

Short Communication

Genotipificación y relación hospedador-específica del virus de la necrosis pancreática infecciosa en Chile

Pamela Torres¹, Yoanna Eissler¹, David Tapia², Juan Carlos Espinoza¹ & Juan Kuznar¹

¹Centro de Investigación y Gestión de Recursos Naturales
Instituto de Química y Bioquímica Facultad de Ciencias
Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile

²Doctorado en Acuicultura, Programa Cooperativo Universidad de Chile
Universidad Católica del Norte, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile
Corresponding author: Yoanna Eissler (yoanna.eissler@uv.cl)

RESUMEN. Se analizaron muestras de órganos (riñón y bazo) de las principales especies de salmónidos cultivados en Chile a través de la reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR anidado) para detectar la presencia del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV). La técnica resultó ser eficiente y sensible, permitiendo amplificar material genético del virus para su secuenciación directamente desde los tejidos, incluso desde muestras que no pudieron ser aisladas en cultivo celular. A través del análisis filogenético se detectaron los dos genogrupos descritos previamente en el país, *i.e.*, europeo (Genogrupo 5) y americano (Genogrupo 1), siendo cuantitativamente predominantes los IPNV del Genogrupo 5 (78,8%). Dentro del Genogrupo 1, se observó claramente la formación de un sub-grupo de virus chilenos separados de las cepas de referencia (*e.g.*, WB, VR-299), por lo que se propone su denominación como genotipo chileno. Adicionalmente, se observó una relación estadística-mente significativa hospedador-específica entre los genogrupos identificados: los virus del Genogrupo 5 provienen de *Salmo salar* mientras que los del Genogrupo 1 provienen de *Oncorhynchus mykiss* u *O. kisutch* ($P < 0,001$). La asociación de esta relación hospedador-específica con la virulencia puede proveer información importante para el manejo y control de IPNV en Chile.

Palabras clave: virus, IPNV, PCR anidado, genotipificación, filogenia, relación hospedador-específica, gen VP2.

Genotyping and host-specific relationship of infectious pancreatic necrosis virus in Chile

ABSTRACT. Samples of fish organs (kidney and spleen) from the main salmonid species farmed in Chile were analyzed through the nested polymerase chain reaction (nested PCR) to detect the presence of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). The technique proved to be efficient and sensitive, allowing amplification of viral genetic material for sequencing directly from tissue, even from samples that could not be isolated in cell culture. The phylogenetic analysis showed the two genogroups previously described in the country, *i.e.*, European (Genogroup 5) and American (Genogroup 1), being the IPNV that belong to Genogroup 5 the dominant one (78.8%). It is clear that the Chilean IPN viruses are clustered within the Genogroup 1 forming a sub-group that is separated from the reference strains (*e.g.*, WB, VR-299), hence we propose its denomination as a Chilean genotype. Additionally, a statistically significant host-specific relationship was observed between the genogroups identified: viruses from Genogroup 5 were detected in *Salmo salar*, while the ones from Genogroup 1 were detected in *Oncorhynchus mykiss* or *O. kisutch* ($P < 0.001$). The association of this host-specific relationship with the virulence can provide important information for the management and control of IPNV in Chile.

Keywords: virus, IPNV, nested PCR, genotyping, phylogeny, host-specific relation, VP2 gene.

El virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) es el agente causante de la necrosis pancreática infecciosa (IPN), enfermedad que afecta principalmente a salmónidos cultivados en condiciones de producción intensiva. Se le atribuyen mortalidades en la fase de alevín de hasta el 100% y de 10 a 20% en *post-smolts* luego de su traspaso a jaulas en el mar (Evensen & Santi, 2008).

