



NECROSIS PANCREÁTICA INFECCIOSA

Su importancia y la perspectiva hacia la vacunación

FLOR ISELA TORRES ROJO, BLANCA ESTELA SÁNCHEZ RAMÍREZ, ROCÍO INFANTE RAMÍREZ,
MARÍA DEL CARMEN GONZÁLEZ HORTA, GILBERTO EROSA DE LA VEGA
Facultad de Ciencias Químicas/Universidad Autónoma de Chihuahua

El virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) pertenece al género *Aquabirnavirus*, prototipo de virus perteneciente a la familia *Birnaviridae*. Tiene como genoma dos segmentos de RNA. Es el agente causal de la enfermedad en salmónidos. En la industria de la acuicultura juega un papel importante desde el punto de vista económico ya que puede causar más del 90% de mortalidades en poblaciones de organismos menores a los cuatro meses de edad. Dentro de las políticas de control, la vacunación es uno de los métodos más eficaces para el control de enfermedades infecciosas en los peces cultivados, principalmente en el salmón. Una de las estrategias modernas para generar vacunas de administración oral es la creación de vacunas recombinantes mediante la expresión de proteínas en plantas transgénicas. El desarrollo de esta tecnología mediante una vacunación masiva en granjas acuícolas sería una alternativa para aumentar la rentabilidad de los cultivos.



Adán SÁENZ: de la serie *Corazones*.

La acuicultura se define como la técnica que permite aumentar la producción de organismos acuáticos para consumo humano; para ello se deben controlar las condiciones tanto ambientales como propias de los organismos (Guerrero y otros, 2004; Idyll y otros, 1974,). La truiticultura (nombre dado al cultivo de trucha) ocupa un lugar muy importante debido a su capacidad para generar factores de importancia socioeconómica en el desarrollo del país, por lo que se requiere impulsar la actividad acuícola, orientando sus actividades y procesos en términos de eficiencia, calidad, rentabilidad y sustentabilidad (Pronalsa, 2001).

En México, el cultivo de la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) se inició a finales del siglo XIX. Desde entonces, la truiticultura ha tenido un notable desarrollo en varias regiones del país (Groman y otros, 2002), el cual se ha caracterizado por un incremento en el número de granjas y el aumento de producción en las mismas (Pronalsa, 1998). Como consecuencia de la importación de organismos acuáticos, en particular de formas juveniles de trucha arcoiris, se da la introducción de enfermedades al país. Tal es el caso de la necrosis pancreática infecciosa, una enfermedad de origen viral que afecta principalmente las etapas juveniles de la trucha arcoiris y que causa un alto porcentaje de mortalidad, ya que no se cuenta con un tratamiento específico. Esto último se traduce directamente en grandes pérdidas económicas para los productores.

Los virus son considerados como agentes genéticos que requieren de una célula huésped para poder multiplicarse (Madigan y otros, 2000). Hace cincuenta años, el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) fue el primer virus aislado de peces, y esto fue el inicio del desarrollo de la virología en peces. Desde entonces, el IPNV ha sido aislado de un gran número de

especies de agua dulce y salada. El impacto económico de la enfermedad y la ubicuidad del agente justifica la gran cantidad de publicidad en relación con el virus (Dopazo, C. y J.L. Barja, 2002). La necrosis pancreática infecciosa (IPN) como se conoce a la enfermedad viral causada por el IPNV, afecta a varios organismos acuáticos, entre los cuales los más afectados son los salmónidos. Debido a la alta mortalidad que se presenta en crías y alevines y a la rápida transmisión de la enfermedad, su rápida detección oportuna tiene un alto impacto económico. El IPNV se encuentra incluido en la lista de enfermedades que la Organización Mundial de Sanidad Animal cita en su Código Sanitario Internacional para los animales acuáticos, por lo que su detección en peces debe ser notificada. El seguimiento de la epizootiología de la enfermedad es determinante para establecer las estrategias de prevención y control de esta enfermedad, así como de su agente causal (Salgado, C., 2006).

