras por granja con 10 individuos, se colocaron en bolsas de plástico, se les puso oxígeno y se sellaron, colocándose sobre hielo para mantenerlas frescas.

XIII.5.1. Muestreo

El muestreo de este estudio se realizó en granjas acuícolas de los Estados de Hidalgo y Puebla en México.

- ❖ El Estado de Hidalgo se localiza al norte, 21° 24'; al sur, 19° 36' de la latitud norte; al este, 97° 58'; al oeste, 99° 53' de la longitud oeste. Colinda al norte con el estado de Querétaro, San Luis Potosí, Veracruz y Puebla; al sur, con los estados de Puebla, Tlaxcala y México; al oeste con México y Querétaro. En este estado se registran tres principales climas: el cálido, que ha registrado temperaturas de hasta 44°C a la sombra, el templado y el clima frío, con una temperatura de 5°C bajo cero en el día y hasta -15 grados centígrados durante la noche. Tiene regiones con lluvia de 2,800 mm. al año, que contrastan con la sequedad del municipio de Ixmiquilpan, donde se registran escasos 250 mm.
- ❖ El Estado de Puebla se encuentra ubicado al Sureste del Altiplano de la República, entre la Sierra Nevada y al Oeste de la Sierra Madre Oriental tiene la forma aproximada de un triángulo isósceles cuyo vértice apunta hacia el norte y la base hacia el sur; se encuentra entre los paralelos 17° 52' - 20° 52' latitud

norte y los 96° 43' y 99° 04' de longitud Oeste; está limitado al Norte con Veracruz, al sur con Oaxaca y Guerrero; al oeste con Morelos, Estado de México, Tlaxcala e Hidalgo y al este con Veracruz. La situación geográfica y la diversidad de alturas y regiones naturales, han conferido al Estado de Puebla una integración climatológica de las más variadas del país. Las características climáticas promedio de la entidad son temperatura media de 16°C, llegando en verano a 17.1°C y en invierno a 16°C, la estación de lluvias se inicia en mayo, se establece en junio y termina en octubre, con un promedio anual de precipitación de 801 milímetros.

❖ Características para la obtención de la Muestra

De acuerdo a lo anterior las consideraciones en función de tamaño de los peces fue el siguiente:

1. Huevo y/o alevines.- 10 a 15 huevos o alevines, en el caso de los alevines sin saco vitelino
2. Peces hasta de 2 a 4.9 cm.- Se cortó la cabeza y la aleta caudal justo antes del ano
3. Peces a partir de 5 cm. - Solo bazo y riñón

XIII. 5. 2. Obtención de la Muestra

Las muestras y el análisis de las mismas se realizó en el Laboratorio de Reproducción, Genética y Sanidad Acuícola de la Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco.

Los organismos se pesaron en una balanza y se midieron con un ictiómetro; en función de su tamaño, se determinó si se hacía la disección para extraer los órganos blanco del IPNV: bazo y riñón o bien si se utilizaba el cuerpo completo de los organismos.

La disección de los organismos se realizó en un área y con material estéril, previamente desinfectada con solución antiséptica y consistió en diseccionar con unas tijeras estériles la parte ventral al pez y el flanco derecho con el fin de exponer las vísceras, se tomó el bazo y se depositó en un tubo eppendorf colocado sobre hielo, se extrajeron las vísceras, quedando expuesto el riñón el cual se disectó con tijeras iris a partir de la parte media anterior y con el estilete acanalado se extrajo el tejido y con las pinzas se colocó en el mismo tubo eppendorf hasta que se completó el pool de 5 organismos, durante todo el proceso las muestras se mantuvieron en hielo para evitar la degradación del RNA.

Las muestras, debidamente etiquetadas, se colocaron en N₂ líquido durante 2 minutos y después se conservaron a -20° C hasta su utilización.

Cabe señalar que cada muestra se conformó por un pool de bazo y riñón de 5 organismos o bien de cuerpos completos y se homogenizo adecuadamente tomando 50 mg de ese pool para la extracción de RNA.

XIII.5.3. Procesamiento de la Muestra

❖ Extracción de RNA

El proceso de extracción de RNA se realizó con el Kit QIAamp Viral RNA (QIAGEN). En un tubo eppendorf de 1.5 mL, se colocaron 50 mg de de bazo y riñón del pool de muestra y se homogenizó en 200 μ L de agua DEPC (dietilpirocarbonato), posteriormente se transfirió 140 μ L de este homogenizado a un tubo eppendorf nuevo y se agregó 560 μ L de Buffer AVL (Tiocinato de guanidina), se mezclaron las muestras vigorosamente durante 15 segundos, las muestras se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se adicionó 560 μ L de etanol absoluto, después se mezcló vigorosamente cada una de las muestras durante 15 segundos y se centrifugaron, enseguida se retiraron 630 μ L de la muestra y se transfirió a una columna, se centrifugó a 12, 000 rpm 2 minutos, concluida la centrifugación se decantó el contenido del filtrado y se realizó el mismo proceso con el resto de la muestra, después se adicionaron 500 μ L del buffer AW1 (Clorhidrato de guanidina) a las mini columnas y se centrifugó a 12, 000 rpm 2 minutos, se decantó el contenido del filtrado y se adicionaron 500 μ L del buffer AW2 (etanol) a las mini columnas y se centrifugó a 12, 000 rpm 3 minutos, se decantó el contenido del filtrado, se transfirió la columna a un tubo eppendorf nuevo y se adicionaron 50 μ L de Buffer de rehidratación, el RNA se rehidrató en hielo y se congeló a -20 °C hasta su uso.

La concentración del RNA se realizó en un espectrofotómetro Eppendorf, para la medición se prepararon las muestras con un factor de dilución 1:100, la concentración se midió a la observancia de 260/280 nm.

La calidad del RNA extraído se verificó en un gel de agarosa al 1%.

❖ Electroforesis en gel de agarosa al 1%

Se pesaron 0.4 g de agarosa y se disolvieron en 40 mL de TAE (Tris base, ácido acético glacial, 100 ml de EDTA 0,5 M y agua), la solución se calentó 50 segundos y se adicionaron 2 μ L de bromuro de etidio, se vertió la agarosa disuelta en el molde de los geles, se colocó el peine, se dejó solidificar la agarosa a temperatura ambiente durante 20 minutos, solidificado el gel se colocó en la cámara de electroforesis, se adicionó el buffer de corrida TAE de tal forma que el gel quedo sumergido, se preparó la muestra mezclando 2 μ L del buffer de carga y 5 μ L de muestra y se colocó cada muestra en el pozo correspondiente, se introdujo con una micropipeta en el pozo 1, 3.5 μ L del marcador de peso molecular para RNA, posteriormente se colocaron después de las muestras, el control positivo y negativo. La electroforesis se llevo acabo a 100 volts/30 minutos. Concluida la electroforesis se retiro el gel de la cámara y se colocó en el Transiluminador, se tomaron las fotografías en el software Alpha Imagen y se realizó el análisis de la imagen.

❖ Reacción en cadena de la Polimerasa de la Transcripción reversa en dos pasos

Síntesis de cDNA

Se colocó en hielo un tubo eppendorf, se adicionaron 0.3 μ L Primer sentido de los universales para IPNV (5'-GCCGACATCGTCAACTCCAC-3'), 1 μ L dNTP Mix 10mM, 10.7 μ L de agua DEPC 1% y 5 μ L de RNA total, la mezcla se calentó a 65° C 5 minutos.

Posteriormente se colocaron los tubos en hielo y se agregaron 4 µL de Buffer First Strand 5X, 2 µL de solución DDT 0.1M y 1.0 µL de RNAsin se mezcló el contenido de reacción, se incubó a 42° C 2 minutos y se adicionó a la mezcla de reacción 1.0 µL de SuperScript™II (Invitrogen), se incubó a 42° C 50 minutos y la inactivación de la reacción se llevó a cabo incubando a 70° C 15 minutos.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

En un micro tubo estéril se colocaron 11.9 µL de agua, 5 µL de Buffer 1X (solución de buffer Tris pH 8.5 y (NH₄)₂SO₄), 0.5 µL de dNTP's (0.2 mM), 3 µL de MgCl₂ (3 mM), 0.5 µL de primer sentido (50 pmol) 5'-GCCGACATCGTCAACTCCAC-3', 0.5 µL de primer antisentido (50 pmol), 5'-GACAGGATCATCTTGGCATA-3', 0.6 µL de Taq polimerasa (3 U) (Promega), se homogenizó la mezcla de reacción y se centrifugó 30 segundos y después se agregaron 3.0 µL de cDNA para cada muestra.

Posteriormente se colocaron las muestras en el termociclador bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C 1 minuto, alineamiento a 55°C 1 minuto, elongación a 72°C 1.5 minutos, repitiéndose 35 ciclos y por último se realizó una post-elongación a 72°C 7 minutos.

Concluida la amplificación el fragmento viral obtenido se observó en un gel de agarosa al 2%.

❖ RT-PCR en un solo paso

Para la técnica de RT-PCR en un paso se utilizaron los primers universales propuestos por Lee *et al.*, 1994.

Se preparó en un tubo la master mix la cual contenía 21.1 µL de agua, 10 µL de Buffer de PCR 1X (KCl y (NH₄)₂SO₄), 2.0 µL de dNTP's (400 µM), 3.6 µL de primer sentido (0.6 µM) 5'-GCCGACATCGTCAACTCCAC-3', 3.8 µL de primer antisentido (0.6 µM), 5' -GACAGGATCATCTTGGCATA-3', Inhibidor de RNAsas 0.3 µL (10 U) 2.0 µL de enzima (Qiagen), se mezcló la reacción vigorosamente y distribuyó el volumen de reacción a cada tubo, a cada reacción se le colocó 7 µL del templado de RNA.

Posteriormente se colocaron las muestras en el termociclador bajo las siguientes condiciones: transcripción reversa 50°C 30 minutos, activación inicial 95° 15 minutos, desnaturalización a 94°C 1 minuto, alineamiento a 55°C 1 minuto, elongación a 72°C 1.5 minutos, repitiéndose 35 ciclos y por último se realizó una post-elongación a 72°C 7 minutos.

El fragmento obtenido de la amplificación se observó en un gel de agarosa al 2%.

XIII.6. Diseño de oligonucleótidos específicos para Genogrupo I y II

Identificadas las regiones variables de las secuencias de IPNV, en el software Primer3 se diseñaron dos pares de oligonucleótidos: un par específico para identificar a las cepas del genogrupo I y otro par que permita identificar al genogrupo II en el que se localiza la cepa

danesa, obteniéndose para el Genogrupo I los primers que parten de la posición 868-1020 y para el Genogrupo II de la posición 310-765.

XIII.7. Detección de los genotipos de IPNV

Con el uso de oligonucleótidos específicos para Genogrupo I y II se analizaron 8 muestras procedentes de 8 granjas trutícolas del Estado de Hidalgo y 10 muestras procedentes de 10 granjas del Estado de Puebla que previamente fueron analizadas con los primers universales.

XIII.7. 1. Detección de IPNV con oligonucleótidos para Genogrupo I

Se extrajo RNA de las muestras, se realizó la síntesis de cDNA, y por último se realizó la PCR. En un micro tubo estéril se colocaron 10.6 μL de agua, 5 μL de Buffer de PCR 1X (solución de buffer Tris pH 8.5 y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 0.5 μL de dNTP's (0.2 mM), 2 μL de MgCl_2 (2 mM), 1.7 μL de primer sentido (0.2 μM) 5'-GCCAAGTTCACCCAGTCAAT-3', 1.9 μL de primer antisentido (0.2 μM), 5' GTTCCCGGATGAGAATGAGA-3', 0.3 μL de Taq polimerasa (1.5 U) (Promega), se homogenizó la mezcla de reacción y se sometió a un pulso de centrifuga y después se agregó 3.0 μL de cDNA para cada muestra.

Se colocaron las muestras en el termociclador bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C 1 minuto, alineamiento a 60°C 1 minuto, elongación a 72°C 1 minuto, repitiéndose 35 ciclos y por último se realizó una post-elongación a 72°C 5 minutos.

El fragmento de la amplificación se observó en un gel de agarosa al 2%.

XIII. 7. 2. Detección de IPNV con oligonucleótidos para Genogrupo II

Se extrajo RNA de las muestras, se realizó la síntesis de cDNA, se realizó la PCR para esta prueba. En un micro tubo estéril se colocaron 10.6 μL de agua, 5 μL de Buffer de PCR 1X (solución de buffer Tris pH 8.5 y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 0.5 μL de dNTP's (0.2 mM), 2 μL de MgCl_2 (2 mM), 4.2 μL de primer sentido (0.3 μM) 5'- GAC GTT CAA AGC TCC ACG CTG CCG-3', 4.3 μL de primer antisentido (0.3 μM), 5'-CTT GAT GTC TGC GGT GGG GTT GTT TGC-3', 0.3 μL de Taq polimerasa (1.5 U) (Promega), se homogenizó la mezcla de reacción y se sometió a un pulso de centrifuga y después se agregó 3.0 μL de cDNA para cada muestra.

Se colocaron las muestras en el termociclador bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C 1 minuto, alineamiento a 65°C 1.5 minutos, elongación a 72°C 1 minuto, repitiéndose 35 ciclos y por último se realizó una post-elongación a 72°C 5 minutos.

Los productos de PCR se observaron en un gel de agarosa al 2%.

XIII. 8. Purificación de productos de PCR

La purificación se realizó con el Kit "Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System" de Promega. Se cortó el fragmento viral del gel de agarosa con un bisturí estéril, se colocó el trozo de agarosa en un tubo eppendorf, se pesó y se adicionaron 10 µL de solución astringente por cada 10 mg de gel de agarosa, se incubó en baño maria a 65 °C durante 10 minutos hasta disolver completamente la agarosa, posteriormente la solución se colocó a una minicolumna y se incubó 1 minuto a temperatura ambiente.

Después las minicolumnas se centrifugaron a 14, 000 rpm 1 minuto, se retiró la mini columna del tubo y se decantó el sobrenadante, se colocó la minicolumna al tubo y se adicionó 700 µL de solución de lavado y se centrifugaron las muestras a 14, 000 rpm 1 minuto, posteriormente una vez más se retiró la mini columna del tubo, se decantó el sobrenadante, se colocó la minicolumna al tubo, se adicionaron 500 µL de solución de lavado, se centrifugaron las muestras a 14, 000 rpm 5 minutos, se retiró la mini columna del tubo y se decantó el sobrenadante. Se colocó la minicolumna al tubo y se centrifugó una vez más a 14, 000 rpm 3 minutos, se dejaron las muestras a temperatura ambiente 2 minutos para que se evaporaran los residuos de etanol, se colocaron las minicolumnas en un nuevo tubo eppendorf y se adicionó 30 µL de agua libre de nucleasas y se centrifugó a 14, 000 rpm 2 minutos.

XIII. 9. Secuenciación

El DNA purificado del fragmento viral obtenido por la RT- PCR en dos pasos, como en un paso, se envió al Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México para ser secuenciados.

XIII. 10. Análisis de la relación que existe entre el genogrupo y el origen geográfico de los organismos

La relación que existe entre el genogrupo y el origen geográfico de los organismos se determinó con base a la información de cada una de las granjas, con la que se detectaron las importaciones y el lugar de procedencia.

XIV. RESULTADOS

XIV. 1. Caracterización molecular de IPNV

Como parte de la búsqueda de información para conocer la caracterización molecular del IPNV se encontró el artículo de Nishizawa *et al.*, 2005 que describe perfectamente como se han establecido los diferentes genogrupos en los que se ha agrupado el IPNV con base a características genéticas.

Por tal razón un resultado de esta búsqueda de información fue el conocimiento de la caracterización molecular del IPNV y de otros *aquabirnavirus* en el mundo.

De acuerdo al análisis nucleotídico de la región terminal NS de la proteína VP2 se ha caracterizado que el IPNV y otros *aquabirnavirus* se han agrupado en siete grupos: el genogrupo I que incluye la cepa Jasper de Canadá, la cepa Reno, VR299, Buhl, Dry Mills y West Buxton de Estados Unidos de Norteamérica; genogrupo II la cepa Abild de Dinamarca, así como aislados asiáticos como PV, EIS, EEV y CV-HB1; genogrupo III el aislado de Bonnamy en Francia, N1 en Noruega, DPL en Tailandia, d'Honninctum, OV2 de Inglaterra y Spajarup en Dinamarca; genogrupo IV el aislado ASV en Canadá, Canadá 1 y Tellina en Inglaterra; genogrupo V agrupo el aislado Canadá 2 y Canada 3; genogrupo V1 el aislado Hecht de Alemania y el genogrupo VII compuesto por el virus de la ascitis amarilla (YTAV) y otros *birnavirus* aislados de peces marinos moluscos y delfines Nishizawa *et al.*, (2005)

Cabe señalar que se considera que todas estas cepas de IPNV se han aislado en diferentes países debido a que este se transmite de un continente a otro con la importación de ovas salmónidos y es muy probable que el virus tenga una distribución mundial antes de detectarse por primera vez en el siglo 19 y principios del 20 (Reno, 1999).

El aislado de IPNV detectado en México, se ha categorizado dentro del genogrupo I que corresponde a IPNV americanos.

En la figura 1 se presenta el dendrograma de los 7 genogrupos de IPNV y otros *aquabirnavirus*.

La distribución geográfica del IPNV y de otros *aquabirnavirus* en el mundo muestra que estos se han clasificado en dos serogrupos el A y el B.