La enfermedad presenta alta prevalencia y se encuentra diseminada en la mayoría de los países donde se cultivan salmones (Munro & Midtlyng, 2011). En Chile, el primer reporte y caracterización del virus se realizó en 1984 (McAllister & Reyes, 1984; Espinoza *et al.*, 1985); sin embargo, pasaron varios años hasta que se constató la presencia de la enfermedad en 1998 (Taud & Palacios, 2003). Desde entonces, la enfermedad se extendió rápidamente por las diferentes áreas de cultivo del país, afectando principalmente a alevines de salmón del Atlántico (*Salmo salar*), aunque también ha sido reportada en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) (SERNAPESCA, 2015). Actualmente, IPN es considerada endémica y prevalente en Chile, y según los últimos informes sanitarios publicados por el Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA), el virus IPN es uno de los patógenos detectado con mayor frecuencia por laboratorios de diagnóstico y una de las principales causas de mortalidad por enfermedades prevalentes que afectan a salmones (SERNAPESCA, 2013, 2014b, 2015).

El IPNV pertenece al género *Aquabirnavirus*, cuyos integrantes se caracterizan por tener un genoma ARN de doble cadena, que consta de dos segmentos, A (3.097 pb) y B (2.787 pb) (Dobos, 1995). El segmento A posee dos marcos de lectura abierta (ORF) superpuestos: el más grande codifica para una poliproteína de 106 kDa en el orden NH₂-pVP2-NS-VP3-COOH y el más pequeño codifica para un polipéptido rico en arginina, conocido como VP5 (Duncan *et al.*, 1987; Dobos, 1995). Por otro lado, el segmento B codifica para el polipéptido VP1 de 94 kDa que corresponde a la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp). Esta proteína se encuentra presente en dos formas: como un polipéptido libre o unido covalentemente al extremo 5' de los dos segmentos del ARN genómico (VPg) (Dobos, 1995).

Actualmente los *Aquabirnavirus* se clasifican en base a la secuencia de la región codificante de la proteína VP2 en 8 genogrupos. La primera clasificación filogenética fue propuesta por Blake *et al.* (2001), donde se describió la presencia de 6 genogrupos, compuestos por diferentes cepas de origen europeo, americano y asiático. Posteriormente, Nishizawa *et al.* (2005) revelaron la existencia de un séptimo genogrupo

integrado únicamente por cepas japonesas, y recientemente en Australia se aisló un nuevo *Aquabirnavirus* desde trucha arcoíris, que fue clasificado en un octavo genogrupo (McCowan *et al.*, 2015; Mohr *et al.*, 2015). En Chile, los virus IPN que han sido caracterizados genéticamente pertenecen a los Genogrupos 1 y 5, *i.e.*, norteamericanos y europeos, respectivamente (Eissler *et al.*, 2011; Mutoloki & Evensen, 2011; Calleja *et al.*, 2012; Tapia *et al.*, 2015; Jorquera *et al.*, 2016), dentro de los cuales forman sus propios subtipos o subgrupos (Tapia *et al.*, 2015). Sin embargo, existe muy poca información acerca de la predominancia de cada uno de estos genogrupos y su interacción con las distintas especies hospedadoras de salmónidos cultivadas en el país.

La reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR anidado) ha probado ser una técnica de detección rápida y sensible para el IPNV (Rimstad *et al.*, 1990; López-Lastra *et al.*, 1994; Barlič-Majanga *et al.*, 2002; Cutrín *et al.*, 2005), ya que permite amplificar y concentrar el material genético del virus y detectarlo aun en casos en que los títulos virales son muy bajos (Alonso *et al.*, 1999). Debido a esto, la técnica puede ser utilizada para la amplificación y posterior secuenciación de un segmento del genoma del IPNV directamente desde muestras de tejidos de peces, sin la necesidad de realizar el aislamiento en cultivo celular de los virus, acortando considerablemente el tiempo para su genotipificación.

El objetivo de este trabajo es realizar la genotipificación de virus IPN, directamente a partir de muestras de órganos de salmónidos, para determinar la predominancia de cada uno de los genogrupos identificados y establecer si existe una relación hospedador-específica entre estos genogrupos y las especies de salmónidos cultivados en Chile.