Dentro de las políticas de control, la vacunación ha sido uno de los métodos planteados más eficaces para el control de enfermedades infecciosas en los peces cultivados, particularmente en el salmón (Groman y otros, 2002; Salgado, C., 2006). Para el desarrollo de una vacuna piscícola es imprescindible establecer e identificar los factores de virulencia del agente patógeno y los mecanismos de respuesta del pez, el hospedero, tanto a nivel celular como una respuesta específica y efectiva por el sistema inmune del hospedero, la vacuna, debe ser optimizada del tal forma que los peces vacunados sean capaces de desarrollar una protección contra el agente patógeno (Vinitnantharat y otros, 1999; Heppell y otros, 2000).

Se han realizado varias inmunizaciones de peces, especialmente en trucha arcoiris, determinando que este tipo de vacunación no previene una transmisión vertical en la progenie (Bootland y otros, 1990). Incluso, inmunizaciones con DNA en peces inducen una temprana y no específica protección antiviral y más tarde, una respuesta inmune inespecífica. Además de que se determinó que la aplicación de este tipo de vacunas es muy estresante, tanto para el pez como para la persona que la aplica, induciendo un moderado porcentaje de mortalidad por esta causa. (Leong y otros, 2000, Bootland y otros, 1990, Bootland y otros, 1995).

El diseño de una vacuna recombinante cuya vía de aplicación no sea intraperitoneal es una estrategia ideal para lograr la prevención de la enfermedad (Caswell y otros, 1986; Tarrab, 1995). En este trabajo



haremos una revisión breve de la enfermedad y de su agente causal, enfocándonos con mayor profundidad en los conocimientos actuales sobre la respuesta inmune de los salmónidos y finalmente abordaremos las estrategias que se han desarrollado a la fecha para la elaboración de vacunas contra esta enfermedad.

Enfermedad

La necrosis pancreática infecciosa es una enfermedad sistémica de curso agudo y subagudo altamente contagiosa. Fue descrita por primera vez en 1940 en Canadá por M'Gonigle, pero no fue hasta 1955 que Word, Sniezko y Yasutake revelaron la naturaleza de la infección y su posible origen viral. El virus se ha reportado en una gran variedad de salmónidos, incluyendo miembros del género *Salmo*, *Oncorhynchus* y *Salvelinus* (Dopazo y J.L. Barja, 2002). Sin embargo, actualmente se presentan cuadros de infección por IPNV en distintas especies de salmónidos, tanto en agua dulce como en salada en distintas partes del mundo (Cutrin y otros, 2000). En América, la literatura reporta la presencia de la enfermedad en el Norte Centro y Sudamérica (Pronalsa, 2000).

Signos

Dentro de los signos clínicos observados en los peces infectados se encuentra palidez branquial, pérdida de peso, exoftalmia, oscurecimiento de la piel, abultamiento abdominal, nado errático con rotaciones en su eje longitudinal y en forma de espiral, aleta dorsal con erosión severa. También se han observado estrías de moco flotando en el agua, y algunos peces las presentan adherida al orificio anal. Las lesiones principales halladas en el estudio histopatológico incluyen focos de necrosis coagulativa de páncreas, riñón e intestino. El riesgo de mortalidad es variable –10%-90%– (Dopazo, C. y J.L. Barja, 2002).

Etiología

El agente causal es el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV). El virus es causante de la infección y pertenece a la familia *Birnaviridae*, ubicándose dentro del género *Acuabirnavirus*. Tiene forma

icosaédrica, aproximadamente de 70 nm de diámetro (Villanueva y otros, 2004). Contiene un genoma compuesto de dos segmentos de ácido ribonucleico (RNA) de doble cadena. El segmento A codifica para cuatro proteínas, dos de las cuales son proteínas estructurales de cápside (VP2 y VP3), una proteasa no estructural –VP4) y VP5– (Hjalmarsson y otros, 1999; Salgado, C., 2006). Este segmento codifica un precursor de proteína de 106 kDa; contiene una larga región abierta de lectura; es cotranslacionalmente incrustado por la proteasa viral VP4 y genera la proteína de la cápside pVP2 y VP3. La pVP2 (62k kDa) es posteriormente transformada a VP2 (54 kDa) durante la maduración del virus (Villanueva y otros, 2004; Yao y Vakharia, 1998). VP2 es la principal proteína de la cápside, y los anticuerpos neutralizantes son producidos contra esta proteína. VP3 es una proteína interna de la cápside, la cual une al RNA del virus, formando la ribonucleoproteína estructural del