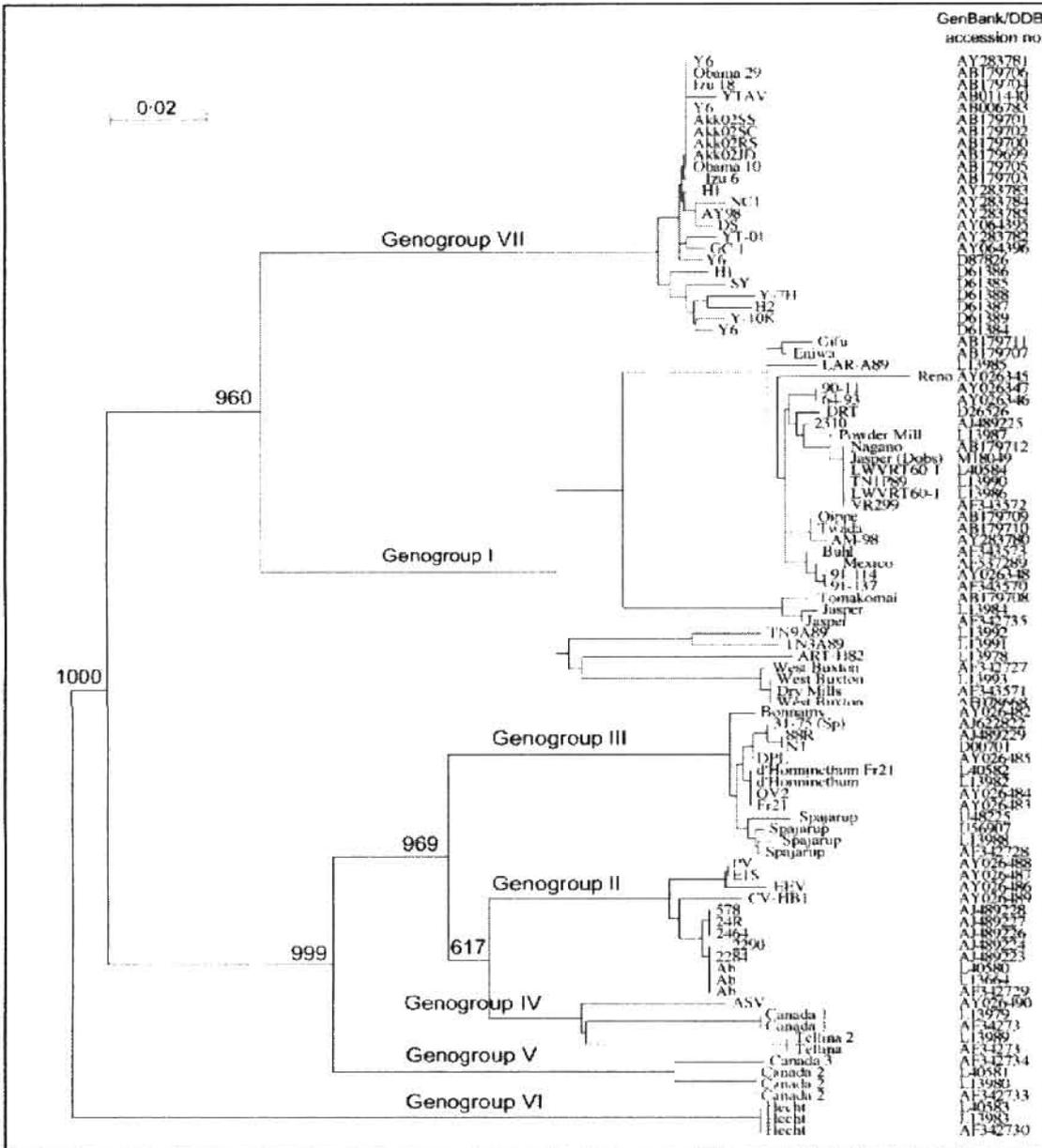


Figura 1. Dendrograma del serogrupo A, en donde se ubica el IPNV y otros *Aquabimavirus*. Fuente: Nishizawa *et al.*, (2005)

XIV.2. Distribución de las granjas de trucha arco iris de la zona central de México positivas a IPNV

Los resultados obtenidos del análisis en el Sistema de Información del PRONALSA, es que en México se detectó IPNV por el Laboratorio de Sanidad Animal del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, de la UAEM en 2003, el cual constituye el primer reporte de esta enfermedad en México.

Antes de esta fecha, la información estaba registrada en formatos en los informes del PRONALSA, pero a partir de 2003, se integraron en el Sistema de Información, a partir del cual se obtuvieron los siguientes resultados.

En la Figura 2 en sombreado se muestra los estados del país en los que se cultiva trucha arco iris, y con estrella en los que se ha detectado el IPNV.

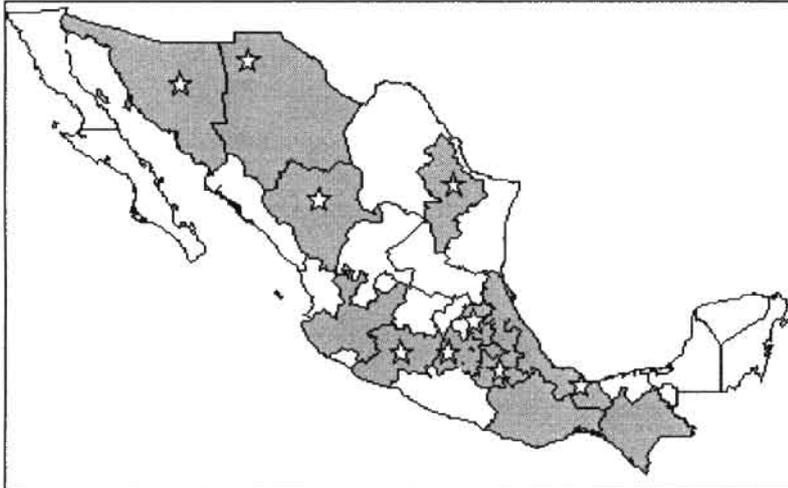


Figura 2. Estados en que se cultiva la trucha arco iris (en sombreado y con ☆ en los que se ha reportado la presencia del IPNV durante el periodo 2000-2005. Fuente: PRONALSA, 2006

En la Tabla 2 se presenta el número de casos detectados tanto positivos como negativos por estado y por año hasta el 2006.

De acuerdo a los resultados que se muestran en la figura 2 y tabla 2, el IPNV se localiza en algunos de los estados donde se produce. Es importante señalar que en los estados en que no se presentó debido a que en este periodo no se hicieron los análisis para su detección, razón por la que no se puede afirmar que sean negativos.

Tabla 2. Número de casos estudiados con relación al IPNV por Estado, periodo 2000 – 2006
Fuente: PRONALSA, 2006

Estado	2000		2001		2002		2003		2004		2005		2006	
	D	ND	D	ND										
Chihuahua		1	2	8	1	2								
Durango					1									
Estado de México	6	20		42	10	29	1	5	55	54	80	102	20	133
Hidalgo		2	16	8	26	2		1	1		1	2	2	
Michoacán				3	1	1		2	12	15	36	50	3	55
Puebla		2		1	3	3		1		1			15	24
Sonora											1			
Veracruz													4	2
Morelos												1		3
Total	6	25	18	62	42	37	1	9	68	70	118	155	44	217

D. Detectado

ND. No detectado

El análisis cuantitativo denota que en el Estado de Chihuahua no se tienen reportes de la presencia de IPNV en los últimos 4 años de ese periodo, se desconoce si fueron controlados los brotes evitando así su diseminación; mientras que en Sonora se reportó un caso en el 2005 lo cual sugiere la misma situación o bien el número de casos positivos se debe a un limitado número de muestreos.

De la consulta realizada en el Sistema de Información durante el periodo 2000- 2006, de un total de 872 servicios, se diagnosticaron positivos a IPNV 297 casos distribuidos en 9 estados: Chihuahua, Durango, Edo. de México, Hidalgo, Michoacán, Puebla, Sonora, Veracruz y Morelos (Tabla 2). A partir de este análisis se determinó que el IPNV se encuentra en un mayor número de granjas de la región central del país, región donde se encuentran los centros de distribución y comercialización de crías de trucha arco iris procedentes de la importación.

En la Tabla 3 se presentan las importaciones que se realizaron a México con los resultados sobre la certificación sanitaria de los lotes de huevo oculado de trucha arco iris que ingresaron durante el periodo de 2001-2005.

Tabla 3. Importación de huevo oculado de trucha arco iris periodo 2001-2005. Fuente: PRONALSA, 2006

Año	Estado	No. de servicios	País de origen	Resultados positivos
2001	Edo de Mexico	14	E U y Australia	0
2002	Edo de Mexico	19	Dinamarca	2
	Edo de Mexico		E U	1
	Edo de Mexico		Chile	0
	Edo de Mexico		Desconocido	3
2003	Edo de Mexico	14	E U y Chile	0
2004	Hidalgo, Michoacán, Edo de México	35	E U	5
2005	Edo de Mexico	7	E U	0
TOTAL		89		11

XIV. 3. Definición de las posibles cepas de IPNV presentes en México

De acuerdo a la información recabada en el inciso anterior (tabla 3) se puede mencionar que el IPNV ha sido reintroducido en varias ocasiones procedente de Estados Unidos, y en menor grado de Dinamarca.

De acuerdo con Nishizawa *et al.*, 2005, con relación a la distribución en el mundo de cepas de IPNV considerando los posibles países de procedencia, se considera como posibles cepas introducidas a México, la Buhl y VR299 de Estados Unidos y la cepa Abild de Dinamarca.

En cuanto a la detección de IPNV en México reportada por Ortega *et al.*, 2002, quién realizó la comparación con el estudio de Nishizawa *et al.*, 2005, lo categorizó como miembro del genogrupo I con alta similitud a la cepa Buhl, por lo tanto, se confirma al menos la presencia de una cepa de este genogrupo procedente de Estados Unidos.

Las cepas antes mencionadas fueron localizadas en el Genbank con los números de referencia AF343573, AF343572 AF342729 y AF537289. En los cuadros 1, 2, 3 y 4 se presentan los genomas respectivos de los aislados americanos y europeos.

Cuadro 1. Secuencia nucleotídica del genoma de la cepa Buhl. Fuente BLAST.

GenBank: AF343573	
Infectious pancreatic necrosis virus Buhl polyprotein mRNA, partial cds	
LOCUS: AF343573 2904 bp mRNA linear VRL 31-JUL-2001	
DEFINITION: Infectious pancreatic necrosis virus Buhl polyprotein mRNA, partial cds.	
ACCESSION: AF343573	
VERSION: AF343573.1 GI: 13604285	
KEYWORDS:	
SOURCE: Infectious pancreatic necrosis virus	
ORGANISM: Infectious pancreatic necrosis virus; Viruses; dsRNA viruses; Birnaviridae; Aquabimavirus.	
REFERENCE: 1 (bases 1 to 2904)	
AUTHORS: Blake, S., Ma, J.-Y., Caporale, D.A., Jairath, S. and Nicholson, B.L.	
TITLE: Phylogenetic relationships of aquatic birnaviruses based on deduced amino acid sequences of genome segment A cDNA	
JOURNAL: Dis. Aquat. Org. 45 (2), 89-102 (2001)	
PUBMED 11463106	
REFERENCE 2 (bases 1 to 2904)	
AUTHORS Blake, S., Ma, J.-Y., Caporale, D., Jairath, S. and Nicholson, B.	
TITLE Direct Submission	
JOURNAL Submitted (30-JAN-2001) Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology, University of Maine, Orono, ME 04469, USA	
FEATURES	Location/Qualifiers
source	1..2904
	/organism="Infectious pancreatic necrosis virus"
	/mol_type="mRNA"
	/strain="Buhl"
	/host="trout"
	/db_xref="taxon:11002"
	/segment="A"
CDS	1..>2904

```
/note="contains VP2/NS/VP3"  
/codon_start=1  
/product="polyprotein"  
/protein_id="AAK32165.1"
```

```
/db_xref="GI:13604286"  
/translation="MSTSKATATYLRSIMLPENGPASIPDDITERHIL
```

KQETSSYNLE

```
VSESGSGLLVCFPGAPGSRVGAHYRWNLNQTALFEFDQWLETSQDLKAFNYGRLISRK  
YDIQSSTLPAGLYALNGTLNAATFEGSLSEVESLTYNSLMSLTTPNQDKVNNQLVTKG  
ITVLNLTPTGFDKPYVRLDEETPQGPQSMNGARMRCTAAIAPRRYEIDLPSERLPTVAA  
TATPTTIYEGNADIVNSTTVTGDITFQLEAEPANETVDFILQFLGLDNDVPVVTVS  
STLVTVDNHRRASAKFTQSIPTMITKPIRVKLAYQLNQQTAIANAATLGANGPASV  
SFSSGNGNVPGLRPITLVAYEKMTQPSILTAVGVSNYELIPNDLLKNMVTKYGKYD  
PEGLNYAKMILSYREELDIRTVWRTEEYKERTRAFKEITDFTSDLPTSKAWGWRDLVR  
GIRKVAAPVLSTLFPMAAPLIGAADQFIGDLTRTNSAGGRYLSHAAGGRYHDMDSWA  
SGSEAGSYSKHLKTRLESNNYEEVELPKPTKGVIFPVVHTVESAPGEAFGSLVVVPIG  
AYPELLDPNQVL SYFKNDTGCVWVGIGEDIPFEGDDMCYTALPLKEIKRNGNIVVEKI  
FAGPAMGPSSQLALLVNDIDEGIPRMVFTGEIADDEETVIPCVDIKAMAAHEHG  
LPLIGCQPGVDEMVANTSLASHLIQSGALPVQKAGACRRIKYLQGLMRTTASGMDAE  
LQGLLQATMARAKEVKDAEVFKLLKLSWTRKNDLTDHMYEWSKEDPDAIKFGRVST  
PPKHQEKPKGPDQHTAQEAKATRISLDAVKAGADFVSPWEIAENNYRGPAPGQFKYYM  
ITGRVNPNGEEYEDYVRKPIRPTMDKIRRLANSVYGLPHQEPAPDDFYQAVVEVFA  
ENGGRPDQDQMDLRLDLARQMKRRPRPAETRRQTKTPPRAATSSGSRFTPSGD"
```

ORIGIN

```
1 atgagcacat ccaaggcaac cgcaacctac ttgagatcca ttatgcttcc cgagaatggg  
61 ccagcaagca ttccggacga cataaacagag aggcatalac laaacaaga gacctgtca  
121 tacaacttag aggtctccga atcaggaagt gggcttctg tctgctccc tggagctcct  
181 ggatccaggg tcggtgccca ctacaggtgg aatctgaacc agacggcact agaattcgac  
241 cagtggttag agacgtcaca ggacctaaag aaggcattca actacgggag actgatctca  
301 cggaaatacc acatccagag ctcaacctt cccgctggtc tgatgact caacgggacc  
361 ctgaacgctg ccaccttga aggaagtctg tctgaagtag agagcctaac ctacaacagc  
421 ttgatgtccc taacaacaaa cccacaggac aaggtcaaca atcaactagt gaccaaaagg  
481 atcaccgtcc tgaatctacc aactgggtt gacaagccat acgtccgct agaggacgag  
541 acgccacagg gccccagtc catgaacgga gcaaggatga ggtgcacagc tgaatcga  
601 ccaaggaggf atgaaatcga cctccatcc gaacgactgc cgaccgtggc cgcgactcgc  
661 accccaacaa caatctatga ggggaatgcc gacatctga actccacaac agttaccggg  
721 gacataacat tccagctga ggccgaacct gccaatgaga cagtgttga cttcattta  
781 cagttcctgg ggtgggaca cgacgtcccc gtggtaccg tgaacaagtc cagctagtc  
841 acagtgga accacaggag ggcgtcagcc aagttcacc agtcaatccc aacagaaatg  
901 atcaccacaa caatcacagc ggtcaagctg gctaccagc tcaaccagca gaccgctatt  
961 gcaaacgcag caacgctcgg agccaatggg ccggcatcag tctattctc atccgggaac  
1021 ggcaatgtc cgggagtcct acgaccata accctagtgg cgtacgagaa gatgaccccc  
1081 cagtcaatc tgaccgtggc tggcgtatcc aactatgagc tgatccaaa cccagacct  
1141 ctgaagaaca tggctactaa gtatgaaag tacgaccctg agggcctcaa ctatgccaag  
1201 atgatcctgt cctacagaga ggagctggac atcagaaccg tctggaggac tgaggaaatc  
1261 aaagaaagga caagagcatt caaagagatc accgacttca caagtgaact accaacctca  
1321 aaggcatggg gatggagga cctagtcaga ggcacagaa aagtggccgc ccccgctcct  
1381 tcaacgtctc tccaatggc ggctcccc ataggagcgg ccgaccaatc cattggggac  
1441 ctaccagga ccaactcagc cgggggagc tacctgtcac acgagccgg aggccgctac  
1501 catgatgtca tggactcatg ggccagcggg tccaggcag gaagctactc aaagcacctc  
1561 aagaccggc ttgatccaa caactatgag gaagtggagc tccaagacc acaaaagga  
1621 gtcatcttc ctgtgtgca caccgtgag agtgaccag gtgagccct cgggtcgtc  
1681 gtggtagtaa taccaggagc gtaccggaa ctctgacc caaacaaca ggtcctatcc
```

```
1741 tactcaaga acgacacagg ttgcgtctgg gggataggag aagacatccc cttgaagga
1801 gatgacatgt gctacaccgc actgccctc aaggagatca agaggaacgg aaacatcgtg
1861 gtggagaaaa tattcgtctgg ccccgatg ggaccgtcct cccaactgc actgtccctg
1921 ctggtcaacg acatagacga agggattcca aggalgtct tcacaggcga gatcgtgat
1981 gacgaagaaa cagtcacccc aatctgcgga gtggacatca aagccatggc cgcccatgaa
2041 cacgggtgc ccctcattgg ctgccagcca ggggtcgacg agatgggtggc aaacacatct
2101 ctgcacatca acctgattca gacggagcc ctaccagtgc agaaagcaca gggagcctgc
2161 agggagaatca agtacctggg ccagctgatg agaacaactg calcagggat ggacgcagaa
2221 ctgcaggggc tgctgcaggc caccatggcc agagcaaaag aaggaagga cgccgaagtg
2281 tcaaaactc tgaactcat gtcattgaca agaaagaacg acctacaga tcacatgat
2341 gagggtcaa agggaggacc cgtgcaatc aaattggca ggctcgtcag caccoccca
2401 aaacaccaag agaagccaaa aggaccgac cagcacaccg cccaggaggc aaaggccacc
2461 aggatctac tggacccgt caaagccggc gcagactcgc tctcccaga gtggatcgcg
2521 gagaacaact acccggttc agtccaggc cagttcaagt actacatgat aacgggcaga
2581 gtcccaaac ccggagaaga gtacgaggac tatgtcgaa aaccgataac ccgaccaacc
2641 gacatggaca aaatcagacg cctagccaac agtctctacg gctgccccca ccaagaaccc
2701 gcaccagacg acttctacca gccagctcgc gagggttctg cagaaaacgg gggagaggg
2761 cccgaccaag accaaatgca agactgagg gacttggcaa ggcagatgaa acgacgacc
2821 cgaccagctg agacacgcag gcaaccaag actccacca gggcggcaac ctccagtga
2881 tccggttta cccctccgg cgat
```

Cuadro 2. Secuencia nucleotídica del genoma de la cepa VR299. Fuente BLAST.