Para esto, se tomaron muestras de órganos (riñón y bazo) de peces salmónidos de las tres especies cultivadas en el país y se fijaron en etanol al 95%. Las muestras fueron colectadas entre noviembre 2009 y agosto 2015, en 19 localidades diferentes, tanto de centros de agua dulce como de mar, y corresponden a mortalidad fresca (código CUP) o de centros en los cuales previamente se registró mortalidad por IPN. Muestras con el mismo código fueron colectadas en el mismo centro o piscicultura (Tabla 1).

En el laboratorio, los órganos fijados fueron homogeneizados con un mortero en PBS tampón 1X, pH 7,2 y centrifugados a 2.000 g por 15 min a 4°C en una centrífuga MIKRO 22R (Hettich zentrifugen). Posteriormente, se extrajo el sobrenadante para luego ser almacenado a -20°C hasta el momento de su análisis.

Tabla 1. Información de las muestras de virus IPN utilizadas en este estudio. *Virus reportados en el trabajo de Tapia *et al.* (2015).

Código muestra	Fecha muestreo	Especie infectada	Estado de desarrollo	Origen ambiental	Origen geográfico	Número de acceso
P1-P10	nov-09	<i>S. salar</i>	Alevín	Agua dulce	Cochamó	JN163859 JN163860 JN163861 JN163862 JN163863 JN163864 JN163865 JN163866 JN163867 JN163868
CUP44	ago-10	<i>S. salar</i>	Engorda	Mar	Fiordo Cupquelán	JN180649
CUP24	ago-10					JN180651
CUP60	oct-10					JN180653
CUP58	oct-10					JN180650
CUP68	oct-10					JN180654
CUP52	oct-10					JN180652
IHJS1	may-12	<i>O. mykiss</i>	Alevín	Agua dulce	Cochamó, Río Patas	KF735904*
IHJS3	may-12					KF735905*
RV02	nov-12	<i>S. salar</i>	Alevín	Agua dulce	Pta. Arenas/km17,5 Norte	KF735914*
RV06	nov-12					KF735916*
MADA1	nov-12	<i>S. salar</i>	Alevín	Agua dulce	Chayahué-Pargua	KF735912*
CNJJ1	nov-12	<i>S. salar</i>	Alevín	Agua dulce	Chayahué-Pargua	KF735897*
CNJJ2	nov-12					KF735898*
CNJJ3	nov-12					KF735899*
ATS3	dic-12	<i>S. salar</i>	Engorda	Mar	Estero de Reloncaví, Punta Chaparano	KU605637
DANN3	dic-12	<i>S. salar</i>	Engorda	Mar	Isla Tranqui-Pta. Pompon	KF735900*
KOMA4	dic-12	<i>S. salar</i>	Alevín	Agua dulce	Río Pescado, Puerto Varas	KF735909*
KOMA5	dic-12					KF735910*
KOMA6	dic-12					KF735911*
ADMV1	mar-13	<i>O. mykiss</i>	Smolt	Río	Río Maullín, Chuyaquén	KF735886*
ADMV2	mar-13					KF735887*
EBPS1	ago-13	<i>S. salar</i>	Engorda	Mar	Hualaihué	KU605647
EBPS2	ago-13					KU605648
EBPS3	ago-13					KU605649
MPMA1	ago-13	<i>S. salar</i>	Engorda	Mar	Contao, Hualaihué, Seno de Reloncaví	KU605641
MPMA2	ago-13					KU605642
CGCP1	nov-13	<i>S. salar</i>	Engorda	Mar	Canal Aysén	KU605643
CGCP3	nov-13					KU605644
CGCP4	nov-13					KU605645
CGCP5	nov-13					KU605646
IPNV01.3	ene-14	<i>S. salar</i>	Smolt	Lago	Lago Puyehue	KU605656
IPNV03.8	feb-14	<i>O. mykiss</i>	Alevín	Río	Sector Vivanco, Río Bueno	KU605657
IPNV03.9	feb-14					KU605658
ABCD1	feb-14	<i>O. kisutch</i>	Juvenil	Lago	Lago Rupanco	KU605638
ABCD3	feb-14					KU605639
LKJH4	feb-14	<i>O. kisutch</i>	Juvenil	Lago	Lago Rupanco	KU605654
LKJH6	feb-14					KU605655
PITR2	mar-14	<i>O. mykiss</i>	Alevín	Río	Río Pilmaiquén, Sector La Poza	KU605640