Adán SÁENZ: Elementary Being.

núcleo. El segmento A también codifica para una proteína no estructural rica en arginina de 17 kDa, llamada VP5. Esta proteína ha sido detectada en células infectadas, por lo tanto no es esencial para la replicación del virus *in vitro*, sin embargo recientemente se ha visto que esta proteína no es indispensable para la replicación del virus *in vivo*, y no está involucrada en la persistencia de la infección o virulencia del virus (Santi y otros, 2005). Mientras que el segmento B codifica para una proteína VP1 –94 kDa– (Villanueva y otros, 2004), que es una RNA polimerasa dependiente de RNA viral (Salgado, C., 2006). Se ha demostrado que la proteína de cápside VP2 del IPNV provoca inmunidad cuando esta es inyectada a los peces, induciendo la producción de anticuerpos neutralizantes (Jorgensen, J. y otros, 2003; Moon, C. y otros, 2004). Se sobreexpresaron VP2 y VP3 de IPNV para investigar la inmunogénicidad de las proteínas recombinantes, determinando que VP3 es más inmunogénica que VP2; sin embargo, VP3 es inaccesible a anticuerpos debido a su localización (Moon, C. y otros, 2004). Incluso Song y otros en el 2005 determinaron que los residuos 217 y 221 de la proteína VP2 contienen los determinantes virulentos en el serotipo Sp (Song y otros, 2005).

Adán SAENZ: Corazón I.



En la actualidad, los virus de IPN se agrupan en tres grupos serológicos de acuerdo con su comportamiento en la seroneutralización. El grupo I americano, representado por el virus West Buxton serotipo VR 299; el grupo II europeo conocido con el nombre de Sp; y el grupo III, que corresponde al virus del tipo Ab considerado danés (Dopazo C. y J.L. Barja, 2002; Cutrin y otros, 2000).

Transmisión

Los organismos más afectados son peces menores a las 20 semanas de edad (crías o alevines). A las truchas mayores a 6 meses de edad se les considera resistentes; sin embargo, los peces adultos pueden actuar como portadores (Bootland y otros, 1995). Se transmite de manera vertical y horizontal; es decir, los progenitores transmiten este virus a la descendencia (huevo y crías). Al momento de la reproducción y en la transmisión horizontal, el virus se dispersa a través del agua, la cual es un excelente medio de transporte y difusión del virus, por lo que el riesgo de diseminar esta enfermedad hacia otras unidades de producción es muy alto (Yao y Vakharia, 1998).

Identificación

El procedimiento para la identificación del virus recomendado por la Organización Mundial para Sanidad Animal se basa en el aislamiento del virus en cultivo celular, seguido por la identificación inmunológica de los aislamientos mediante pruebas de inmunofluorescencia, ELISA y seroneutralización. El diagnóstico se basa en la histología y en la evidencia inmunológica en los tejidos infectados; sin embargo, en la actualidad se trabaja en la búsqueda de nuevas es-

trategias para la identificación viral con mayor rapidez (Dopazo C. y J.L. Barja, 2002).

Respuesta inmune

El sistema inmune está presente en todas las especies de animales multicelulares; en peces, la respuesta inmune es menor, particularmente a temperaturas bajas.

En peces, los factores constitutivos como la superficie epitelial y el moco, previenen el ataque y/o penetración de microorganismos. Diferentes cantidades de lisozimas han sido encontrados en diferentes especies de peces y en algunos casos esta es posiblemente correlacionada con resistencia a enfermedades. Además, se han descrito mediadores inflamatorios, de los cuales, los mejor caracterizados son las citocinas, particularmente la interleucina 1, 6 y el factor de necrosis tumoral α . Solo dos clases de inmunoglobulinas han sido descritas en pez *Telost*, la inmunoglobulina M, y recientemente la inmunoglobulina D en pez *gato*. Cabe mencionar que la temperatura del ambiente es un factor crítico en el desarrollo, tanto de la inmunidad específica como no específica (Watts, M. y otros, 2001).