GenBank: AF343572

Infectious pancreatic necrosis virus VR299 polyprotein mRNA, partial cds

LOCUS AF343572 2904 bp mRNA linear VRL 31-JUL-2001

DEFINITION: Infectious pancreatic necrosis virus VR299 polyprotein mRNA, partial cds.

ACCESSION: AF343572

VERSION: AF343572.1 GI:13604283

KEYWORDS:

SOURCE: Infectious pancreatic necrosis virus

ORGANISM: Infectious pancreatic necrosis virus; Viruses; dsRNA viruses; Birnaviridae; Aquabimavirus.

REFERENCE: 1 (bases 1 to 2904)

AUTHORS Blake,S., Ma,J.-Y., Caporale,D.A., Jairath,S. and Nicholson,B.L.

TITLE Phylogenetic relationships of aquatic birnaviruses based on deduced amino acid sequences of genome segment A cDNA

JOURNAL: Dis. Aquat. Org. 45 (2), 89-102 (2001)

PUBMED: 11463106

REFERENCE: 2 (bases 1 to 2904)

AUTHORS Blake,S., Ma,J.-Y., Caporale,D., Jairath,S. and Nicholson,B.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (30-JAN-2001) Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology, University of Maine, Orono, ME 04469, USA

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..2904

/organism="Infectious pancreatic necrosis virus"

/mol_type="mRNA"

AVR
MICHANICO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

```
/strain="VR299"  
/host="trout"  
/db_xref="taxon:11002"  
/segment="A"  
CDS 1.>2904  
/note="contains VP2/NS/VP3"  
/codon_start=1  
/product="polyprotein"  
/protein_id="AAK32164.1"  
/db_xref="GI:13604284"  
/translation="MSTSKATATYLRSIMLPENGPASIPDDITERHIL
```

KQETSSYNLE

```
VSESGSGLLVCFFGAPGSRVGAHYRWNLNQTALEFDQWLETSQDLKKAFFNYGRLISRK  
YDIQSSTLPAGLYALNGTLNAAATFEGSLSEVESLTYNSLMSLTTNPQDKVNNQLVTKG  
ITVLNLPFGDFKPYVRLDEETPQQGQSMNGARMRCTAAIAPRKYEIDLPSERLPTVAA  
TGTPTTIYEGNADIVNSTTGTGDIITFQLEAEPVNETRFDFILQFLGLDNDVPVVTVS  
STLVTADNYRGASAKFTQSIPTMITKPIRVKLAYQLNQQTAIANAATLGAKGPASV  
SFSSGNGNVPGLRPIITLVAYEKMTQPSILTVAGVSNYELIPNPDLLKNMVTKYGKYD  
PEGLNYAKMILSHREELDIRTVWRTEEYKERTRAFKEITDFTSDLPTSKAWGWRDLV  
GIRKVAAPVLSTLFPMAAPLIGAADQFIGDLTKNSAGGRYLSHAAGGRYHDVMDSWA  
SGSEAGSYSKHLKTRLESNNYEEVELPKPTKGVIFPVVHTVESAPGEAFGSLVVVIPG  
AYPELLDPNQVLSYFKNDTGCVWVGIGEDIPFEGDDMCYTALPLKEIKRNGNIVVEKI  
FAGPVMGPPSSQLALSLLVNDIDEGIPRMVFTGEIADDEETVIPICGVDIKAIAAHEHG  
LPLIGCQPGVDEMVAANTSLASHLIQSGALPVQKAQGACRRIKYLGQLMRTTASGMDAE  
LQGLLQATMARAKEVKDAEVFKLLKLSWTRKNDLTDHMYEWSKEDPDAIKFGRLVST  
PPKHREKPKGPDQHTAQEAATRISLDGVKAGADFASPEWITENNYRGPSPGQFKYYM  
ITGRVNPGEYEDYVRKPIRPTDMDKIRRLANSVYGLPHQEPAPDDFYQAVVEVFA  
ENGGRRPDDQDQMDLRLDLARQMKRRRPRPAETRRQTKTPPRAATSSGSRFTPSGD"
```

ORIGIN

```
1 atgagcacat ccaaggcaac cgcaacctac ttgagatcca ttatgcttcc cgagaatggg  
61 ccagcaagca ttccggagca cataacagag aggcataata taaaacaaga gacctcgtca  
121 tacaacttag agglatccga atcaggaagt gggctcttg tctgcttccc cggagctcct  
181 ggalccaggg tcggcgccca ctacaggtgg aatctgaacc agacggcact agaattcgac  
241 cagtggttag agacgtcaca ggacctaaag aaggcattca actacgggag actgatctca  
301 cggaaatagc acatccagag ctcaaccctt cccgctggtc tgatgcact caatgggacc  
361 ctgaacgctg ccacctcga aggaagtctg tctgaagttag agagcctaac ctacaacagc  
421 ttgatgtccc laacaacaaa cccacaggac aaggtcaaca atcaactagt gaccaaagga  
481 attaccgtcc tgaatctacc aactgggttt gacaagccat acgtccgctt agaggacgag  
541 acgccacagg gcccccagtc calgaacgga gcaaggatga ggtgcacagc tgccatcgca  
601 ccaaggaagt atgaaatcga cctccatcc gaacgactgc cgacctggc cgcgactggg  
661 acccaacaaa caattatga ggggaatgct gacatctga actccacaac agtcaccggg  
721 gacataacat tccagctcga ggccgaacct gtcaatgaga cacggttcga ctctattta  
781 cagttctcgg ggctggacaa cgacgtcccc gtggttaccg tgacaagctc cacgctagtc  
841 acagcggaca actacagggg ggcgtcagcc aagttcacc agtcaatccc aacagaaatg  
901 attacaaac caatcacagc ggtcaagctg gcctaccagc tcaaccagca gaccgcaatt  
961 gcaaacgcag caacgctcgg agccaagggg ccggcatcag tctcattctc atccgggacc  
1021 ggcaatgtgc cgggggtcct aagaccata accctagtg cgtacgagaa gatgaccccc  
1081 cagtcaatcc tgaccgtggc tggcgtatcc aaclatgagc tgatccaaa cccagacct  
1141 ctgaagaaca tggcaccaa glatggaaag tatgacctg agggcctcaa ctatgccaag  
1201 atgatcctgt cccacagaga ggagctggac attagaaccg tctggaggac tgaggaatac
```

```
1261 aaagaaagga caagagcatt caaagagatc actgacttca caagtgacct accaacctca
1321 aaggcalggg gatggaggga cctggtcaga ggcatcagaa aagtgccgc ccccgctc
1381 tcaacgctct tccaatggc ggctcccc tlaggagctg cccaccaatt cattggggac
1441 ctaccaaga ccaactcagc cgggggacgc tactgtcac acgcagccgg aggccgctac
1501 catgatgta tggactcatg ggccagcggg tccgaggcag gaagctattc aaagcacctc
1561 aagaccggc ttgagtccaa taactatgag gaagtggagc ttccaaagcc aacaaagga
1621 gtcatcttc ctgtgggca caccgttgag agtgaccagc gtgagccctf cgggtcgtc
1681 gtggtagtaa taccaggagc gtaccggaa ctcttgacc caaaccaaca ggtcctatcc
1741 tactcaaga acgacacagg ctgctctgg gggataggag aagcatccc cttgaagga
1801 gatgacatg gtacaccgc actgccctc aaggagatca agaggaacgg aaacatcgt
1861 gtggagaaaa tattcgtgg cccgtgatg ggaccgtct cccaactgc actgtccctg
1921 ctgtaacg acatagacga agggattcca aggatggtct tcacaggcga gattgccgat
1981 gacgaagaaa cagtcacccc aatctgcgga gtggacatca aagccatagc cgccatgaa
2041 cacgggctgc cctcaltgg ctgtcagca ggggtcagc agatggggc aaacacatc
2101 ctgcatcac acctgattca gagcgggccc ctaccgtgc agaaagcaca gggcgcctc
2161 aggagaatca agtacctggg ccagctgatg agaacaactg calcagggat ggacgcagaa
2221 ctgcagggc tgcctcaggc caccatggcc agagcaaaag aagtgaagga cgccgaagtg
2281 ttcaaacitc tgaactcat gtcatggaca agaaagaacg acctcacaga tcacatgat
2341 gagtggtaa aggagatcc tgalcaatc aaattggca ggctgtcag caccoccca
2401 aaacaccgag agaagccaaa aggacctgac cagcacaccg cccaggaggc aaaggccacc
2461 aggatctac tggacggcgt caaagccggc gcagacttg cctcccaga gtggatcacg
2521 gagaacaact acccggttcc atctccaggc cagtcaagt actacatgat aacgggcaga
2581 gtcccaaac ccggagaaga gtacgaggac tatgtcgaa aaccgataac ccgaccaacc
2641 gacatggaca aaatcagacg cctagccaac agtgtctac gctgcccc ccaagaacc
2701 gcaccagacg actctacca gccagctgc gaggtgtcg cagaaaacgg ggaagaggg
2761 cccgaccaag accaatgca agacctgagg gactggcaa ggcagatgaa acgacgacc
2821 cgaccagctg agacacgag gcaaccaag actccacca gggcggcaac ctccagtgga
2881 tcgggttta cccctccgg cgat
```

Cuadro 3. Secuencia nucleotídica del genoma de la cepa Abdil. Fuente BLAST.

GenBank: AF342729.1

Infectious pancreatic necrosis virus Ab polyprotein mRNA, partial cds

LOCUS: AF342729 2904 bp mRNA linear VRL 31-JUL-2001

DEFINITION: Infectious pancreatic necrosis virus Ab polyprotein mRNA, partial cds.

ACCESSION: AF342729

VERSION: AF342729.1 GI:13604265

KEYWORDS:

SOURCE: Infectious pancreatic necrosis virus

ORGANISM: Infectious pancreatic necrosis virus; Viruses; dsRNA viruses; Birnaviridae; Aquabirnavirus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 2904)

AUTHORS Blake,S., Ma,J.Y., Caporale,D.A., Jairath,S. and Nicholson,B.L.

TITLE Phylogenetic relationships of aquatic birnaviruses based on deduced amino acid sequences of genome segment A cDNA

JOURNAL Dis. Aquat. Org. 45 (2), 89-102 (2001)

PUBMED 11463106

REFERENCE 2 (bases 1 to 2904)

AUTHORS Blake,S., Ma,J.-Y., Caporale,D., Jairath,S. and Nicholson,B.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (26-JAN-2001) Biochemistry, Microbiology and Molecular

Biology, University of Maine, Orono, ME 04469, USA

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..2904

 /organism="Infectious pancreatic necrosis virus"

 /mol_type="mRNA"

 /strain="Ab"

 /host="trout"

 /db_xref="taxon:11002"

 /segment="A"

CDS 1..>2904

 /note="contains VP2/NS/VP3"

 /codon_start=1

 /product="polyprotein"

 /protein_id="AAK32155.1"

 /db_xref="GI:13604266"

 /translation="MSTNKATATYLKSIMLPETGPSSIPDDITERHIL

 KQETSSYNLE

 VSDSGSVLVCFPGAGPSRVGAHYRWVNVNQTELEFDOWLETSQDLKKAFFNYGRLISR

 YDVQSSSTLPAGLYALNGTINAATFEGSLSEVESLTYNSLMSLTNPQDKVNNQLVTKG

 VTVLNLPFGFDKPYVRLDETPQGPQSMNGARMRC TAAIAPRRYEXDLP SERLP TVAA

 TGTPTTIYXGXGDIVNSTVTGDISFSLANNPTADIKFDFQLDFGLDNDVPVVTVTS

 SVLVNADNYRGASAKMTMSIPTENITKPTRVKS YKVNQQTAIANPATLGLGPASV

 SFSSGNGNVPGLRPTLVAYEKMPQSILTVAGVSNYELIPPELLKNMVTRYGKYD

 PEGLNYAKMILSHREELDIRTVWVTEYKERTRVFNEITDFSSDLPTSKAWGWRDIVR

 GIRKVAAPVLSLTFPMAAPLIGVADQLIGDLTNTAAAGGRYRSMAGGRYKDVMSWA

 SGGPDGKFSQALKNRLESANYEEVELPPPSKGVIVPVVHTVQSAPGEAFGSLAIIIPG

 EYPELLDANQQVLSHFANDTGCVWGIGEDIPFEGDDMCYTALPLKEIKPNGNIIVEKI

 FAGPIMGPSAQLGLSLLVNSIEEGVPRMVFTGEIAADEETIIPICGVDIKAAAEHQG

 LPLIGCPGVDEEVSNTSLAAHLIQGTGLPVQKAKGANKRIKYL GELMSSIASGMDEE

 LQRLLSATMARAKEVKDAEIFKLLKLSWTRKNDLTDHMFWSKEDPDAIKFGRLIST

 PPKHPKPKGNQHAQAQEARAVRISLDAVRAGAEFA TPEWVATNDYRGPSPGQFKYYL

 ITGRTPDPNDGYEDIYKQITITKPTDMNKIRRLANSVYGLPHQEPAPEEFYDAVAVFA

 DNDGRGPDQDQMDQLRELARRMKRRPR TAEAPRRTRAPAEPAPQRSRFTPRGE"