Continuación

Código muestra	Fecha muestreo	Especie infectada	Estado de desarrollo	Origen ambiental	Origen geográfico	Número de acceso
AYCH1	abr-14	<i>S. salar</i>	Engorda	Mar	Isla Luz	KU605650
AYCH3	abr-14					KU605651
AYCH4	abr-14					KU605652
AYCHV1	abr-14					KU605653
CHMD1	ago-15	<i>S. salar</i>	Engorda	Mar	Isla Traiguén	KU605661
CHMD2	ago-15					KU605662
SFAA1	ago-15	<i>S. salar</i>	Smolt	Mar	Rada Potrereros de Cholgo	KU605659
SFAA2	ago-15					KU605660

La extracción del ARN viral se realizó directamente desde el homogeneizado de tejido. Se tomó un total de 720 μL del homogeneizado de cada muestra y se extrajo el material genético utilizando el kit E.Z.N.A.TM Total RNA Kit I (OMEGA bio-tek) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza del ARN total extraído fue determinada mediante la medición de absorbancia a 260 y 280 nm usando el espectrofotómetro MaestroNano® (Maestrogen). Las muestras cuya concentración fue >10 ng ARN total μL^{-1} fueron diluidas en proporción de 1:10, mientras que las que presentaron una concentración >100 ng de ARN total μL^{-1} fueron diluidas a razón de 1:100.

Una vez obtenido el material genético se amplificó una región de 1.180 pb del gen de la proteína VP2 mediante la técnica de RT-PCR utilizando el equipo PCR Multigene (Labnet). Para esto, se mezclaron 3 μL de ARN viral con los partidores A1F (5'-TGAGA TCCATTATGCTTCCAGA-3') y A2R (5'-GACAG GATCATCTTGGCATAGT-3') (Blake *et al.*, 1995) a una concentración final de 0,5 μM con 10 μL del 2X Master Mix Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green qRT-PCR (Stratagene), 0,8 μL de RT/RNase block y 4,2 μL de agua libre de ARNasas en un volumen total de reacción de 20 μL . La reacción se desarrolló en base al siguiente perfil de temperaturas: 42°C por 30 min para la retrotranscripción, 95°C por 3 min para la inactivación de la retrotranscriptasa y activación de la polimerasa, 35 ciclos de 95°C por 30 s para desnaturalización, 58°C por 30 s para hibridación y 72°C por 100 s para la elongación, y la extensión final a 72°C por 10 min.

El producto amplificado fue utilizado como templado para realizar una segunda amplificación y así completar el proceso de PCR anidado. Este segundo PCR consistió en amplificar un fragmento de una longitud esperada de 523 pb. Para esto, se mezclaron 1,5 μL del templado con los partidores WB1 (5'-CCGC AACTTACTTGAGATCCATTATGC-3') (Williams *et al.*, 1999) y AIR (5'-GTCTCGTCCTCWAGBCG GACGTATG-3') (Tapia *et al.*, 2015) a una concen-

tración final de 0,5 μM , 15 μL de 2X DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific) y 10,5 μL de agua libre de ARNasas en un volumen total de reacción de 30 μL . La reacción se desarrolló en base al siguiente perfil de temperaturas: 95°C por 5 min para la activación de la ADN polimerasa Taq, 35 ciclos de 95°C por 30 s para desnaturalización, 60°C por 30 s para hibridación y 72°C por 45 s para la elongación, y la extensión final a 72°C por 10 min.