Más recientemente, Thomas Chen observó el incremento de la respuesta inmune innata en peces por transgénesis; peces con DNA foráneo (transgenes) han sido introducidos artificialmente e integrados a sus genomas; son los llamados peces transgénicos. La introducción del DNA se da en huevos no fertilizados o recién fertilizados por medio de microinyección o electroporación para producir especies de peces transgénicos. Estos peces sirven como un excelente modelo experimental para las bases de la investigación científica y en el desarrollo de las aplicaciones biotecnológicas, entre ellas el entendimiento de la respuesta inmune del pez a enfermedades infecciosas (Chen, T., 2002).

Diagnóstico

Una herramienta importante para el diagnóstico de las enfermedades virales en peces, es sin duda la historia clínica o anamnesis y el examen anatomopatológico que se realice a los peces enfermos, ya que estas pueden proporcionar indicios sobre la presencia de una infección vírica. Sin embargo, desde el punto de vista virológico, debe lograrse la identificación del agente casual y su aislamiento por técnicas de diagnóstico directas o indirectas (Pronalsa, 2000).

Dentro de las técnicas indirectas, el método de detección tradicional de *Acuabirnavirus* en peces in-

fectados requiere del aislamiento del virus, el cual es llevado a cabo en líneas celulares; sin embargo, la cultivación del virus es relativamente caro (Dopazo, C. y J.L. Barja, 2002). Aunque otros autores lo mencionan como consistente y simple, debido a que el virus se encuentra en títulos elevados, no hay fases en las que el virus no pueda ser aislado; el tiempo requerido para el aislamiento e identificación del agente es de dos a tres semanas (Salgado, C., 2006). Esto resulta crítico si tomamos en cuenta que en este tiempo podría presentarse una amplia distribución del virus, y por lo consiguiente ser fatal, dada la fácil transmisión del mismo.

Dentro de la identificación directa del virus existen varias técnicas (Pronalsa, 2000), como pruebas de anticuerpos fluorescentes, de coagulación, Inmunodot blot, métodos serológicos como ELISA (Way-Shyan y otros, 1997). El ensayo inmunoabsorbente de doble anticuerpo unido a enzima, para la detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa presenta una alta sensibilidad, confirmados con altos valores de inhibición específica y bajos valores de inhibición no específica, demostrando la calidad del antisuero de conejo empleado. Estos experimentos han confirmado que el IPNV puede ser detectado confiablemente por ELISA en peces naturalmente infectados. El resultado es, por tanto, un excelente método para una identificación rápida del virus y una pronta toma de decisiones contra la prevención de la enfermedad (Rodak y otros, 1988). Actualmente, la detección molecular de patógenos ofrece significantes ventajas (Kerr y Cunningham, 2006).

La transcripción en reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), ensayo específico realizado a través de la combinación de oligonucleótidos para la amplificación de fragmentos específicos (López-Lastra y otros, 1994) se ha estado utilizando actualmente para la detección de *Acuavirnavirus*, principalmente en la identificación IPNV, en experimentos realizados con salmón atlántico de tejido infectado; sin embargo, resultados donde se ha utilizado esta técnica como método de diagnóstico se han reportado en Noruega, Taiwán, Virginia, España y Chile (Taksdal y otros,

2001; Way-Shyan y otros, 1997; Blake y otros, 1995; Borrego y otros, 2001 y López-Lastra y otros, 1994). Actualmente, en México esta técnica de identificación de IPNV se está estandarizando, puesto que los experimentos que se han realizado a la fecha demuestran que la sensibilidad de esta técnica no ha sido mayor a la del cultivo celular (Salgado, C., 2006).

Prevención y control

Los métodos de prevención actualmente se basan en la instrumentalización de políticas de control y en prácticas de higiene en la crianza de los salmónidos para evitar la introducción o importación de ovas fértiles o peces provenientes de lotes reproductores portadores del IPNV. El mejor método de control es la prevención y la no movilización de animales enfermos, eliminación adecuada de peces enfermos, así como la desinfección de equipo contaminado o expuesto (Salgado, C., 2006).