ORIGIN

1 atgagcacia acaagcaac cgcaacctac ttgaagtcca ttatgctcc agagactgga

61 ccttcagca ttccggagca cataacggag agacacatct taaaacaaga gacttcgctc

121 tacaacttag aggtctcggg ctcaggaagt ggtgtcttg ttgtttccc tggagcacca

181 ggalcaaggg taggtgctca ctacagatgg aatgtgaacc agacggaact agagttcgac

241 cagtggctgg agacgtcaca ggacctgaag aaagcttca actacgggag gctgatalcc

301 aggaaatagc acgtcaaag ctccacgctg cggctgggc tctatgccct gaatgggacc

361 atcaacgccc ccacctcga aggaagtct tctgaggtgg agagcctgac ctataacagc

421 ttgatgtctc tgacaacaaa cccccaggac aaggtaaca accagctctg gaccaaagga

481 gtaaccgtcc tgaacctcc aactgggttc gacaagcat acgtccgctc tgaggacgag

541 acaccgagg gtccccagtc catgaacgga gccaggatga ggtgcaccgc tgcaatcgca

601 ccaaggaggt acgaaatnga cctccatct gagcgactac caaccgtggc agcaactggg

661 acccaacaa caatctatga ngggaanggc gacattgtga actcaaccac agtgacagga

721 gacattagct tcagctcgc aaacaacccc accgcagaca tcaagttcga ctccagctg

781 gacttctcg gtctcgacaa cgacgtccc gttgtcacgg tgaccagctc cgtgctgga

841 aacgcagaca actacagagg cgcgtcagcc aagatgacga tgtccatacc caccgagaac

901 atcacgaagc cgalcacaag agtcaagctg tctacaaga tcaaccagca gacagcgata

961 gccaacccag ccacctggg gacactaggt ccagcgtccg tctcctttc ttcaggaaac

1021 ggcaatgtcc ccggtgtct gagaccatc acactggtgg cclatgagaa aatgacacc

1081 cagtccatcc taactgtagc tggagtgtcc aactacgagc tgatcccaa cccagaactc

```
1141 ttgaagaaca tggtagacacg ctatggcaag tatgaccccc aagggctcaa ctatgccaag
1201 atgatcctgt cccacagggg gtagctggac ataaggacag tclggaagac tggaggtagc
1261 aaggagcggg caagagctct caacagatc accgactct ccagtgacct gccacgtca
1321 aaggcatggg gctggagggg catagtcaga gggatccgga aagtcgccc gccagtactg
1381 tcaacgctgt tccgatggc agcaccactc attggagtgg cagaccaact catcggagat
1441 ctaccaaca ccaacgcagc aggcggaagg taccgtcca tggccgagg aggacgctac
1501 aaggatgtaa tggactcctg ggccagcggc ggaccgacg ggaagttct ccaggctcta
1561 aagaacagac tggagtctgc caactacgag gaagtcgagc tcctcccc ttcaaaagga
1621 gtcattgtcc ctgtgtgca cactgtccag agtgaccag gtgaagcatt cggctccctg
1681 gcgataatca tcccagcga gtatcccgaa ctcttgatg ccaaccagca ggtcctgtcc
1741 cacttcgcaa acgacaccgg atgctgtgg gcataggag aggacatacc ctctgaagga
1801 gacgacatgt gctacaccgc actccctctg aaagagalca agccgaacgg gaacataa
1861 gttgagaaaa tctttgctgg cccaattatg ggccatcag ctacgtagg actgtccctg
1921 ctctgaaca gcaatgaaga ggggttcca aggatggtat tcaccgcca gatcggcct
1981 gatgaagaga caatcatacc aatctcggg gtagacatca aagcaatcg agccatgaa
2041 caagggtgc ctctcatcg ctgtcagcca ggggtggacg aggggtgag caacacctcc
2101 ctggccgac acctgatcca aaccgggacc ctaccgttc agaaagcaa aggggccaac
2161 aagagatca agtacctggg tgagctgat tcatcaatc catcagggat ggacgaggag
2221 ctgcaacgc tctgacgc cacaatgga cgggccaag aagtaaaaga tgccgagatc
2281 ttcaaaactc taaagctaat gtcatggacc agaaagaac acctaccga cccatgttc
2341 gagtggtaa aagaggacc tgacgcgac aagtcggac ggtgatcag cacgccccca
2401 aagcaccag agaagccaaa aggaccaaa cagcatgcc ccaagaggg gagagccgtt
2461 cgcactcac tggacccgt gagagcagga cgggaattc ccacaccga tgggtcgcg
2521 acgaacgact atcgcggccc atcccaggg cagtcaagt actacctgac tacgggtcgc
2581 acaccagacc cgaatgatg gtacgaggac tacatcaaac agaccatac aaaaccgacc
2641 gacatgaaca aaatcagacg ttagccaac agtgtgtac gcctccgca ccaggaacca
2701 gcccccgaag agttctacga cgcagttga gctgtgtc cagacaacga tggaaaggt
2761 ccagaccaag atcaaatgca agacctcag gagctcga gacgaatga acgacgacc
2821 cggactgcc aagcaccag gcgaaccaga gcaccgagg aaccggcacc gcagcgcagc
2881 tccaggttca cccccgcg agaa
```

Cuadro 4. Secuencia nucleotídica del IPNV detectado en México. Fuente BLAST.

```
GENBANK AF537289
LOCUS AF537289 1328 bp mRNA linear VRL 02-MAY-2003
DEFINITION Infectious pancreatic necrosis virus virion structural protein VP2
mRNA, partial cds.
ACCESSION AF537289
VERSION AF537289.1 GI:30315382
KEYWORDS
SOURCE Infectious pancreatic necrosis virus
ORGANISM Infectious pancreatic necrosis virus
Viruses; dsRNA viruses; Birnaviridae; Aquabimavirus.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1328)
AUTHORS Ortega,C.S., Montes de Oca,R., Groman,D., Yason,C., Blake,S. and
Nicholson,B.L.
TITLE Viral Infectious Pancreatic Necrosis in Farmed Rainbow Trout
(Oncorhynchus mykiss) from Mexico
JOURNAL J. Aquat. Anim. Health (2003) In press
REFERENCE 2 (bases 1 to 1328)
AUTHORS Ortega,C.S., Montes de Oca,R., Groman,D., Yason,C., Blake,S. and
Nicholson,B.L.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (12-AUG-2002) Biochemistry, Microbiology and Molecular
Biology, University of Maine, Orono, ME 04469, USA
```

FEATURES	Location/Qualifiers
source	1..1328 /organism="Infectious pancreatic necrosis virus" /mol_type="mRNA" /db_xref="taxon:11002" /segment="A" /country="Mexico"
CDS	<1..>1328 /codon_start=2 /product="virion structural protein VP2" /protein_id="AAP30880.1" /db_xref="GI:30315383" /translation="IQSSTLPAGLYALNGTLNAATFEGSLSEVESLTYNLSMLTNP"
<p>QDKVNNQLVTKGIVLNLPTGFDKPYVRLDETPOGQPSMNGARMRCTAAIAPRRYEI DLPSERLPTVAATATPTTIYEGNADIVNSTTVTGDITFQLEAEPANETVDFILQFLG LDNDVPVVTSSLTVDNHRKASAKFTQSIPTMITKPIITRVKLAYQLNQQTAIAN AATLGANGPASVSFSSGNGNVPGLRPIITLVAYEKMTQPQSILTVAGVSNYELIPNDL LKNMVTKYGKYDPEGLNYAKMILSHRELDIRTVWRTEEYKERTRAFKEITDFTSDLP TSKAWGWRDLVRGIRKVAAPVLSLTFPMAAPLIGAADQFIGDLTRTNSAGGRYLSHAA GGRYHDVMDSWASGSEAGSYSKHLKTRLESNNYEEVELPKPTKGVIFPVV"</p>	
ORIGIN	<p>1 catccagagc tcaacccttc ccgctggtct gtagcactc aacgggaccc tgaacgctgc 61 caccttcgaa ggaagtctgt ctgaagtaga gagcctaacc tacaatagct tgalgtccct 121 aacaacaac ccacaggaca aggtcaaca ccaactagtg accaaaggaa tcaccgtcct 181 gaattacca actgggtttg acaaacata cgtccgcta gaggacgaga cgccgcaggg 241 cccccatgc atgaacggag caaggatgag gtgcacagct gcaatcgac caaggaggta 301 tgaatcgac ctccatccg aacgcctgcc gaccgtggcc gcgactcga cccaacaac 361 aatctcag gggaaatgcc acatcgtgaa ctccacaaca gtlaccgggg acataacatt 421 ccagctcag gccgaaccg ccaatgagac agtgttcgac ttcatttac agttcctggg 481 gctggacaac gacgtccccg tggcaccgt gacaagctcc acgtagtca cagtggaaca 541 ccacaggaag gcgtagacca agttcaccca gtcaatccca acagaaatga ttaactaac 601 aattacag gtaacgctgg cctaccagct caaccagcag acgcccaltg caaacgcagc 661 aacgctcgg gccaatgggc cggcatcagt ctattctcc tccgggaacg gcaatgtgcc 721 gggaglccta cgaccataa ccctagtggc gtacgagaag atgaccccc agtcaatcct 781 gaccgtgct ggcgatcca aatagagct gatcccaaac ccagacctac tgaagaacat 841 ggtaccaag tatggaaagt acgacctga agccctaac tatgccaaga tgaactatc 901 ccacagagag gagctggaca tcagaaccgt ctggaggacc gaggaatata aagaaaggac 961 aagagcattc aaagagatca ctgactttac aagtgaccta ccaacctcaa aggcattggg 1021 atggagggc ctagtacag gcatcagaaa agtggcagcc cccgtgctgt caacgctctt 1081 cccaatggc gctccccta taggagcggc cgaccaatc attggggacc tcaccaggac 1141 caactcagc gggggacgct acctgtcaca cgacgccgga ggccgctacc atgatgtcat 1201 ggactcatg gccagcgggt ccgaggcagg aagctactcc aagcacctca agaccggg 1261 tgagtccaac aactatgagg aagtgagct tccaaagcca acaaggagg tcatcttcc 1321 tgggtga</p>

Con el genoma de cada una de las cepas de IPNV reportadas en los países de Estados Unidos, Dinamarca y México, se determinó la variabilidad que existía entre cada una de ellas.

XIV. 4. Comparación de las secuencias de las diferentes cepas de IPNV

La comparación genética de las cepas de IPNV se realizó a través del alineamiento nucleotídico en el software Clustal W el cual permitió identificar las variantes que presentan cada una de las cepas de IPNV seleccionadas para este estudio.

Como se muestra en la figura 7 la variabilidad genética en el genoma de las diferentes cepas de IPNV esta representada por espacios, en el caso donde se presentan los asteriscos es una región nucleotídica conservada para las 4 cepas evaluadas.

Al analizar la variabilidad genética de las cepas los resultados del alineamiento mostraron que la cepa Danesa Ab presenta un 79 % de similitud con la cepa Buhl, el mismo porcentaje lo presentó para la cepa VR299, pero para la cepa mexicana la similitud fue menor siendo esta del 78%.

El alineamiento también mostró una similitud del 98% de la cepa VR299 con la cepa Buhl. Para el caso de la cepa mexicana esta presenta un similitud del 96% con la cepa VR299 y 98% con la cepa Buhl.

EMBL-EBI Search All Databases Enter Text Here Go Reset Advanced Search Give us Feedback

Databases Tools EBI Groups Training Industry About Us Help Site Index

- Help
- General Help
- Formats
- Gaps
- Matrix
- References
- ClustalW2 Help
- ClustalW2 F&Q
- Jalview Help
- Scores Table
- Alignment
- Guide Tree
- Colours

ClustalW2 Results

Results of search	
Number of sequences	4
Alignment score	82258
Sequence format	Pearson
Sequence type	nt
JalView	
Output file	clustalw2-20080703-21064887.out
Alignment file	clustalw2-20080703-21064887.ali
Guide tree file	clustalw2-20080703-21064887.dnd
Your input file	clustalw2-20080703-21064887.input

To save a result file right-click the file link in the above table and choose 'Save Target As'
If you cannot see the JalView button, reload the page and check your browser settings to enable Java Applets

Scores Table

Sort by

SeqA Name	Len(nt)	SeqB Name	Len(nt)	Score
1 AF343573_BOHL	2904	2 AF343572_VR299	2904	98
1 AF343573_BOHL	2904	3 AFS37289_MEXICANA	1328	98
1 AF343573_BOHL	2904	4 AF342729_DANESA	2904	79
2 AF343572_VR299	2904	3 AFS37289_MEXICANA	1328	96
2 AF343572_VR299	2904	4 AF342729_DANESA	2904	79
3 AFS37289_MEXICANA	1328	4 AF342729_DANESA	2904	78

PLEASE NOTE: Some scores may be missing from the above table if the alignment was done using multiple CPU mode
Please check the output.

Sort by Sequence Number View Output File

Alignment

Hide Colors View Alignment File

CLUSTAL 2.0.8 multiple sequence alignment

```

AF343573_BUHL      ATGAGCACATCCRAGGCAACCGCAACTACTTGGATCCATTATGCTTCCCGAGAAATGGG 60
AF537289_MEXICANA -----
AF343572_VR299    ATGAGCACATCCRAGGCAACCGCAACTACTTGGATCCATTATGCTTCCCGAGAAATGGG 60
AF342729_DANESA   ATGAGCACAAACAAAGCAACCGCAACTACTTGGATCCATTATGCTTCCCGAGAAATGGG 60

AF343573_BUHL      CCAGCAAGCATTCCGGACGACATAACAGAGAGGCGATATCTAAAACAAGAGACTTCGTCA 120
AF537289_MEXICANA -----
AF343572_VR299    CCAGCAAGCATTCCGGACGACATAACAGAGAGGCGATATCTAAAACAAGAGACTTCGTCA 120
AF342729_DANESA   CCTCCAGCATTCCGGACGACATAACAGAGAGGCGACATCTAAAACAAGAGACTTCGTCC 120

AF343573_BUHL      TACAACCTAGAGGTCTCCGAATCAGGAAAGTGGGCTTCTTGTCTGCTTCCCTGGAGCTCT 180
AF537289_MEXICANA -----
AF343572_VR299    TACAACCTAGAGGTCTCCGAATCAGGAAAGTGGGCTTCTTGTCTGCTTCCCTGGAGCTCT 180
AF342729_DANESA   TACAACCTAGAGGTCTCCGAATCAGGAAAGTGGGCTTCTTGTCTGCTTCCCTGGAGCACT 180

AF343573_BUHL      GGATCCAGGCTGGTGGCCACTACAGGTGGAAATCTGAACCGAGCCGCACTAGAAATCGAC 240
AF537289_MEXICANA -----
AF343572_VR299    GGATCCAGGCTGGTGGCCACTACAGGTGGAAATCTGAACCGAGCCGCACTAGAAATCGAC 240
AF342729_DANESA   GGATCCAGGCTAGGTGCTCACTACAGATGGAAATCTGAACCGAGCCGCACTAGAAATCGAC 240

AF343573_BUHL      CAGTGGCTAGAGACTCAGAGGACTAAAGAGAGGCAITCAACTACGGGAGACTGATCTCA 300
AF537289_MEXICANA -----
AF343572_VR299    CAGTGGCTAGAGACTCAGAGGACTAAAGAGAGGCAITCAACTACGGGAGACTGATCTCA 300
AF342729_DANESA   CAGTGGCTGGAGACTCAGAGGACTGAAAGAGGCTTCAACTACGGGAGGCTGATATCC 300

AF343573_BUHL      CGGAAATACGACATCCAGAGCTCAACGCTTCCCGGCTGGTCTGTATGCATCCAGCGGACC 360
AF537289_MEXICANA -----
AF343572_VR299    CGGAAATACGACATCCAGAGCTCAACGCTTCCCGGCTGGTCTGTATGCATCCAGCGGACC 360
AF342729_DANESA   AGGAAATACGAGCTTCAAGAGCTCCAGGCTCCCGGCTGGGCTGTATGCATCCAGCGGACC 360

```

* * * * *

AF343573_BUHL	CTGAAAGTGGACGCTTGGAGGAAATCTCTTTGAAATAGASAGCCTAACCTACAAAGC	420
AF537289_MEXICANA	CTGAAAGTGGACGCTTGGAGGAAATCTCTTTGAAATAGASAGCCTAACCTACAAAGC	419
AF343572_VR299	CTGAAAGTGGACGCTTGGAGGAAATCTCTTTGAAATAGASAGCCTAACCTACAAAGC	420
AF342729_DANESA	ATCAACGGCCGACCTTTCGAAAGAAATCTTTCTGAGGTGGAGAGCCTGACCTATAACAGC	420
* * * * *		
AF343573_BUHL	TTGATGTCCCTAACAAACAAACCCACAGGACAGGTCAACAATCAACTAGTGAACAAAGGA	460
AF537289_MEXICANA	TTGATGTCCCTAACAAACAAACCCACAGGACAGGTCAACAATCAACTAGTGAACAAAGGA	469
AF343572_VR299	TTGATGTCCCTAACAAACAAACCCACAGGACAAAGTCAACAATCAACTAGTGAACAAAGGA	460
AF342729_DANESA	TTGATGTCTTGAACAACAAACCCACAGGACAAAGTCAACAATCAACTAGTGAACAAAGGA	460
* * * * *		
AF343573_BUHL	ATCAAGGCTCCTGAACTTACCAACTGGGTTTGAACAAGCCATACGTCCGCTAGAGGACGAG	540
AF537289_MEXICANA	ATCAAGGCTCCTGAACTTACCAACTGGGTTTGAACAAGCCATACGTCCGCTAGAGGACGAG	529
AF343572_VR299	ATCAAGGCTCCTGAACTTACCAACTGGGTTTGAACAAGCCATACGTCCGCTAGAGGACGAG	540
AF342729_DANESA	GTAAAGGCTCCTGAACTTACCAACTGGGTTTGAACAAGCCATACGTCCGCTAGAGGACGAG	540
* * * * *		
AF343573_BUHL	ACGCCACAGGCGCCCTCAGTCCATGAACGGAGCAAGGATGAGGTGCACAGCTGCCATGGCA	600
AF537289_MEXICANA	ACGCCACAGGCGCCCTCAGTCCATGAACGGAGCAAGGATGAGGTGCACAGCTGCCATGGCA	589
AF343572_VR299	ACGCCACAGGCGCCCTCAGTCCATGAACGGAGCAAGGATGAGGTGCACAGCTGCCATGGCA	600
AF342729_DANESA	ACGCCACAGGCTCCCTCAGTCCATGAACGGAGCAAGGATGAGGTGCACAGCTGCCATGGCA	600
* * * * *		
AF343573_BUHL	CCAGGAGGTATGAAATCGACTTCCCATCCGAAAGACTGCCGACCCGTGGCCGGACTGGG	660
AF537289_MEXICANA	CCAGGAGGTATGAAATCGACTTCCCATCCGAAAGACTGCCGACCCGTGGCCGGACTGGG	649
AF343572_VR299	CCAGGAGGTATGAAATCGACTTCCCATCCGAAAGACTGCCGACCCGTGGCCGGACTGGG	660
AF342729_DANESA	CCAGGAGGTATGAAATCGACTTCCCATCTGAGGACTACCAACCCGTGGCAGCACTGGG	660
* * * * *		
AF343573_BUHL	ACCCCAACACAAATCTATGAGGGGAATGCGGACATCTGAACTCCACAAAGTTACCGGG	720
AF537289_MEXICANA	ACCCCAACACAAATCTATGAGGGGAATGCGGACATCTGAACTCCACAAAGTTACCGGG	709
AF343572_VR299	ACCCCAACACAAATCTATGAGGGGAATGCGGACATCTGAACTCCACAAAGTTACCGGG	720
AF342729_DANESA	ACCCCAACACAAATCTATGAGGGGAATGCGGACATCTGAACTCCACAAAGTTACCGGG	720
* * * * *		
AF343573_BUHL	GACATAACATTCAGCTCGAGGCGGAAACCCGCCAATGAGACAGTGTTCGACTTCATTCTA	780
AF537289_MEXICANA	GACATAACATTCAGCTCGAGGCGGAAACCCGCCAATGAGACAGTGTTCGACTTCATTCTA	769
AF343572_VR299	GACATAACATTCAGCTCGAGGCGGAAACCCGCCAATGAGACAGTGTTCGACTTCATTCTA	780
AF342729_DANESA	GACATTAGCTTCAGCTTCGAAACAAACCCCAACCCGACACATCAAGTTCGACTTCAGCTG	780
* * * * *		
AF343573_BUHL	CAGTTCCTGGGGTGGACAAACAGTCCCGCTGGTTACCGTGACAACTCCAGCTAGTC	840
AF537289_MEXICANA	CAGTTCCTGGGGTGGACAAACAGTCCCGCTGGTTACCGTGACAACTCCAGCTAGTC	829
AF343572_VR299	CAGTTCCTGGGGTGGACAAACAGTCCCGCTGGTTACCGTGACAACTCCAGCTAGTC	840
AF342729_DANESA	CAGTTCCTGGGTCTGACAAACAGTCCCGCTGGTTACCGTGACAACTCCAGCTAGTC	840