El fragmento amplificado resultante del PCR anidado se separó mediante electroforesis en gel de agarosa a una concentración de 1,2%. Una vez diferenciadas las bandas, éstas se cortaron y se transfirieron a tubos de microcentrifuga, para luego ser purificadas usando el kit E.Z.N.A.TM Gel Extraction Kit (OMEGA bio-tek) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido de cada muestra fue eluido con 55 μL de agua grado biología molecular. Los productos purificados se secuenciaron por duplicado en Macrogen Inc., Corea, usando un analizador de ADN modelo ABI3730XL (Applied Biosystems).

Las secuencias obtenidas se compararon y clasificaron en base a cepas de referencia de birnavirus acuáticos chilenos y extranjeros disponibles en Genbank y reportadas en publicaciones científicas (*i.e.*, Blake *et al.*, 2001; Eissler *et al.*, 2011; Mutoloki & Evensen, 2011; Calleja *et al.*, 2012; Ruane *et al.*, 2015; Jorquera *et al.*, 2016). Además se incluyen algunas muestras utilizadas también en el trabajo realizado por Tapia *et al.* (2015) (ver Tabla 1). El análisis y edición de las secuencias se realizó con el programa MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2013), por medio de un alineamiento múltiple de secuencias utilizando el algoritmo *ClustalW* (Thompson *et al.*, 1994). Posteriormente, se construyó un árbol en base a la composición de los aminoácidos derivados de las secuencias con el método de *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei, 1987) usando el modelo de sustitución distancia p. La validez estadística de los resultados obtenidos con el árbol, se evaluó mediante el método estadístico *Bootstrap* con 1.000 ciclos de iteraciones.

La técnica de PCR anidado utilizada permitió confirmar de manera rápida y eficiente la presencia de IPNV en las muestras analizadas, tomando el proceso completo no más de un día. Adicionalmente, con el producto obtenido de la segunda ronda de PCR se secuenció un fragmento de la proteína VP2 de 523 pb aproximadamente. Con este fragmento se construyó un árbol filogenético condensado (Fig. 1), donde se muestran solo los Genogrupos 1 y 5. Es importante recalcar que en este estudio, se trabajó directamente a partir de muestras de tejido infectado de peces y no con aislados virales; por lo que la técnica permite obtener material genético para realizar la secuenciación y posterior genotipificación de los virus sin tener que realizar el laborioso proceso de cultivo celular e infección, que puede tardar más de dos semanas. Esto fue confirmado en el trabajo de Tapia *et al.* (2015) donde algunas de las muestras analizadas aquí, fueron también aisladas en células CHSE-214 y posteriormente amplificadas de forma convencional para su secuenciación, obteniendo secuencias casi idénticas a las obtenidas mediante el PCR anidado. De esta forma, la técnica del PCR anidado permitió incluso amplificar muestras con material genético de virus que no pudieron ser aislados en cultivo celular (*i.e.*, CUP, P1-10, ATS3, PITR2, IPNV03, AYCH, AYCHV, IHJS, MADA, DANN y ADMV). Otros autores han logrado resultados similares a los descritos en este trabajo, Cutrín *et al.* (2005) por ejemplo, comparó los métodos de aislamiento en cultivo celular, RT-PCR y PCR anidado, para la detección de IPNV en muestras de sangre de turbot (*Scophthalmus maximus*) asintomáticos. Los resultados mostraron, que ambas técnicas basadas en PCR fueron más sensibles que el aislamiento en cultivo celular; y además la técnica de PCR anidado logró detectar IPNV en un mayor número de peces muestreados en comparación con el RT-PCR.

El análisis filogenético a nivel de aminoácidos (Fig. 1) muestra que los virus de este estudio se clasifican dentro de los dos genogrupos previamente reportados en el país, el Genogrupo 1 y 5 (Eissler *et al.*, 2011; Mutoloki & Evensen, 2011; Calleja *et al.*, 2012; Tapia *et al.*, 2015; Jorquera *et al.*, 2016). En la Figura 1 se observan dos subgrupos dentro del Genogrupo 5, el 5A que incluyó los virus reportados para Chile, en este y otros trabajos anteriores y el 5B que agrupó cepas de origen australiano. En el Genogrupo 1 se distinguen a su vez tres subgrupos, uno correspondiente a los genotipos 1-3 del análisis filogenético mostrado por Blake *et al.* (2001), otro solamente compuesto por el genotipo 4 y un último compuesto únicamente por los virus chilenos de este estudio y los reportados en trabajos previos. Este subgrupo también fue reportado por Tapia *et al.* (2015), por lo que sugerimos que este