La aplicación de vacunas es el método de elección para el control de enfermedades (Guerrero y otros, 2004), Sin embargo, la obtención de vacunas eficaces para prevenir enfermedades de etiología vírica es difícil, y es la tendencia actual el desarrollo de vacunas de DNA, cuya efectividad solo ha sido demostrada a nivel experimental (Lorenzen y LaPatra, 2005).

Vacunación

Para desarrollar una vacuna piscícola es imprescindible establecer e identificar los factores de virulencia o el agente patógeno y los mecanismos de respuesta del pez a nivel celular y humoral. Además de la inducción del sistema inmune, debe ser optimizada del tal forma que los peces vacunados sean capaces de desarrollar mecanismos de protección inmune contra el agente patógeno (Vinitnantharat y otros, 1999; Heppell y otros, 2000).

En estudios realizados en 1990 por Bootland y otros, observaron los efectos de edad y tamaño en trucha de arroyo inmunizando por inmersión directa de IPNV, sugiriendo que la protección requiere de una inmunización en fases tempranas; esto parece ser un



Adián Sáenz: Riverrun.

contraste directo con el estado de la ontogenia y la velocidad de crecimiento requeridos para una exitosa inmunización (Bootland y otros, 1990). En 1995, este mismo autor continuó con sus estudios, buscando la forma de prevenir el establecimiento de un estado acarreador de la infección del virus en productos reproductivos, realizando estudios a través de la inmunización de la trucha adulta de arroyo por medio de una inyección intraperitoneal de IPNV inactivado con formalina, y encontró, que la inmunización de la trucha no previene una transmisión vertical de la trucha a la progenie (Bootland y otros, 1995).

Se han mapeado los epitopes neutralizantes de IPNV y se determinó que el tercio central de la proteína VP2 de las cepas del serogrupo A del virus contiene al menos tres epitopes neutralizantes, dos variables y uno conservado, sugiriendo que debido a la variabilidad antigénica de los *Birnavirus* para crear una vacuna contra IPNV debe basarse en epitopes neutralizantes conocidos entre las cepas relevantes del virus (Frost y otros, 1995).

Las vacunas antivirales de DNA se basan en la administración del gen (es) codificador (es) a las células del hospedador (Coll y otros, 1998; Lorenzen y LaPatra, 2005). La estrategia fue inducir inmunidad con la creación de vacunas de DNA contra IHNV, SHRV y SVCV, para determinar la producción de la proteína Mx, un indicador de la producción de interferón alfa/beta, observando que solo los peces vacunados con el plásmido contra IHNV producían altos niveles de la proteína Mx en riñón e hígado. Estos resultados sugieren que las vacunas de DNA en peces inducen una temprana y no específica protección antiviral mediada por alfa/beta interferón, y más tarde, una respuesta inmune inespecífica (Leong y otros, 2000). Fueron probadas vacunas con un panel de distintos dinucleótidos sintéticos como adyuvantes para determinar los mecanismos de defensa contra IPNV y la habilidad para estimular leucocitos en el salmón Atlántico. Sin embargo los dinucleótidos sintéticos de DNA en peces inducen una protección antiviral no específica (Jorgensen y otros, 2003).

Se ha investigado la inmunogénicidad de las proteínas recombinantes, con la finalidad de buscar la estrategia más adecuada para la creación de una vacuna efectiva, determinando que VP3 es más inmunogénica que VP2; sin embargo, VP3 se localiza en la parte interna de la partícula viral y es por consiguiente inaccesible a anticuerpos VP3 (Moon y otros, 2004); y en el

2005 se encontró que los residuos 217 y 221 de la proteína VP2 contienen los determinantes virulentos en el serotipo Sp (Song y otros, 2005).