Genotipificación del Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV) que afecta a la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en la zona Central de México

AF343573_BUHL	ACAGTGGAAACACACAGGAGGGGGTCAGCCAAAGTTCACCCAGTCAATCCDRAACAGAAACG	900
AF537289_MEXICANA	ACAGTGGAAACACACAGGAGGGGGTCAGCCAAAGTTCACCCAGTCAATCCDRAACAGAAATG	589
AF343572_VR299	ACAGCGGACAACTACAGGGGGGGTCAGCCAAAGTTCACCCAGTCAATCCDRAACAGAAATG	900
AF342729_DANESA	AACGACAGAACTACAGAGGGGGTCAGCCAAAGTTCACCCAGTCAATCCDRAACAGAAAC	900
<p>1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50</p>		
AF343573_BUHL	ATCACCAACCAATCACACGGGTCAAGCTGGGCTACAGCTCAACCCAGCGAGCCGATATT	960
AF537289_MEXICANA	ATTACTAAACCAATTACACGGGTCAAGCTGGGCTACAGCTCAACCCAGCGAGCCGATATT	649
AF343572_VR299	ATTACCAACCAATCACACGGGTCAAGCTGGGCTACAGCTCAACCCAGCGAGCCGATATT	960
AF342729_DANESA	ATCACGAGGCGCATCACAGAGTCAAGCTGTCTACAAAGTCAACCCAGCGAGCCGATATT	960
<p>51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100</p>		
AF343573_BUHL	GCACACCGCAGCAACGCTGGAGCCAAATGGGCCGGCATCAGTCTCATTCTCATCCGGGAAAC	1020
AF537289_MEXICANA	GCACACCGCAGCAACGCTGGAGCCAAATGGGCCGGCATCAGTCTCATTCTCCTCCGGGAAAC	709
AF343572_VR299	GCACACCGCAGCAACGCTGGAGCCAAATGGGCCGGCATCAGTCTCATTCTCATCCGGGAAAC	1020
AF342729_DANESA	GCACACCGCAGCAACGCTGGAGCCAAATGGGCCGGCATCAGTCTCATTCTCCTCCGGGAAAC	1020
<p>101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150</p>		
AF343573_BUHL	GGCAATGTGGCGGGAGTCCACGACCCATAACCGTATGGGCTACGAGAGATGACCCCC	1080
AF537289_MEXICANA	GGCAATGTGGCGGGAGTCCACGACCCATAACCGTATGGGCTACGAGAGATGACCCCC	769
AF343572_VR299	GGCAATGTGGCGGGAGTCCACGACCCATAACCGTATGGGCTACGAGAGATGACCCCC	1080
AF342729_DANESA	GGCAATGTGGCGGGAGTCCACGACCCATAACCGTATGGGCTACGAGAGATGACCCCC	1080
<p>151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200</p>		
AF343573_BUHL	CAGTCAATCTGACCCGTGGCTGGGCTATCCAACTATGAGCTGATCCCAAACCCAGACCTA	1140
AF537289_MEXICANA	CAGTCAATCTGACCCGTGGCTGGGCTATCCAACTATGAGCTGATCCCAAACCCAGACCTA	829
AF343572_VR299	CAGTCAATCTGACCCGTGGCTGGGCTATCCAACTATGAGCTGATCCCAAACCCAGACCTA	1140
AF342729_DANESA	CAGTCAATCTGACCCGTGGCTGGGCTATCCAACTATGAGCTGATCCCAAACCCAGACTC	1140
<p>201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250</p>		
AF343573_BUHL	TTGAAAGACATGGTCACTAAGTATGGAAAGTACGACCCGTGAGGGGCTCAACTATGCCAAG	1200
AF537289_MEXICANA	TTGAAAGACATGGTCACTAAGTATGGAAAGTACGACCCGTGAGGGGCTCAACTATGCCAAG	889
AF343572_VR299	TTGAAAGACATGGTCACTAAGTATGGAAAGTATGACCCGTGAGGGGCTCAACTATGCCAAG	1200
AF342729_DANESA	TTGAAAGACATGGTCACTAAGTATGGAAAGTATGACCCGTGAGGGGCTCAACTATGCCAAG	1200
<p>251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300</p>		
AF343573_BUHL	ATGATCTTGTCTACAGAGAGAGCTGGACATCAGAACCGTCTGGAGGACTGAGGAAATAC	1260
AF537289_MEXICANA	ATGATCTTGTCTACAGAGAGAGCTGGACATCAGAACCGTCTGGAGGACTGAGGAAATAC	949
AF343572_VR299	ATGATCTTGTCTACAGAGAGAGCTGGACATCAGAACCGTCTGGAGGACTGAGGAAATAC	1260
AF342729_DANESA	ATGATCTTGTCTACAGAGAGAGCTGGACATCAGAACCGTCTGGAGGACTGAGGAAATAC	1260
<p>301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350</p>		
AF343573_BUHL	AAAGAAAGGACAGAGGATTCAGAGGATCACCGACTCCAAAGTACCTAAGCTCA	1320
AF537289_MEXICANA	AAAGAAAGGACAGAGGATTCAGAGGATCACCGACTCCAAAGTACCTAAGCTCA	1509
AF343572_VR299	AAAGAAAGGACAGAGGATTCAGAGGATCACCGACTCCAAAGTACCTAAGCTCA	1320
AF342729_DANESA	AAAGAAAGGACAGAGGATTCAGAGGATCACCGACTCCAAAGTACCTAAGCTCA	1320
<p>351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400</p>		

AF343573_BUHL	AAGGCATGGGGAATGAGGGAATGATGATGAGGCAATGAGAAAGTGGCGGCCCCGCTGCTG	1380
AF537289_MEXICANA	AAGGCATGGGGAATGAGGGAATGATGATGAGGCAATGAGAAAGTGGCGGCCCCGCTGCTG	1069
AF343572_VR299	AAGGCATGGGGAATGAGGGAATGATGATGAGGCAATGAGAAAGTGGCGGCCCCGCTGCTG	1380
AF342729_DANESA	AAGGCATGGGGAATGAGGGAATGATGATGAGGCAATGAGAAAGTGGCGGCCCCGCTGCTG	1380

AF343573_BUHL	TCAACGCTCTTCCCAIAGGCGCTCCCTTATAGGAGCGCGCAACCAATTCATTGGGGAC	1440
AF537289_MEXICANA	TCAACGCTCTTCCCAIAGGCGCTCCCTTATAGGAGCGCGCAACCAATTCATTGGGGAC	1129
AF343572_VR299	TCAACGCTCTTCCCAIAGGCGCTCCCTTATAGGAGCTGCCGCAACCAATTCATTGGGGAC	1440
AF342729_DANESA	TCAACGCTCTTCCCAIAGGCGCAACCAATTCATTGGAGTGGCAGCAACCAATTCATTGGAGAT	1440

AF343573_BUHL	CTCACAGGACCAACTCAGCCGGGGAGGCTACCTGTACACGCGCAGCCGGAGGCGGTAC	1500
AF537289_MEXICANA	CTCACAGGACCAACTCAGCCGGGGAGGCTACCTGTACACGCGCAGCCGGAGGCGGTAC	1189
AF343572_VR299	CTCACAGGACCAACTCAGCCGGGGAGGCTACCTGTACACGCGCAGCCGGAGGCGGTAC	1500
AF342729_DANESA	CTCACAGGACCAACTCAGCCGGGGAGGCTACCTGTACACGCGCAGCCGGAGGCGGTAC	1500

AF343573_BUHL	CATGATGTGATGGACTCATGGCCAGCGG-STCCGAGGCGAGGAGTACTCAGAGCACT	1559
AF537289_MEXICANA	CATGATGTGATGGACTCATGGCCAGCGG-STCCGAGGCGAGGAGTACTCAGAGCACT	1248
AF343572_VR299	CATGATGTGATGGACTCATGGCCAGCGG-STCCGAGGCGAGGAGTACTCAGAGCACT	1559
AF342729_DANESA	AAGGATGTGATGGACTCATGGCCAGCGG-STCCGAGGCGAGGAGTACTCAGAGCACT	1559

AF343573_BUHL	CAAGACCCGCTTGAGTCCACCACTATGAGGAAGTGGAGCTTCCAAAGCCACAAAGG	1619
AF537289_MEXICANA	CAAGACCCGCTTGAGTCCACCACTATGAGGAAGTGGAGCTTCCAAAGCCACAAAGG	1308
AF343572_VR299	CAAGACCCGCTTGAGTCCCACTAATATGAGGAAGTGGAGCTTCCAAAGCCACAAAGG	1619
AF342729_DANESA	AAAGAACAGACTGGAGTCTGCCAATACGAGGAAGTGGAGCTTCCAAAGCCACAAAGG	1619

AF343573_BUHL	AATCATTTTCTGTGGTGCACACCGTTGASAGTGCACAGGTGAGGCTTGGGGTGGCT	1679
AF537289_MEXICANA	AATCATTTTCTGTGGTGCACACCGTTGASAGTGCACAGGTGAGGCTTGGGGTGGCT	1328
AF343572_VR299	AATCATTTTCTGTGGTGCACACCGTTGASAGTGCACAGGTGAGGCTTGGGGTGGCT	1679
AF342729_DANESA	AATCATTTTCTGTGGTGCACACCGTTGASAGTGCACAGGTGAGGCTTGGGGTGGCT	1679

Figura 3. Alineamiento múltiple de 4 cepas del IPNV. Fuente CLUSTAL W.

XIV. 5. Detección del IPNV con primers universales utilizando la técnica de RT-PCR en dos pasos y en un paso

Para la determinación del IPNV fue necesario estandarizar la prueba de RT-PCR en dos pasos, se utilizaron controles, uno positivo y uno negativo, que se refiere a una muestra de tejido en la que se detectó y otra en la que no a través de la prueba de ELISA.

El primer paso fue la estandarización del proceso de extracción de RNA de tejido fresco a partir de bazo y riñón de trucha arco iris. La obtención del ácido ribonucleico que se obtuvo se analizó en un gel de agarosa al 1.0 %, en donde se observaron los dos genes ribosomales 18 y 28S. La pureza del RNA, se obtuvo a partir de la relación de absorbancia 260/280 obteniéndose resultados de 1.7 a 2.0, lo que indica muestras libres de contaminantes orgánicos como proteínas o DNA, la concentración de RNA oscilo de 1.3 a 5.2 µg/mL, por lo que se determino de buena calidad (Figura 4).

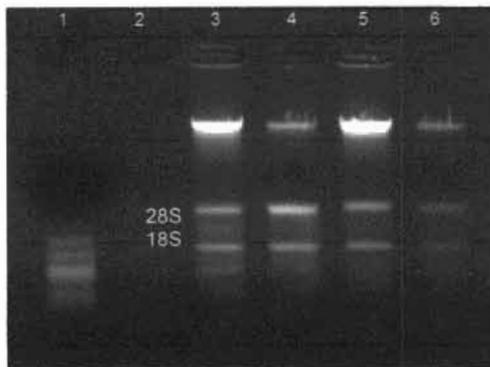


Figura 4. RNA obtenido del pool de tejido de bazo y riñón de trucha arco iris. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1. Marcador de peso molecular de RNA (Invitrogen) Carriles 3 al 6 muestras de RNA de tejido.

Una vez que se obtuvo una concentración adecuada de RNA de buena calidad se realizó la síntesis de la cadena complementaria de DNA (cDNA), el resultado se presenta en la figura 5, donde se observan fragmentos de DNA cuyo tamaño aproximado de 9 kb.

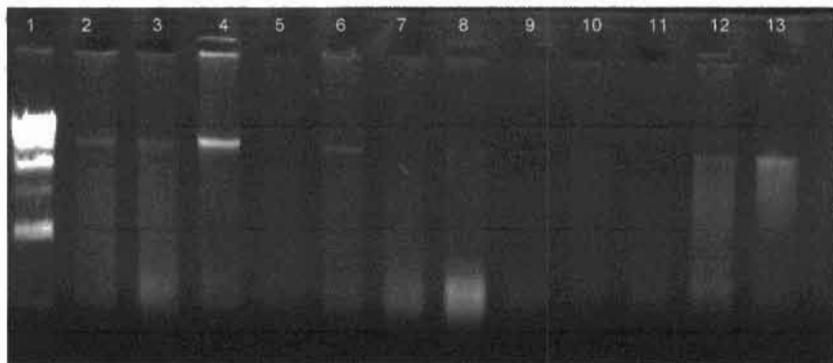


Figura 5. Cadena complementaria de DNA (cDNA). Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1. Marcador de peso molecular Hind III (Promega). Carriles 2 al 13 muestras de cDNA.

Cuando ya se tenía la cadena complementaria de DNA se realizó la PCR para la detección del IPNV utilizando los primers universales. En la figura 6 se observa la amplificación de un fragmento de 524 pb, como lo refiere Lee *et al.*, 1994. Sin embargo, en el proceso también se amplificaron otros fragmentos de diferente tamaño que van de 274 a 100 pb.



Figura 6. Detección del IPNV por la técnica de RT-PCR en dos pasos. Electroforesis de los productos de la PCR en un gel de agarosa al 2%. Carril 1. Marcador de peso molecular 100 pb (Promega). Carriles 2 al 10 muestras de cDNA. carril 11 y 12 control positivo y carril 13 control negativo.

Por otro lado, también se realizó la estandarización de la RT-PCR en un solo paso con los primers universales, a partir de muestras de tejido conservado en congelación a -20 por un periodo de 3 años. Cabe señalar que en estas muestras ya se había detectado la presencia de IPNV por la técnica de RT-PCR en dos pasos. Los resultados obtenidos con estas muestras son los siguientes:

En la figura 7 se presenta un gel de agarosa al 1.0 % donde se muestra la calidad del RNA obtenido de las muestras, se observa degradación del RNA y los genes ribosomales 18S y 28S no se ven de manera adecuada debido al barrido que se presenta no solo en las muestras sino también en los controles.

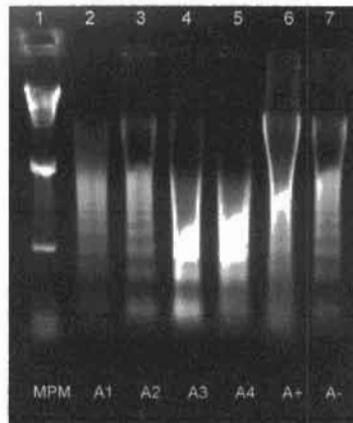


Figura 7. Obtención de RNA a partir de tejido congelado. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1. Marcador de peso molecular Hind III (Promega). Carriles 2 al 7 muestras de RNA.

La pureza del RNA de las muestras se obtuvo de la relación de absorbancia de 260/280 dando un resultado de 1.9 a 2.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La concentración obtenida fue de 1.8 a 4.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, concentración que permitió la realización de la Técnica de RT-PCR en un paso.

El resultado de la detección del IPNV por RT-PCR en un solo paso se observa en la figura 8, donde se detectaron dos fragmentos cuyos tamaños corresponden a 524 y 274 pb.

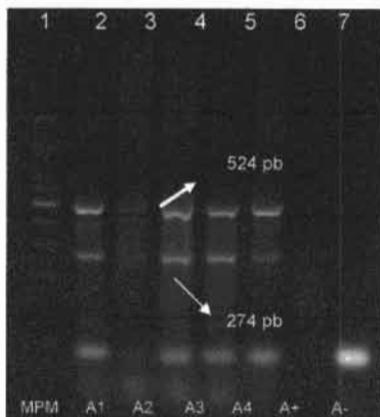


Figura 8. Detección del IPNV por medio de RT-PCR en un paso. Electroforesis en un gel de agarosa al 2%. Carril 1. Marcador de peso molecular 100 pb (Promega). Carriles 2 al 5 muestras, carril 6 control positivo, carril 7 control negativo y carril 8 Blanco.