clúster sea considerado como un genotipo chileno dentro del Genogrupo 1. La única excepción a este subgrupo es la cepa VUV/84, que corresponde a la cepa original aislada en 1984 en Chile y mantenida en cultivo celular desde esa fecha. Esto podría estar asociado a que dentro de una población viral se espera que se genere un sinnúmero de variantes genéticas en su continua búsqueda de eficacia biológica, por lo que la población viral resultante se origina en respuesta adaptativa a esta dinámica (Domingo *et al.*, 2000). Sin embargo, el genoma de la cepa VUV/84, no ha sido sometido a la misma presión selectiva ni ha competido con la actual población de virus chilenos en los procesos de mutación, por lo que no formaría parte de este clúster. Al analizar en conjunto los datos publicados de todos los virus IPNV secuenciados en Chile durante los últimos años (Eissler *et al.*, 2011; Mutoloki & Evensen, 2011; Calleja *et al.*, 2012; Tapia *et al.*, 2015; Jorquera *et al.*, 2016), se observa que están distribuidos en todas las regiones del país donde hay producción masiva de salmónidos (*i.e.*, Los Ríos, Los Lagos, Aysén y Magallanes), y que existe una predominancia de las cepas clasificadas en el Genogrupo 5 (78,8%) sobre el Genogrupo 1 (21,2%) (Tabla 2). Además, el virus infecta a todas las especies de salmónidos cultivadas en el país, con una mayor incidencia en *S. salar*, como también lo demuestran los informes sanitarios de SERNAPESCA, donde esta especie es la que muestra mayor porcentaje de mortalidad causada por IPNV y el mayor número de diagnósticos de la enfermedad (SERNAPESCA, 2014a).

En la Tabla 2 se observa que, para este trabajo, todos los IPNV chilenos del Genogrupo 1, fueron detectados en trucha arcoíris (*O. mykiss*) o salmón coho (*O. kisutch*), mientras que los virus del Genogrupo 5 se encontraron en salmón del Atlántico (*S. salar*), indicando una posible relación hospedador-específica de los genogrupos identificados. Esta relación, también se observó al realizar el análisis de todos los virus secuenciados y reportados en el país, donde el 100% de los virus clasificados dentro del Genogrupo 1 resultó ser del género *Onchorhynchus* y el 97,6% del Genogrupo 5 fue detectado en *S. salar* (Tabla 2). Sin embargo, esta asociación no es exclusiva, como se reporta en el trabajo realizado por Callejas *et al.* (2012), donde virus clasificados como Sp (Genogrupo 5) por la técnica de RT-PCR en tiempo real fueron detectados en muestras de truchas arcoíris. Asimismo, se han secuenciado aislados provenientes de alevín de trucha arcoíris (Tapia *et al.*, 2015) y salmón coho (Jorquera *et al.*, 2016), que resultaron clasificados dentro del Genogrupo 5. Para probar estadísticamente la asociación entre los genogrupos, a nivel de género y es-