En la actualidad existen vacunas recombinantes de DNA basadas en la proteína VP2 (Christie, K.E., 2004), que ayudan a prevenir la infección por IPNV en trucha arcoiris cultivada; sin embargo esta es de aplicación intraperitoneal o por inmersión, lo cual resulta estresante y complicado en los peces. La creación de una vacuna recombinante, cuya vía de aplicación no sea intraperitoneal, es una estrategia ideal para lograr la prevención de la enfermedad (Caswell y otros, 1986; Tarrab, 1995). Una de las estrategias modernas para generar vacunas de administración oral es la creación de vacunas recombinantes mediante la expresión de proteínas en plantas transgénicas. Esta tecnología aún no se ha aplicado a la piscicultura, pero sería una alternativa adecuada para una vacunación masiva en granjas acuícolas (Coll, J.M. y Rocha, A., 2000).

Conclusiones

La importación de organismos acuáticos vivos destinados a la acuicultura y el crecimiento de esta actividad han provocado un incremento en la incidencia de enfermedades infecciosas, entre ellas la necrosis pancreática infecciosa, padecimiento viral que afecta principalmente a los salmónidos causando mortalidad en crías y alevines, lo cual resulta en importantes pérdidas económicas, ya que la enfermedad se transmite rápidamente y los peces adultos pueden fungir como transmisores del virus. Se ha demostrado que el IPNV es una enfermedad emergente, no solo en nuestro país, sino que se ha encontrado a nivel mundial; por lo tanto es necesario, no solo su control, sino un método de prevención eficaz, el cual a la fecha no se ha desarrollado. La vacunación sería una forma efectiva de prevención; sin embargo, el desarrollo de la misma resulta complicado, debido a las características particulares que esta debiera tener para producir una respuesta inmune adecuada en peces, la cual, tiene que ser estudiada más ampliamente.

Se ha demostrado que la proteína estructural VP2 de IPNV produce inmunidad. Nosotros estamos trabajando en la expresión de los genes que codifican para la proteína estructural VP2 de IPNV con el fin de obtener una proteína recombinante como parte de la estrategia para el desarrollo de una vacuna comestible, la cual se pretende que fuera la adecuada para una vacunación masiva en granjas acuícolas.

Sin embargo, existen interrogativas que debiéramos tomar en cuenta en futuros estudios, debido a la variación, la cual hace más compleja la enfermedad. Como por ejemplo: ¿por qué algunos reservorios no son sensibles al virus, puesto que no se presenta la sintomatología?; ¿los nueve diferentes serotipos afectarán con la misma intensidad a la misma especie o es que se presentan diferencias?; ¿cuál sería la adecuada estrategia para inducir una inmunidad efectiva en peces?; ¿esta estrategia también será la adecuada para otras especies que son afectadas por el virus, como el cangrejo?, etcétera.

Una infinidad de cuestionamientos que deben ser resueltos, los cuales ayudarían a controlar o prevenir esta enfermedad infecciosa que se sigue distribuyendo ampliamente en el mundo.