XIV. 5. 1. Detección del IPNV en muestras procedentes de granjas trutícolas de los Estados de Hidalgo y Puebla

A partir de la estandarización de la RT-PCR con primers universales se realizó la detección de IPNV en muestras de tejido procedentes de granjas trutícolas de los Estados de Puebla e Hidalgo.

En el Estado de Hidalgo, se analizaron 44 muestras de crías procedentes de 22 granjas trutícolas, detectándose la presencia de IPNV por RT-PCR en 19 muestras (Tabla 4).

El porcentaje de granjas infectadas con IPNV en el Estado de Hidalgo fue de 68.8 %.

Tabla 4. Detección de IPNV en granjas trutícolas del Estado de Hidalgo

Granja	PCR	
	Muestra 1	Muestra 2
1	-	+
2	-	-
3	+	+
4	-	+
5	+	+
6	+	-
7	-	-
8	+	+
9	+	-
10	-	+
11	-	-
12	-	-
13	+	-
14	-	-
15	+	-
16	+	+
17	+	+
18	+	-
19	-	-
20	-	+
21	-	-
22	-	-

En el Estado de Puebla se analizaron 78 muestras de crías procedentes de 39 granjas trutícolas, en las cuales en 35 se detectó la presencia de IPNV. En la tabla 5 se presentan los resultados de las muestras analizadas por la técnica de RT-PCR.

El porcentaje de granjas infectadas con IPNV para el Estado de Puebla fue del 56.4 %.

Tabla 5. Detección de IPNV en granjas trutícolas del Estado de Puebla.

Granja	PCR	
	Muestra 1	Muestra 2
1	-	-
2	+	+
3	-	+
4	+	+
5	+	+
6	-	-
7	-	-
8	-	-
9	-	+
10	+	+
11	+	+
12	+	+
13	+	+
14	-	-
15	-	+
16	-	-
17	-	-
18	-	-
19	-	-
20	-	+
21	-	-
22	-	-
23	-	-
24	-	+
25	+	+
26	+	+
27	+	+
28	-	+
29	+	-
30	-	-
31	-	-
32	-	-
33	-	-
34	-	+
35	-	-
36	+	+
37	+	-
38	+	+
39	+	+

XIV. 6. Diseño de Oligonucleótidos para los Genogrupos I y II

Los resultados sobre el diseño de oligonucleótidos para identificar las cepas que se agrupan en el Genogrupo I y el otro para identificar las cepas del Genogrupo II, se presentan a continuación.

Para el Genogrupo I el par de primers van de la posición 868 a la 1020 del genoma de IPNV de la cepa VR299 y amplificaron un fragmento de 153 pb que codificó para la proteína VP2.

1021 ggcaatgtgccgggggtcctaagaccataaacctagtggcgtacgagaagatgaccccc
1081 cagtcaatcctgaccgtggctggcgtatccaactatgagctgatcccaaaccagaccta
1141 ctgaagaacatggtcaccagatggaagatgaccctgagggcctcaactatgccaag
1201 atgatcctgtcccacagagaggagctggacattagaaccgtctggaggactgaggaatac
1261 aaagaaggacaagagcattcaagagatcactgactcacaagtgacctaccaacctca
1321 aaggcatggggatggagggacctggtcagaggcatcagaaaagtgccgccccgtgctg
1381 tcaacgtcttcccaatggcggctccccttataggagctgccaccaattcattggggac
1441 ctaccaagaccaactcagccggggacgctacctgtcacacgcagccggaggccgctac
1501 catgatgtcatggactatggccagcgggtcagaggcaggaagctattcaagcacctc
1561 aagacccggctgagtcacaataactatgaggaagtggagcttcaaagccaacaaggga
1621 gtcatcttctgtggtgcacaccgtgagagtgaccaggtagggccttcgggtcgtc
1681 gtggtaglaataccaggagcgtaccggaaacttctgacccaaccaacaggctctatcc
1741 tactcaagaacgacacaggctgcttggggataggagaagacatccccttgaagga
1801 gatgacatgtctacaccgactgcccctcaaggagatcaagaggaacggaacatcgtg
1861 gtggagaaaaatctcgctggccccgtgatgggaccgtctccaactgcactgtccctg
1921 ctctcaacgacatagacgaaggaltccaaggatggtcttcacagggcagattgccgat
1981 gacgaagaacagatcaccatctgagggtgacatcaagccatagccgccatgaa
2041 cacgggctgccccctcattggctgtcagccaggggtcagcagatggggcacaacacatct
2101 ctgcacacacctgattcagagcggggccctaccagtgcaaaagcacagggcgcctgc
2161 aggagatcaaglacctggccagctgatgagaacaactgcacaggatggagcagaa
2221 ctgcaggggctgtcagggccacatggccagagcaaaagaagtgaaggacgccgaagtg
2281 ttcaaaactctgaaactatgtcatggacaagaagaacgacctcacagatcacatgtat
2341 gagtggcacaaggaggatcctgatgcaatcaaatggcaggctcgtcagcaccoccca
2401 aaacaccgagagaagccaaaaggacctgaccagcacaccgccaggaggcaaggccacc
2461 aggalctactggcggcgtcaaagccggcgcagactttgcctcccagagtgatcacg
2521 gagaacaactaccgggtccatctccaggccagttcaagtactacatgataacgggcaga
2581 gtccaaaccccgagaagagtagcaggactatgtgcgaaaaccgataaccgaccaacc
2641 gacatggacaaaatcagacgcctagccaacagtgctctacggcctgcccaccaagaacc


```
961 gccaccagccaccctggggacactaggtccagctcgtctcttttctcagaaa
1021 ggcaatgccccgggtcctgagaccatcacactgggctatgagaaaatgacacc
1081 cagtccatcctaactgtagctggaggtccaactacgagctgatcccaaccagaact
1141 ttgaagaacatggtagacacgctatggcaagtalgaccccgaagggctcaactatgccaag
1201 atgatcctgtcccacagggaggagctggacataaggacgtctggaagactgaggagtac
1261 aaggagcggacaagagcttcaacgagatcaccgacttctccagtacctgccacgtca
1321 aaggcatggggctggaggacatagtcagagggatccggaagtcgcccagctactg
1381 tcaacgctgttccgtaggcagcaccactcaltggagtgccagaccaactcatcggagat
1441 ctaccaacaccaacgcagcagggcgaaggtaccgctccatggccgagggagcgtac
1501 aaggatglaatggactcctggccagcggcggaccgcaggaagttctccaggtcta
1561 aagaacagactggagctgccaactacaggaagtcgagcttctccccctcaaagga
1621 gtcatgtccctgggtgcacactgtccagagtcaccaggtgaagcaltcggctccctg
1681 gcgataatcatccagggcagtalcccgaactcttgatccaaccagcaggtcctgtcc
1741 cacttcgcaaacgacaccggatgcgtgtggggcataggagaggacatacccttgaagga
1801 gacgacatgtctacaccgactccctctgaaagagatcaagccgaacgggaacatcata
1861 gttgaaaaatcttctgctggccaaltatggggccatcagctcagctaggactgtccctg
1921 ctctgtaacagcattgaagaggggtccaaggatggtattcaccggcgagatcggcgt
1981 gatgaagagacaatcataccaatctcgggggtggacatcaaagcaatcgagccatgaa
2041 caagggctcctctatcggctgtcagccaggggtggacgaggaggtgagcaacacctcc
2101 ctggccgcacacctgatcaaaccgggaccctaccagttcagaaaagcaaaagggccaac
2161 aagaggatcaagctacctgggtgagctgatgtcatcaatcgcacagggatggacgaggag
2221 ctgcaacgctcctgagcgcacaatggcagggcgaagaagtaaatgagcggagatc
2281 ttcaaaacttcaaagctaatgtcatggaccagaaagaacgacctcaccgaccacatgttc
2341 gagtggtaaaaagaggaccctgacgcgatcaagttcggacggctgatcagcacgccccca
2401 aagcaccagagaagccaaaaggaccaaacagcatgccgccaagaggcgagagccgtt
2461 cgcatctcactggacgccgtgagagcaggagcggaaatcgccacaccggagtgggtcgcg
2521 acgaacgactatcgggccatcccagggcagttcaagtactacctgattacgggtcgc
```

```
2581 acaccagacccgaalgatgggtacgaggactacatcaaacagaccataacaaaaccgacc
2641 gacatgaacaaaaatcagacgtctagccaacagtggtacggcctccgcaccaggaacca
2701 gccccgaagagttctacgacgcagttgcagctgtgttcgacacaacgatggaagaggt
2761 ccagaccaagatcaaatgcaagacctcaggagctcgcaagacgaatgaaacgacgaccc
2821 cggactgccgaagcaccacggcgaaccagagcaccagcggaaccggcaccgcagcgcagc
2881 tccaggttcaccccccgaggaa
```

XIV.7. Detección de los genotipos de IPNV

Una vez verificada la presencia de IPNV con primers universales, se seleccionaron las muestras para ser evaluadas con relación a los primers diseñados para el genogrupo I y II que sugieren el posible origen del IPNV en México.

XIV.7.1. Detección del IPNV con oligonucleótidos para Genogrupo I

Se analizaron 8 muestras procedentes de 8 granjas del Estado de Hidalgo, 4 de ellas amplificaron el fragmento esperado de 153 pb (Figura 9). Sin embargo, se amplificaron otros fragmentos de diferente tamaño que van desde los 600 pb hasta el fragmento deseado.

En la reacción se incluyó un control positivo es decir una muestra que amplificó con los primers universales, un control negativo que correspondió a una muestra en la que no se ha detectado el IPNV y un blanco de reacción que incluye todos los componentes de la reacción excepto DNA.

Los resultados obtenidos sugieren que estas 4 muestras pertenecen al genogrupo I, las 4 restantes no amplificaron con estos oligonucleótidos, por lo que puede asumirse que pertenecen a otro genogrupo.

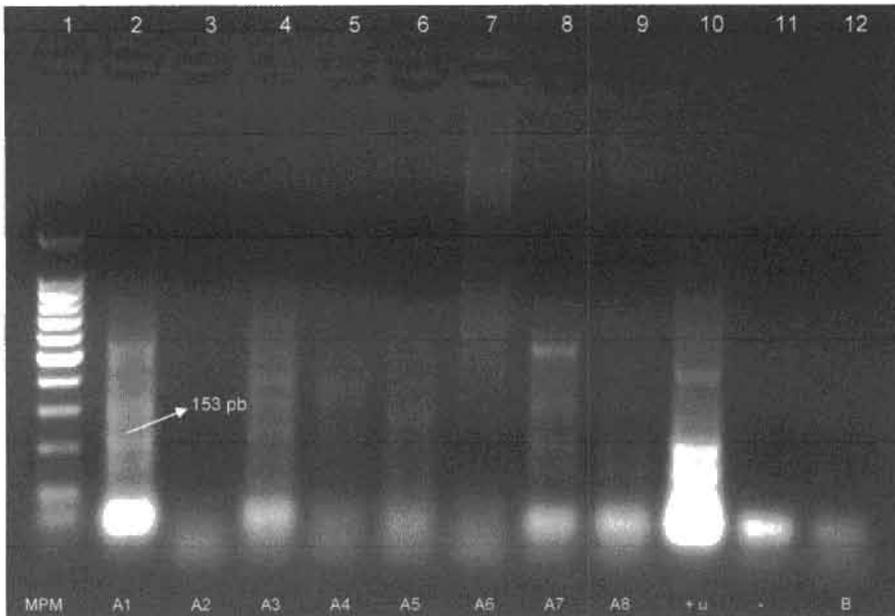


Figura 9. Detección del IPNV en muestras del Estado de Hidalgo para Genogrupo I por medio de RT-PCR en dos pasos. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Carril 1. Marcador de peso molecular 100 pb (Promega). Carriles 2 al 9 muestras, carril 10 control positivo, carril 11 control negativo y carril 12 Blanco.

Para el Estado de Puebla se analizaron 10 muestras procedentes de 10 granjas, 3 de ellas amplificaron el fragmento de 153 pb (Figura 10), que corresponde al genogrupo I, sin embargo, también amplificaron otros fragmentos de diferente tamaño que van desde los 600 pb hasta el fragmento deseado.

De igual manera, estos resultados sugieren se puede mencionar que estas 3 muestras pertenecen al genogrupo I del IPNV. Las muestras restantes no amplificaron con estos oligonucleótidos por lo que puede asumirse que pertenecen a otro genogrupo.

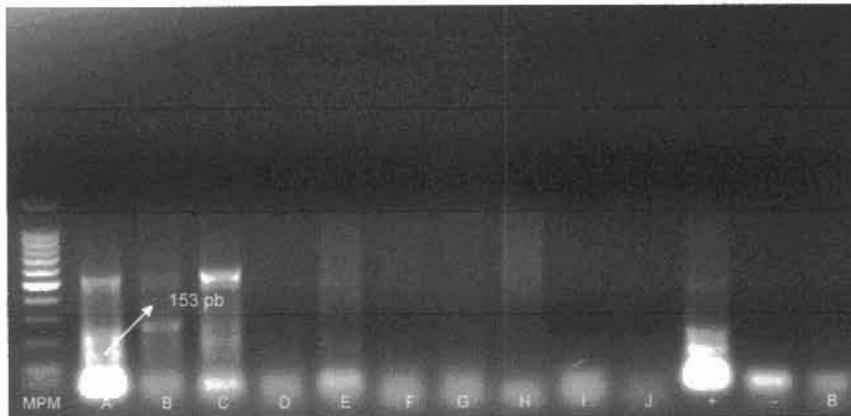


Figura 10. Detección del IPNV en muestras del Estado de Puebla para el Genogrupo I por medio de RT-PCR en dos pasos. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Carril 1. Marcador de peso molecular 100 pb (Promega). Carriles 2 al 11 muestras, carril 12 control positivo, carril 13 control negativo y carril 14 Blanco.

XIV. 7. 2. Detección del IPNV con oligonucleótidos para Genogrupo II

Se utilizaron 8 muestras del Estado de Hidalgo que dieron positivas al IPNV con los primers universales y se amplificaron mediante RT-PCR con los oligonucleótidos para el genogrupo II.

De las 8 muestras del Estado de Hidalgo, se encontró que solo una de ellas amplificó un fragmento de 456 pb, tamaño estimado con el uso de estos oligonucleótidos (Figura 11). en la reacción se incluyó como control positivo una muestra en la que se detectó el IPNV mediante la RT-PCR en dos pasos, esta muestra no amplificó con los oligonucleótidos del genogrupo II, por lo que esta muestra no pertenece a este genogrupo; un control negativo que correspondió a una muestra en la que no se ha detectado el IPNV y un blanco de reacción que incluye todos los componentes de la reacción excepto muestra.

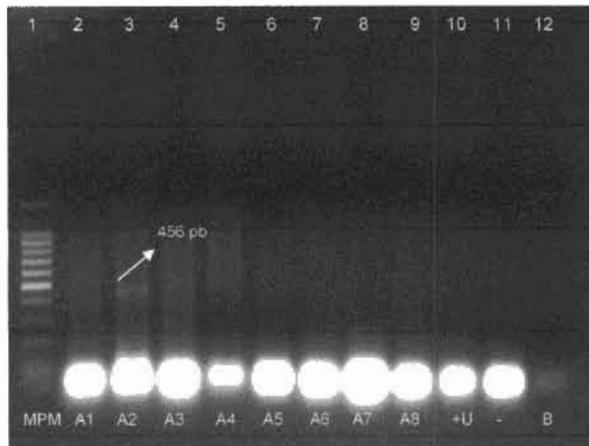


Figura 11. Detección del IPNV en muestras del Estado de Hidalgo para Genogrupo II por medio de RT-PCR en dos pasos. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Carril 1. Marcador de peso molecular 100 pb (Promega). Carriles 2 al 9 muestras, carril 10 control positivo, carril 11 control negativo y carril 12 Blanco.

Para el Estado de Puebla, se analizaron 10 muestras, solo una muestra amplificó un fragmento de 456 pb (Figura 12). En esta prueba se incluyó la muestra A2 del Estado de Hidalgo que había amplificado con estos oligonucleotidos (Figura 11), un control negativo que correspondió a una muestra en la que nunca se ha detectado el IPNV y un blanco de reacción, por lo que se estableció como una muestra positiva al genogrupo II.

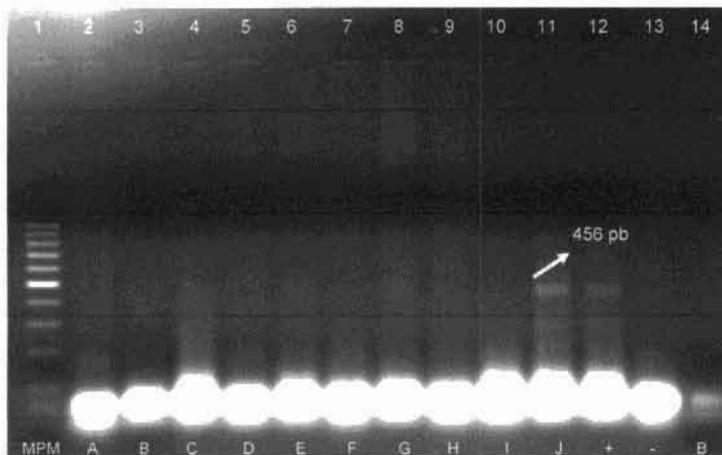


Figura 12. Detección del IPNV en muestras del Estado de Puebla para Genogrupo II por medio de RT-PCR en dos pasos. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Carril 1. Marcador de peso molecular 100 pb (Promega). Carriles 2 al 11 muestras, carril 12 control positivo, carril 13 control negativo y carril 14 Blanco.