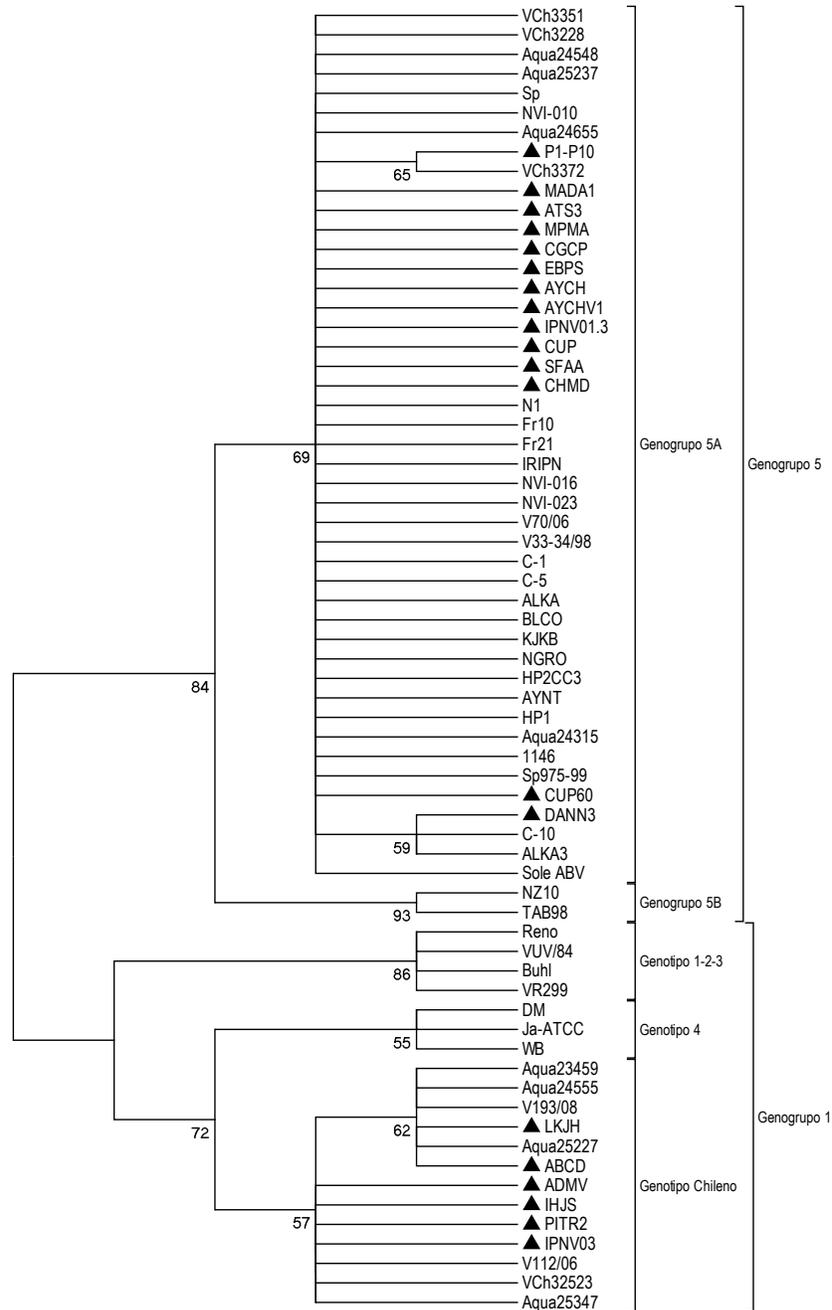


Figura 1. Árbol filogenético condensado construido en base a las secuencias de aminoácidos deducidas de VP2 mediante el método de *Neighbor-Joining* con un *bootstrap* de 1000 iteraciones. El grado de cercanía entre las secuencias se calculó mediante el método de distancia p. Los triángulos negros representan a los virus secuenciados en este trabajo.

pecie, se realizó el test de exactitud de Fisher utilizando el sitio web GraphPad QuickCalcs (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency1/>), resultando la relación en ambos casos como altamente significativa entre las variables ($P < 0,001$). Este tipo de relación hospedador-específica también ha sido reportada para otros virus de salmónidos, como el virus de la Necrosis Hematopoyética Infecciosa (IHNV) en Norteamérica, donde la mayoría de los aislados de los genogrupos

denominados U y M, provienen predominantemente de salmón rojo (*Oncorhynchus nerka*) y trucha arcoíris, respectivamente (Garver *et al.*, 2003). Estudios basados en desafíos experimentales con ambas especies y genogrupos han mostrado que esta relación está asociada a una virulencia específica para cada hospedador (*i.e.*, mortalidad causada por la infección), la cual depende principalmente de la capacidad del virus de entrar en el pez hospedador y de replicarse rá-

Tabla 2. Información IPNV chilenos secuenciados. () Número de IPNV secuenciados, NR no reportado. *Sin considerar virus incluidos en Tapia *et al.* (2015). **Sin considerar virus incluidos en Tapia *et al.* (2015) y Jorquera *et al.* (2016).