Referencias bibliográficas

- IDYLL, C.P.: "Capacitación en acuicultura: México. Contribuciones al estudio de las pesquerías de México", Programa de Investigación y Fomento Pesquero México-PNUD-FAO-CEMP, 1974, 12.
- MADIGAN, M.T.; J.M. MARTINKO y J. PARKER: *Brock Biology of microorganisms*, EEUU, Prentice Hall, 9a. ed., 2000, 991 pp.
- BLAKE, SHARON; L. WILLIAM; B.S. PHILIP; E. MC. MING-KUANG; L. JOHN y L.N. BRUCE: "Detection and Identification of Aquatic Birnaviruses by PCR Assay". *Journal of Clinical Microbiology*, 1995, 835-839.
- PRONALSA, CONAPESCA, *Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuicola y la Red de Diagnostico*, México, DF, año 1, vol. 1, n. 4 (1998).
- PRONALSA, CONAPESCA, *Boletín del Programa Nacional De Sanidad Acuicola y la Red de Diagnostico*, México, DF, año 3, vol. 4, n. 12 (2000)
- PRONALSA, CONAPESCA, *Boletín del Programa Nacional De Sanidad Acuicola y la Red de Diagnostico*, México, DF, año 3, vol. 3, n. 15 (2001).
- BOOTLAND, L.M.; P. DOBOS y M.W. STEVENSON: "Fry age and size effects on immersion immunization of brook trout, *Salvelinus fontinalis* Mitchell, against infectious pancreatic necrosis virus", *Journal of fish diseases*, 13 (1990), 113-125.
- BOOTLAND, L.M.; P. DOBOS y M.W. STEVENSON: "Immunization of Adult Brook Trout, *Salvelinus fontinalis*, fails to prevent the infectious pancreatic necrosis virus carrier state, *Journal of fish diseases*, 18 (1995), 449-458.
- CHRISTIE, K.E.: "Immunization with viral antigens: infectious pancreatic necrosis", *Journal of Virology*, vol. 24, 78 (2004), 13829-13838.
- COLL, J.M. y A. ROCHA: "Investigación actual en vacunas para la acuicultura", *Revista Acuatic*, 2000.
- COLL, J.M. y M. FERNÁNDEZ: "Vacunas de DNA en acuicultura", Centro de Investigación en Sanidad Animal, 1998.
- COSWELL-RENO, P.; P.W. RENO y B.L. NICHOLSON: "Monoclonal Antibodies to Infectious Pancreatic Necrosis Virus. Analysis of Viral Epitopes and Comparison of Different Isolates", *Journal of virology*, 67 (1986), 2193-2205.
- DOPAZO, C.P. y J. BARJA: "Diagnosis and Identification of IPNV in Salmonids by Molecular Methods", *Kluwer Academic Publishers* (2002), 23-48.
- FROST P.; L.S. HAVARSTEIN; B. LYGREN; S. STAHL; C. ENDRESEN y K.E. CHRISTIE: "Mapping of neutralization epitopes on infectious pancreatic necrosis viruses, *Journal of General Virology*, 76 (1995), 1156-1172.
- GUERRERO M.; B.L. CAB; G.L. WONG y J.M. VIADER: "Biotecnología de proteínas recombinantes para la aplicación en acuicultura", en: *Memorias del VII Simposium Internacional de Nutricion Acuicola*, 2004.
- HEPPELL, J. y H.L. DAVIS: "Application of DNA vaccine technology to aquaculture", *Advanced Drug Delivery*, 43 (2000), 29-43.
- JORGENSEN, J.B.; L. JOHANSEN; K. STEIRO y A. JOHANSEN: "CpG DNA Induces protective antiviral Immune Responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), *Journal of General Virology*, vol. 77, n. 21 (2003).
- KERR, C.R.C. y C.O. CUNNINGHAM: "Moving molecular diagnostics from laboratory to clinical application: a case study using infectious pancreatic necrosis virus serotype A", *Letters in Applied Microbiology*, 43 (2006), 98-104.
- KIM C.H.; M.C. JONHSON; J.D. DRENNAN; B.E. SIMON; E. THOMANN y J.C. LEONG: "DNA Vaccines Encoding Viral Glycoproteins Induce Nonspecific Immunity and Mx Protein Synthesis in Fish", *Journal of Virology*, vol. 74, n. 15 (2000), 7048-7054.
- LEONG, J.C.; M. ALONSO; D. LEISY; T. LEWIS, B. ROBERTSEN; B. SIMON; C.B. SONG y E. THOMANN: "Genetic Vaccines for Aquaculture", *Technology Aquaculture Interfase* (2002).
- LÓPEZ-LASTRA, M.M.; M. JASHES y A.M. SANDINO: "A Detection method for infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) based on reverse transcription (RT)-polymerase Chain reaction (PCR)", *Journal of fish Diseases*, 17 (1994), 269-282.
- MOON, C.H.; J.W. DO; S.J. CHA; J.D. BANG; M.A. PARK; D.J. YOO; J.M. LEE; H.G. KIM; D.K. CHUNG y J.W. PARK: "Comparison of the immunogenicity of recombinant VP2 and Vp3 of infectious pancreatic necrosis virus and marine Birnavirus", *Archives of*



Adán SÁENZ: Torso.