XIV.8. Purificación de amplificadores

Con la finalidad de comprobar que los amplicones encontrados para los genogrupos pertenecen al IPNV se purificaron las bandas.

Para la confirmación del IPNV detectado con los primers universales por la RT-PCR en uno y dos pasos se purificaron dos fragmentos de DNA, uno de 524 pb y el otro de 280 pb (Figura 13).

Para la confirmación de la detección del IPNV del genogrupo II se purificó el fragmento de 456 pb.



Figura 13. Amplicones de IPNV purificados para la secuenciación. Carril 1. Marcador de peso molecular Hind III (Promega). Carril 2 fragmento de IPNV de 524 pb (RT-PCR en un paso), carril 3 fragmento inespecífico de 280 pb (RT-PCR en un paso), carril 4 fragmento de IPNV de 524 pb (RT-PCR en dos pasos), carril 5 fragmento inespecífico de 280 pb (RT-PCR en dos pasos) y carril 6 fragmento de IPNV de 456 pb correspondiente a genogrupo II.

XIV.9. Secuenciación

Las muestras del IPNV que se enviaron para el proceso de secuenciación, no dieron resultados que se pudieran analizar ya que no se identificaron los nucleótidos específicos.

XIV. 10. Relación que existe entre el genogrupo y el origen geográfico de los organismos

Los resultados encontrados respecto a la relación que existe entre el genogrupo y el origen geográfico de los organismos, es que si se relacionan ya que algunas de las granjas analizadas los organismos procedían de Estados Unidos y en efecto se detectó el genotipo de ese país.

Para el caso de las muestras de Hidalgo que amplificaron en el genogrupo I el origen de los organismos de 2 de granjas correspondía a Estados Unidos, y las otras 2 granjas los organismos su origen era Nacional.

En lo que se refiere al genogrupo II solo una muestra amplificó, sin embargo, el origen de los organismos no fue de Dinamarca si no Estados Unidos.

Para el Estado de Puebla se encontró que solo una muestra amplificó para el genogrupo I, el origen de los organismos era de Estados Unidos, las otras 2 muestras de las granjas los organismos eran de origen Nacional.

En lo que se refiere al genogrupo II solo una muestra amplificó para este genogrupo, sin embargo, el origen de los organismos era Nacional.

En la tabla 6 se presenta el origen de los organismos de las granjas analizadas y el resultado de las muestras de las granjas de Hidalgo y Puebla, que amplificaron para el genogrupo I y II.

Tabla 6. Genogrupos detectados en granjas acuícolas del Estado de Hidalgo y la relación con su procedencia

HIDALGO				
No. Control Granja	Origen de las crías	Primers universales	Genogrupo I	Genogrupo II
3	Nacional	*	*	
5	Estados Unidos	*		*
6	Estados Unidos	*	*	
8	Nacional	*		
9	Nacional	*		
16	Estados Unidos	*		
17	Nacional	*	*	
18	Estados Unidos	*	*	
PUEBLA				
2	Nacional	*	*	
3	Estados Unidos	*	*	
4	Nacional	*	*	
5	Estados Unidos	*		
9	Se desconoce	*		
24	Nacional	*		
26	Nacional	*		
27	Nacional	*		
36	Nacional	*		
39	Nacional	*		*

De acuerdo a lo antes mencionado, se encontró que si existe una relación entre el genogrupo y el origen geográfico de los organismos. Sin embargo, la existencia de estos dos genogrupos se puede explicar también con base a los resultados que se encontraron del análisis realizado en el Sistema de Información del PRONALSA, donde se reportó que en el año 2002, Hidalgo importó huevo oculado de Estados Unidos y el Estado de México importó de Estados Unidos y Dinamarca, donde ambas importaciones dieron resultados positivos a la presencia del IPNV.

Cabe señalar que en 2002, los organismos de importación fueron distribuidos a algunos Estados de la República. En la tabla 8 se presenta la información de comercio nacional y regional del huevo oculado procedente de las importaciones.

Tabla 8. Comercio nacional y regional de huevo oculado procedente de importación en 2002.

Pais de Importación	Estado que Vende	Estado q compra
E.U.	Edo. de México	Hidalgo
E.U.	Hidalgo	Hidalgo
Chile	Edo. de México	Morelos
Dinamarca	Edo. de México	Durango
E.U.	Edo. de México	Edo. de México
E.U.	Edo. de México	Michoacán
Se desconoce	Puebla	Hidalgo

Con los resultados antes mencionados se puede afirmar que no existe un control en cuanto al intercambio comercial de huevo oculado que existe entre productores de trucha arco iris, por lo que es muy posible que las cepas de los genotipos del IPNV se diseminen de un lugar a otro.

XV. DISCUSIÓN

A partir del trabajo de Nishizawa *et al.*, (2005), que mostró que actualmente los diferentes genotipos de IPNV en el mundo se han agrupado en siete genogrupos, todos pertenecientes al serogrupo A de los *Aquabimavirus*. Al respecto Blake *et al.*, 2001, Blake *et al.*, 1995, Ahne *et al.*, 2003, Ruane *et al.*, 2007 y Rodríguez *et al.*, 2003 mencionan que la mayoría de los *Aquabimavirus* sin considerar las especies hospederas o el origen geográfico están relacionados genéticamente y forman un grupo mayor.

Cabe señalar que la caracterización de los siete genogrupos esta muy relacionada con las características genéticas de los *Aquabimavirus* pero sobre todo porque se han aislado dentro de la misma región geográfica. Para el caso del Continente Americano, en particular en Estados Unidos los aislados de IPNV pertenecen al genogrupo I.

Por la cercanía geográfica que tiene este país con México y aunado a esto el comercio internacional de huevo oculado que se lleva a cabo con este país y con países europeos, se introdujo el IPNV, lo que sugiere que pertenece a este genogrupo. De acuerdo a la información del Sistema de Información del PRONALSA, en el cual no solo se registró cuando se realizaron las importaciones si no también la procedencia de estas, coincide que es a partir de que se tiene conocimiento de las diversas importaciones, comienzan a surgir problemas sanitarios graves como la detección del IPNV.

Sin embargo, en un principio estos problemas sanitarios parecieron estar presentes solo en una pequeña región de México constituida por los Estados de México, Puebla e Hidalgo, pero al no existir límites comerciales regionalmente la dispersión del virus creció detectándose un número mayor de casos positivos.

Pero no solo para México las importaciones representan un peligro con la introducción de patógenos no deseados sino también en países europeos, como lo menciona Ruane, *et al.*, 2007 que en Irlanda se detecta al IPNV a partir de importaciones de Escocia.

En México, la información que se tiene es que la mayoría de las importaciones provino de Estados Unidos. En lo que se refiere a Estados Unidos de acuerdo con Blake *et al.*, 2001 el mayor número de aislados corresponden a las cepas Wex Buxton, VR-299 y Búhl, esta última cepa con gran importancia en México. Ortega *et al.*, 2002 mostró que un virus de IPN aislado en México presenta una similitud del 95% con esta cepa. Sin embargo, en este estudio al revisar la secuencia genómica de estas cepas y la VR-299 no parecen mostrar gran variabilidad genética, lo cual coincide con lo reportado por Blake *et al.*, 1995 quién menciona que las cepas Wex Buxton, VR-299 y Buhl no presentan variabilidad genética.

Por otro lado, en este estudio el identificar las importaciones supuso la existencia de más de un genogrupo de IPNV, en el caso de Dinamarca de acuerdo a lo señalado por Nishizawa *et al.*, 2005, la cepa mayormente detectada es la Ab (Abild), razón por la cual también fue evaluada mostrando diferencias respecto a los genomas de las cepas americanas.

Uno de los aspectos importantes de este estudio fue la identificación de regiones variables de la proteína VP2, lo que permitió el diseño de secuencias específicas (oligonucleótidos) para diferenciar regiones del genogrupo I y II.

Para poder identificar a los genogrupos primero se estandarizó la técnica de RT-PCR para la detección del IPNV con primers universales propuestos por Lee *et al.*, 1994 los cuales amplificaron un fragmento viral de 524 pb. Sin embargo, también se presentó la amplificación de otros fragmentos inespecíficos, lo cual coincidió con los resultados de dichos autores donde en sus imágenes de los geles se observan algunas amplificaciones inespecíficas.

En este estudio se desarrollaron varios protocolos que condujeran a la eliminación de dichos amplificadores inespecíficos, estos protocolos fueron desde la extracción de RNA. Los valores de densidad óptica a una lectura de 260/280 nm fueron valores de 1.7 a 2.3, si bien no son perfectos pero pueden ser utilizados, lo cual coincide con Gottshall *et al.*, 2002 quienes mencionan que valores obtenidos de 1.7 a 2 pueden representar una buena calidad de RNA. Por otra parte es importante señalar que para asegurar éxito en el proceso de la transcripción reversa, es necesario evaluar la concentración de RNA de la que se está partiendo y además adicionar RNAsin ingrediente molecular que sirve para eliminar RNAsas, así como otras impurezas a las que pueda estar sujeta la reacción.

Derivado de lo anterior y estandarizado el protocolo de extracción de RNA se trabajó con titulaciones de magnesio, concentraciones de enzima, concentraciones de primers, así como concentración de desoxinucleótidos, para determinar el valor óptimo para cada uno de ellos y optimizar la reacción. Lo anterior ha sido sugerido reiteradamente por varios autores tales como Innis, *et al.*, 1990, Dieffenbach, *et al.*, 1993 y Henegariu, 1997 quienes mencionan que si los ingredientes de la reacción no se encuentran en concentraciones óptimas se puede presentar inhibición y con ello no realizarse ninguna amplificación o bien la aparición de numerosos amplificadores no pertenecientes a lo esperado.

Un aspecto importante en este estudio fue determinar el porcentaje de granjas infectadas por IPNV determinándose para el Estado de Hidalgo (68.8%) respecto a la del Estado de Puebla (56.4%), lo cual puede deberse a que este estado constantemente recibe organismos de importación o bien a que existe un intercambio comercial local y regional, lo cual coincide con lo reportado por Ceballos *et al.*, 2005 quienes reportan que en el Estado de Hidalgo la comercialización de trucha arco iris se realiza de manera local y algunos lo hacen de forma regional.

Confirmada la presencia de IPNV en las muestras, se realizó una selección de estas debido a que no se podían procesar todas debido a que el material biológico se agotó por un lado y por otro lado los insumos de biología molecular que son de alto costo.

Por lo anterior, solo se procesaron para determinar los genogrupos un número limitado de muestras por Estado. Las muestras seleccionadas del Estado de Hidalgo permitieron detectar que 4 de ellas amplificaron para el genogrupo I. Para el caso del Estado de Puebla solo 3 amplificaron para este genogrupo.

La presencia del genogrupo I coincide con lo reportado por Ortega *et al.*, 2002, quienes determinaron que el primer aislado mexicano de IPNV presentó el 99.5% de similitud con la cepa Buhl de Estados Unidos que pertenece al genogrupo I. Por tanto era de esperarse que en México se encuentren cepas del genogrupo I.

Para el genogrupo II se encontró que solo una muestra de Hidalgo y otra de Puebla amplificaron, lo que determina que también se encuentra en México la cepa Abild (Ab) ya que el diseño de los oligonucleótidos fue específico para esta cepa que ha sido reportada

en Dinamarca. De acuerdo con Fernández, 2005, a nivel mundial la cepa menos virulenta es la cepa Danesa (Ab), reportando mortalidades que alcanzan un 15% en condiciones óptimas.

Sin embargo, algunas muestras no amplificaron para ninguno de los dos genogrupos lo que sugiere que se trata de otras cepas de IPNV asociadas a otros genogrupos ya que en un principio con el uso de los primers universales el virus fue detectado. Aunque también es posible que sean cepas con mutaciones en las regiones seleccionadas y seguir siendo del mismo genogrupo.

Con lo antes mencionado, se puede afirmar que en México se encuentran cepas de IPNV pertenecientes al genogrupo I y II, en la primera se agrupan solo aislados de procedentes de América y en la segunda de procedencia europea.

Estos resultados pueden deberse al comercio internacional de huevo oculado así como de crías infectadas por IPNV, ya que de acuerdo a Ruane *et al.*, 2007 una de las vías por las que un país puede adquirir patógenos, es a través de las importaciones que se realizan de un país a otro, sin un estricto control sanitario como lo sucedido en Irlanda país donde todas sus granjas importan ova de Escocia, actualmente reportado como país afectado en la acuicultura por la invasión de IPNV.

Por otra parte, no solo el intercambio internacional de organismos puede ocasionar la diseminación de patógenos si no también la distribución regional, ya que en una granja pueden estar infectados los organismos por el IPNV y al ser llevados a otra granja contaminar la población de esta.

Pero no solo la importación de organismos y con ello la de patógenos cobra importancia, si no la virulencia que estos puedan tener y con ello las consecuencias que esto pueda ocasionar, ya que si bien en algunos países el IPNV no muestra ser virulento, para otros si, esto dependerá principalmente del virus y del hospedero, los cuales a su vez son afectados por el ambiente. Al respecto Rodríguez *et al.*, 2003 menciona que los efectos del ambiente originan un grado mayor de mutaciones en el virus lo que trae como consecuencia una configuración genómica diferente originando con ello mayores o menores grados de virulencia e inclusive la generación de cepas nuevas.

XVI. CONCLUSIONES

Los primers propuestos por Lee *et al.*, 1994 permiten la detección de las distintas cepas de IPNV.

A partir de este estudio se confirma la presencia de al menos 2 cepas de IPNV: la cepa Búhl de Estados Unidos y Ab de Dinamarca. Para las muestras en las que no se identificó el genogrupo se sugiere la presencia de alguno de otro genogrupo, o bien la mutación de alguno de ellos.

Las muestras de la zona central de México en las que se detectó que el IPNV pertenecen al genogrupo I, para el genogrupo II sólo amplificó una muestra del Estado de Hidalgo y una de Puebla.

En el Estado de Hidalgo se detectó el 68.8% de granjas con el IPNV, mientras que en el de Puebla se determinó el 56.4%.

De acuerdo a los resultados de este trabajo se encontró que si existe una relación entre el genogrupo y el origen geográfico de los organismos, excepto para las muestras que tuvieron el genogrupo II, al respecto se sugiere que esta cepa llegó a México a través de una importación realizada en el 2002 y a partir de ahí esta se diseminó por lo que es posible detectarla no solo en la zona centro del país si no en todo el país donde se cultiva la trucha arco iris.

XVII. RECOMENDACIONES

- ❖ Considerar los signos clínicos de la enfermedad que permitan asociarlos al resultado del laboratorio para que en conjunto se pueda realizar un diagnóstico integral.
- ❖ Analizar un mayor número de muestras por estadio de cada una de las granjas.
- ❖ Realizar la detección del IPNV a partir de muestras de frescas, posteriormente purificar el o los amplificadores e inmediatamente secuenciar.
- ❖ Se propone especificar en la norma analizar por RT-PCR una muestra representativa de los organismos procedentes de importación.
- ❖ Realizar muestreos sanitarios para la detección del IPNV en granjas acuícolas del resto de la región donde se cultiva la trucha arco iris.
- ❖ Elaborar un mapa epidemiológico para determinar la dispersión del IPNV en México.

XVIII. LITERATURA CITADA

- Adair, B. M. y Ferguson, H. W. 1981. Isolation of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus from non – salmonid fish. *Journal of Fish Diseases*. 4. 69-76.
- Alonso, M., Rodríguez, S., Perez, S. I. 1999. Nested PCR improves detection of infectious hematopoietic necrosis virus in cells coinfecting with infectious pancreatic virus. *Journal of Virological Methods* 81. 1-9.
- Álvarez, J., Ávila, P. Calderón, G. y Chapa, H. 1961. Los recursos naturales de México. Estado actual de las investigaciones de Hidrobiología y Pesca. Instituto. Mexicano. Recursos. Naturales. Renovables. México 3: 421 p.
- Álvarez, T. P. 2000. Capítulo I. Marco Institucional del Desarrollo Acuícola en México. *In* Estado de salud de la Acuicultura. Secretaria de Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca-Instituto nacional de la Pesca. Dirección General de Investigación en Acuicultura. Págs. 3-6.
- Ahne, W., Blake, S., Essbauer, S. and Nicholson, B. 2003. Characterization of aquabimaviruses from flounder *Pseudopleuronectes americanus* and mummichog *Fundulus heteroclitus* in the Chesapeake Bay, Virginia, USA. *Diseases Of Aquatic Organisms*. 56:201-206. *Advances in Virus Research*. 62. 113-165.
- Arredondo, J. L. y Lozano, S. D. 2003. La Acuicultura en México. *Planta Experimental de Producción Acuícola*. Iztapalapa, México, D. F. 266 p.
- Avilés, Q. S. y Vázquez, H. M. 2006. Fortalezas y debilidades de la acuicultura en México. CEDRSSA, pp. 69-86.
- Berg, L. S. 1948. *Freshwater fish of the USSR and adjacent states*. Vol. 1. 1. pp. 242-249.
- Beveridge, M. 1984. *Cage Aquaculture*. Fishing News Books. Inglaterra. 352 pp.
- Billi, J. L. 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 Fisheries Research Board of Canada*. 26. 1459- 1465.
- Blake, S., Schill, W., McAllister, P., Lee, M., Singer, J. and Nicholson B. 1995. Detection and identification of aquatic birnaviruses by PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 33, No. 4. 835-839.
- Blake, S., Ma, J., Caporale, D., Jairath, S., Nicholson B. 2001. Phylogenetic relationships of aquatic birnaviruses based on deduced amino acid sequences of genome segment A cDNA. *Diseases of Aquatic Organisms*. 45: 89-102.
- Blanco, C. M. 1995. *La trucha, cría industrial*. De. Mundi-Prensa. España. 503 p.
- BLAST. Assembled RefSeq Genomes. URI.: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Consultado el 24-01-2011.