- Virology*, 149 (2004), 2059-2068.
- LORENZEN N. y S.E. LAPATRA: "DNA vaccines for aquacultures fish", *Rev.Sci.Tech*, 24 (2005), 201-213.
- ORTEGA, C.; R. MONTES DE OCA; G.Y. CARMENCITA; N. BRUCE y B. SHARON: "Case Report: Viral Infectious Pancreatic Necrosis in Farmed Rainbow Trout from México", *Journal of Aquatic Animal Health*, 14 (2002), 305-310.
- RODAK L.; Z. POSPISIL; J. TOMÁNEK; T. VELSĚLY; T. OBR y L. VALICEK: "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in culture fluids and tissue homogenates of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson", *Journal of General Virology*, 11 (1998), 225-235.
- RODRÍGUEZ S. J.; J.J. BORREGO y S.I. PÉREZ-PRÍETO: "Comparative evaluation of five serological methods and RT-PCR assay for the detection of IPNV in fish", *Journal of virology*, 97 (2001), 23-31.
- SALGADO, C. "Necrosis pancreática infecciosa: enfermedad emergente en la truiticultura de México", *Veterinaria México*, vol. 37, n. 004 (2006), pp. 467- 477.
- SONG, H.S.; N. EVENSEN y V.N. VAKHARIA: "Molecular determinants of Infectious Pancreatic Necrosis Virus Virulence and Cell Culture Adaptation", *Journal of Virology*, 79 (2005), 10289-10299.
- TAKSDAL, T.; B.H.DANNEVIG y E. RIMSTAD: "Detection of infectious pancreatic necrosis (IPN)-virus in experimentally infected Atlantic salmon parr by RT-PCR and cell culture isolation", *Bull. Eur. Ass. Fish pathol*, 21, 5 (2001), 214.
- TARRAB, E.S.; S. BERTHIAUME; S.GROTHE; M. O'CONNOR-Mc COURT; J. HEPPELL y J. LECOMTE: "Evidence of a Major Neutralizable Conformational Epitope Region on VP2 of IPNV", *Journal of virology*, 76 (1995), 551-558.
- CHEN, Thomas: "Increase of fish Innate Immune Response by Transgenesis", ICES CM, 2002.
- VILLANUEVA, R.A.; J.L.GALAZ; J.A. VALDEZ; M.M. JASHE'S y A.M. SANDINO: "Genome ensamble and particle Maturation of the *Birnavirus* Infectious Pancreatic necrosis Virus", *Journal of Virology*, vol. 78, n. 24 (2004), 13829-13838.
- VINITNANTHARAT, S.; K. GRAVNINGEN y E. GREGER: "Fish Vaccines Advances in Veterinary Medicine", *Journal of virology*, vol. 41 (1999), 539-550.
- WATTS, M.; B.I. MUNDAY y C.M. BURKE: "Immune responses of teleost fish", *Aust Vet j*, 8, vol. 79 (2001).
- WAY-SHYAN, W.; W. YEA-LING y L. JAINN-SHYAN: "Single-tube, non-interrupted reverse transcription PCR for detection of IPNV", *Dis Aquat Org*, 28 (1997), 229-233.
- CUTRIN, J.M.; J.G. OLVEIRA; J.L. Barja y C.P. DOPAZO: "Diversity of Infectious Pancreatic Necrosis Virus Strains Isolated from Fish, Shellfish, and Other Reservoirs in Northwestern Spain", *Applied And Environmental Microbiology*, vol. 66, n. 2 (2000).
- KUN YAO y N.V. VIKRAM: "Generation of Infectious Pancreatic Necrosis Virus from Cloned cDNA", *Journal of Virology*, vol. 72, n. 11 (1998), 8913-8920.
- SANTI, N.; H. SONG; N.V. VIKRAM y E. ØYSTEIN: "Infectious Pancreatic Necrosis Virus Vp5 Is Dispensable For Virulence And Persistence", *Journal of Virology*, vol. 79, n. 14 (2005), 9206-9216.
- HJALMARSSON, A.; E. CARLEMALM y E. EVERITT: "Infectious Pancreatic Necrosis Virus: Identification Of A Vp3- Containing Ribonucleoprotein Core Structure and Evidence for O-Linked Glycosylation Of The Capsid Protein Vp2", *Journal of Virology*, vol. 73, n. 4 (1999), 3484-3490. ©



Adán SAENZ: Corazones.