- Bonilla, P. 1998. Comparación del crecimiento de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en la fase de cría, con cuatro alimentos comerciales. Servicio Social, Licenciatura Hidrobiología. U. A. M. Unidad Iztapalapa. México, D.F. 30 p.
- Brown, F. 1986. The classification and nomenclature of viruses: summary of results of meeting of the international committee on taxonomy of viruses in Sendai. *Intervirology*. 25. 114 – 143.
- Cabrera, J. y Garcia, C. 1982. El estado de la acuicultura en México al término de 1982. Informes Nacionales sobre el desarrollo de la Acuicultura en América Latina. 294. 138 p.
- Cavender, T. M. y Millar, R. R. 1982. *Salmo australis*, a new species of fossil salmonid from south western Mexico. *Contrib. Mus. Paleont. Univ. Mich., Ann Arbor*, 26 (1): 1-17.
- Cavender, T. M. 1986. Review of the fossil history of North American Freshwater fishes. In: Hocutt, E. H. y Wiley, E. O. Edit. *The Zoogeography of North American Freshwater Fishes*. John Wiley y Sons, INE., New York.
- Ceballos, L. y Velásquez, A. 1988. Perfiles de la alimentación de Peces y Crustáceos en los centros y unidades de Producción Acuicola en México. Secretaría de Pesca.
- Ceballos, O., Jiménez, S., Falcón, A., Martínez, S., Sepúlveda, A., Ramírez, E., Rodríguez, P., Pérez, M. y Acosta, M. 2005. Catálogo de unidades de producción acuicola del Estado de Hidalgo. Secretaría de Agricultura, Ganaderías, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación.
- ClustalW2 - Multiple Sequences Alignment. URL: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>. Consultado el 24-01-2011.
- Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. 2006. Mazatlán Sinaloa. México. Diario Oficial de la Federación. 16 de junio de 1994. Norma Oficial Mexicana-010-PESC-1993
- Córdoba, Ch. 1994. Proyecto Parque Trutícola de Chihuahua. Informe final. Tomo II. Chihuahua.
- Chapman and Hall. 2006 *Handbook of Computational Molecular Biology*. Ed. Aluru, Srinivas.
- Delmas, B., Kibenge, F. S.B., Leona, J. C., Mundt, E., Vakharia, V. N. y Wu, J. L. 2004. Birnaviridae. In *Virus Taxonomy*. Eds. London: Academia Press. 561-569.
- Diario Oficial de la Federación (2004).
- Dieffenbach, C., Lowe, T. and Dveksler, G. 1993. General concepts for PCR primer design. *Genome Research*. 3: 133-141.
- Dixon, P. F., and Hill, B. J. (1983). Rapid detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Journal of General Virology*. 64:321–330.
- Dobos, P. 1995. The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus. *Annual*

Review of Fish Diseases. 5, 25-54.

Enríquez, R., Ortega, C., Salgado, C. y Vega, F. 2000. Diagnóstico por cultivo celular e inmunofluorescencia de la Necrosis Pancreática Infecciosa Viral (IPNV) en trucha arco iris. Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuicola y la Red de Diagnóstico. 4 (12). 2 pp.

Espinoza, J. C., A. Hjalmarsson, E. Everitt, J. Kuznar. 2000. Temporal and subcellular localization of infectious pancreatic necrosis virus structural proteins. Archives of Virology. 145, 739-748.

Espinoza, J. C. y Kuznar, J. 2002. Rapad simultaneous detection and quatitation of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). Journal of Virological Methods. 105. 81-85

FAO. 2004 Doc. Téc. Pesca Conservación de los Peces: Problemas y recomendaciones. Informe de la consulta de expertos sobre los recursos Acuícolas de los peces. 42 p. (217).

FAO. 2008. Informe de la Organización de las Naciones Unidas para la Pesca y la Alimentación sobre el Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura 2008.

Fernández, M. 2005. Estudio Epidemiológico del Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa en salmones. Tesis de grado. Universidad Autrial de Chile. 73 p

Gall, G. A. E. 1990. Taxonomic names for northern Pacific Trout Aquaculture, 86: 1.

Gottshall, S., Tekin, S. and Hansen, P. 2002. Extraction and purification of total RNA using trizol or tri reagent. Dept. of Animal Sciences, University of Florida.

Guarneros, P. R. 2006. Análisis económico de la actividad pesquera y acuicola. CEDRSSA, pp. 145-156.

Guerra, M. 2005. Aglomeraciones pesqueras en América Latina. Ventajas asociadas. CEPAL/AIFAOmega.

Guerrero, L., Benítez, J. y González, M. 2002. Detección del virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (vNPI) en portadores de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en granjas del Estado de México. Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura.

Granzow, H. F., Weiland, D., Fichtner, P. J. Enzmann. 1997. Studies of the ultrastructure and morphogenesis of fish pathogenic viruses grown in cell culture. Journal of Fish Diseases. 20, 1-10.

Hall, N. 2007. Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. The Journal of Experimental Biology 209: 1518-1525.

Hedrick, R. P., Leong, J. C. y Fryer, J. L. 1978. Persistent infections in salmonid fish cells with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). Journal of Fish Diseases. 1. 297-308.

Henegariu, O., Heerema, N. A., Dlouhy, S. R., Vance G. H. and Vogt P. H. 1997. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. BioTechniques 23:504-511.

Hepher, B. y Pruginin, Y. 1991. Cultivo de peces comerciales. Basado en las experiencias de las granjas piscícolas de Israel. Ed. Limusa S.A. de C.V., México, 316 pp. HUET, M. 1978. Tratado de piscicultura. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, 741 pp.

Hernández, A., Vasallo, P., Torres, A. y Salido, E. 1994. Análisis del RNA: Estudio de la expresión génica. *Nefrología*. Vol. XIV. Núm. 2,

Hill, B. J. 1982. Infectious pancreatic necrosis virus and its virulence. In: Roberts, R. J. (Ed). *Microbial Diseases of Fish*. Academic Press, New York. 91 - 114 pp.

Hill, B. J. y Way, K. 1995. Serological classification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and other aquatic birnaviruses *Annual Review of Fish Diseases*. 5. 55-77.

Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J. and White, T. 1990. *PCR Protocols. A guide to methods and applications*. Academic Press.

Invitrogen. 2003. SuperScript II Reverse Transcriptase.

Juárez, P. 1987. La acuicultura en México. Importancia social y económica. *Desarrollo Pesquero Mexicano 1986-1987*. Secretaría de Pesca. Tomo III. México.

Lee, L. H., Ting, U., Shien, J. H. and Shieh, H. K. 1994. Single-tube, noninterrupted reverse transcription-PCR for detection of infectious bursal disease virus. *Journal of Clinical Microbiology* 32: 1268-1272.

Ley General de Pesca y Acuicultura Sustentable. 2007. *Diario Oficial de la Federación*.

López, E. y Pérez, G. 1999. Métodos de análisis en la reconstrucción filogenética. *Bol. S.E.A.*, N. 26. 45-56.

Losordo, M., Maser, M. y Rakocy. 1992. *Recirculation Aquaculture Tank Production Systems*. Southern Regional Aquaculture Center. No. 451. 6 p.

Lyles D. 2000. Cytopathogenesis and inhibition of host gene expression by RNA viruses. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64. 709-724.

Maganja, B., Strancar, M., Hostnik, P., Jencic, V. y Grom, J. 2002. Comparison of the efficiency and sensitivity of virus isolation and molecular methods for routine diagnosis of infectious haematopoietic necrosis virus and infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of Fish Diseases*. 25. 73-80.

Maraver, A. Oña, A., Abaitua, F., González, D., Clemente, R., JA Ruiz-Díaz, Castón, J. R., Pazos, F. y Rodríguez, J. F. 2003. The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role in capsid assembly. *Journal of Virology*. 77. 6438-6449.

Marone, M., Mozzetti, S., De Ritis, D., Pierelli, L. And Scambia, G. 2001. Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. *Biological procedures*. Online 2001; 3 (1): 19-25

Medina, J., Vera, F. y Sánchez, R. 1976. *La Acuicultura en la Planeación Hidráulica*. Secretaría de Recursos Hidráulicos. 92 p.

Miller, R. R., Smith, M. L. 1986. Origin and geography of the fishes of central Mexico. In: Hocutt, C.H. and Wiley, E. O. Edit. The Zoogeography of North American Freshwater Fishes. John Wiley y sons, Inc., New York.

Mulcahy, D. y Pascho, R. J. 1984. Adsorption to fish sperm of vertically transmitted fish virus. *Science*. 225. 333-335.

Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Ghabrial, S.A., Jarvis, A.W., Martelli, G.P, Mayo, M.A. and Summers, M.D. 1995. In: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*, p. 586, Springer-Verlag, Austria.

Neave, F. 1958. The origin and the speciation of *Oncorhynchus*. *Trans. R. Soc. Can.* 52. 25-39.

Nelson, J. S. 1984. *Fishes of the world*. John Wiley y Sons, New York.

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

Nishizawa, T., Kinoshita, S. and Yoshimizu, M. 2005. An Approach for genogrouping of Japanese isolates of aquabirnaviruses in a new genogrup, VII, based on the VP2-NS junction region. *Journal of General Virology*. 86: 1973-1978.

Nikolsky, G. V. 1976. *Special Ichthyology*. Vysshaya Shkola, Moscow.

Norma Oficial Mexicana-010-PESC-1993. Requisitos sanitarios para la importación de organismos acuáticos vivos en cualquiera de sus fases de desarrollo, destinados a la acuicultura u ornato, en el territorio nacional. *Diario Oficial de la Federación*. 16 de junio de 1994.

Norma Oficial Mexicana-011-PESC-1993. Para regular la aplicación de cuarentenas, a efecto de prevenir la introducción y dispersión de enfermedades certificables y notificables, en la importación de organismos acuáticos vivos en cualquiera de sus fases de desarrollo, destinados a la acuicultura y ornato en los Estados Unidos Mexicanos. *Diario Oficial de la Federación*. 16 de junio de 1994.

OIE, Oficina Internacional de Epizootias. 2006. *Aquatic Animal Health Code* (8th ed). Paris, France.

OIE, Oficina Internacional de Epizootias. 2007. 75a Sesión General 20-25 de Mayo 2007. Informe. Paris, France.

OIE, Oficina Internacional de Epizootias. 2008. *Código Sanitario para los Animales Acuáticos 2008*

Ortega, S. C. 2000. Descripción de la Necrosis Pancreática Infecciosa Viral (IPNV) de la trucha. *Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuicola y la Red de Diagnóstico*. 4 (12). 4 pp.

Ortega, C., Enríquez, R. 2007. Factores asociados a la infección celular por el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV). Archivos de Medicina Veterinaria. 39. 1. 7-18 p.

Ortega, C., Montes de Oca, R., Groman, D., Yason, C., Nicholson, B. and Blake, S. 2002. Case Report: Viral Infectious Pancreatic Necrosis in Farmed Rainbow Trout from Mexico. Journal of Aquatic Animal Health. 14. 4. 305-310 p.

Park, K. C., Reno, P. W. 2005. Characteristics of inhibition of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) by normal rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* serum. Diseases Of Aquatic Organisms. 63, 43-52.

Primer3 (v. 0.4.0) Pick primers from a DNA sequence. URL: <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>. Consultado el 24-01-2011.

QIAamp® Viral RNA Mini Handbook. Diciembre 2007

Read, 1994. Trends in Microbiology, 2, 73-76.

Reno, P. 1998. Factors involved in the dissemination of disease in fish populations. Journal of Aquatic Animal Health 10: 160-171.

Reno, P. (1999) Infectious pancreatic necrosis and associated aquatic birnaviruses. Fish Diseases and Disorders, Vol. 3 (ed. by P.T.K.Woo & D.W.Bruno), pp. 1-55. CAB International Ltd, Wallingford.

Roberts R.J., Pearson, M. D. 2005. Infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Journal of Fish Diseases. 28, 383-389.

Rodríguez, G. M. 2000. Factores de Riesgo en la Movilización de Salmónidos. Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuicola y la Red de Diagnóstico. 4 (12). 5 pp.

Rodríguez, G. M., Rodríguez, C. D., Monroy, G. Y. y Mata, S. J. 2001. Manual de Enfermedades de Peces. Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuicola y la Red de Diagnóstico. Vol. 3. Num. 15.

Rodríguez, G. M. 2003. Programa Nacional de Sanidad Acuicola y la Red de Diagnóstico y Prevención de Enfermedades en Organismos Acuáticos a Nivel Nacional. Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuicola y la Red de Diagnóstico. Vol. Num. 21.

Rodríguez, M. y Cortés, A. 2003. Reseña histórica de la truiticultura en México. Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuicola y la Red de Diagnóstico. Vól. 5 Num. 6. 2-5 pp.

Rodríguez, S., Borrego, J. y Pérez, I. 2001. Comparative evaluation of five serological methods and RT-PCR assay for the detection of IPNV in fish. Journal of Virological Methods. 97. 23-31

Ruane, N., Geoghegan, F. and Cinneide, M. 2007. Infectious pancreatic necrosis virus and its impact on the irish salmon aquaculture and wild fish. Marine Environment & Health Series. 30.

- Salgado, M. C. 2000. La Necrosis Pancreática Infecciosa, Enfermedad Viral en Salmónidos. Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico. 4 (12). 3 pp.
- Salgado, M. C. 2006. Necrosis Pancreática Infecciosa: Enfermedad Emergente en la Truticultura de México. Veterinaria México. Vol. 37. Num. 004.
- Santi, N., H Song, Vakharia, V. N., Evensen, Ø. 2005a. Infectious pancreatic necrosis virus VP5 is dispensable for virulence and persistence. Journal of Virology. 79, 9206-9216.
- Santi, N., Sandtrø, A., Sindre, H., Song, H., Hong, J.R., Thu, B. Wu, J.L., Vakharia, V.N., Evensen, Ø. 2005b. Infectious pancreatic necrosis virus induces apoptosis in vitro and in vivo independent of VP5 expression. Journal of Virology. 342, 13-25.
- Secretaría de Pesca. 1988. Manual Técnico para el Cultivo de Truchas. México. 115 p.
- SEMARNAT. 2005. Informe de la situación del medio ambiente en México. Compendio de estadísticas ambientales, México.
- Smail, D. A., McFarlane, L., Bruno, D. W. y McVicar, A. H. 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. 631- 638.
- Smith, F. A. 1895. A History of Scandinavian Fishes. Part 2. Stockholm.
- Smith, M. L., 1980. The evolutionary and ecological history of the fish fauna of the Rio Lerma basin, México. PhD dissertation, University of Michigan, Ann Arbor, 205 pp.
- Smith, M. L. 1981. Late Cenozoic fishes in the warm deserts of North America: a reinterpretation of desert adaptations. In: Naiman, R.J. and Soltz, D.L. Edit. Fishes in North American Deserts. John Wiley & Sons, New York, New York, 11-38 pp.
- Smith, G.R., Stearley, R.F., 1988. The classification as scientific names of rainbow and cutthroat trouts. Fisheries, 14: 4-10.
- Song, H., Santi, N. Evensen, Ø. Vakharia V. N. 2005. Molecular determinants of infectious pancreatic necrosis virus virulence and cell culture adaptation. Journal of Virology 79. 10289-10299.
- Villanueva, RA, JL Galaz, JA Valdés, MM Jashés, AM Sandino. 2004. Genome assembly and particle maturation of the *Birnavirus* infectious pancreatic necrosis virus. Journal of Virology . 78, 13829- 13838.
- Vladimirov. V. I. 1948. The Stream Trout of Armenia and its Relations with Other Representatives of the Genus *Salmo*. Tr. Sevan. Gidrobiol. St. 10, 87.
- Vladykov, V. D. 1963. A review of salmonid genera and their broad geographical distribution. Trans. R. Soc. Can. I (IV). Sec. III 459-504.

Way-Shyan, W., Yea-Ling, W. and Jainn-Shyan, L.1997. Single-tube, non-interrupted reverse transcription PCR for detection of infectious pancreatic necrosis virus. *Diseases of Aquatic Organisms*. 28. 229-233 P.

Wedemeyer, G. y Wood, E. 1974. Stress as a predisposing factor in fish disease. F. D. L. U. S. Fish Wild Service, U. S. A.

Williams, K., Blake, S., Sweeney, A., Singer, J. T., Nicholson, B. L. 1999. Multiplex reverse transcriptase PCR assay for simultaneous detection of three fish viruses. *Journal of Clinical Microbiology*. 37. 4139- 4141.

Wolf, K. 1988. Infectious pancreatic necrosis. "*Fish Viruses and Fish Diseases*", Cornell Univ, Press, Ithaca, NY, Pp 115-157.