Referencia	Región	Origen	IPNV Genogrupo 5		IPNV Genogrupo 1		Número de acceso
			Nº	Especies hospederas	Nº	Especies hospederas	
Mutoloki & Evensen (2011)	Los Lagos	Agua dulce	10	<i>S. salar</i>	-	-	HQ457169-HQ457178
Eissler <i>et al.</i> (2011)	Araucanía, Los Ríos, Los Lagos	Agua dulce	2	<i>S. salar</i>	3	<i>O. mykiss</i> (2) <i>O. kisutch</i> (1)	HQ738515- HQ738519
Calleja <i>et al.</i> (2012)	NR	Agua dulce	6	<i>S. salar</i>	1	<i>O. kisutch</i>	JN642215-JN642221
Tapia <i>et al.</i> (2015)	Araucanía, Los Lagos, Aysén, Magallanes	Agua dulce y mar	24	<i>S. salar</i> (23) <i>O. mykiss</i> (1)	5	<i>O. mykiss</i>	KF954910-KF954930/ KF735886-KF735900/ KF735903-KF735916
Jorquera <i>et al.</i> (2016)*	Los Ríos, Los Lagos, Aysén, Magallanes	Agua dulce y mar	11	<i>S. salar</i> (10) <i>O. kisutch</i> (1)	8	<i>O. mykiss</i> (1) <i>O. kisutch</i> (7)	KU609568-KU609576/ KU609580-KU609581/ KU609583-KU609587/ KU609589-KU609591/ KU609594-KU609602/ KU609606-KU609607/ KU609609-KU609613/ KU609615-KU609617
Este estudio**	Los Ríos, Los Lagos, Aysén, Magallanes	Agua dulce y mar	29	<i>S. salar</i>	5	<i>O. mykiss</i> (3) <i>O. kisutch</i> (2)	JN163859-JN163868/ JN180649-JN180654/ KU605637/ KU60563- KU605640/KU605642/ KU605644-KU605645/ KU605649-KU605654/ KU605657-KU605662
Total	Coquimbo, Araucanía, Los Lagos, Aysén, Magallanes	Agua dulce y mar	82	<i>S. salar</i> (80) <i>O. mykiss</i> (1) <i>O. kisutch</i> (1)	2	<i>O. mykiss</i> (11) <i>O. kisutch</i> (11)	

pidamente (Peñaranda *et al.*, 2009, 2011; Purcell *et al.*, 2009). De igual forma, la relación hospedador-específica encontrada en muestras de campo en este estudio podría ser confirmada mediante el desarrollo de un estudio de infección *in vivo* de ambos genogrupos del virus IPN en salmón del Atlántico y especies del género *Oncorhynchus*, para determinar si también está asociada al nivel de virulencia que estos genogrupos puedan presentar en cada especie. La confirmación de esta relación hospedador-específica mediante desafíos experimentales puede proveer información importante para el manejo y control del IPNV en Chile.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen especialmente a los inspectores de SERNAPESCA por su ayuda en la realización de los muestreos. Este estudio fue financiado por los siguientes proyectos: Proyecto SERNAPESCA R.E.Nº 1090 "Estudio de evaluación y estandarización de métodos de diagnósticos para la determinación del Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa IPNV";

Proyecto DIUV-CID N°01/03; Proyecto SUBPESCA R.EX N°1548, código 2013-32-17 "Identificación de cepas y nuevas variantes del Virus IPN y evaluación del impacto de éstas en atención a su distribución geográfica y características de cuadros clínicos", Proyecto "Evaluación hidrográfica y epidemiológica del Fiordo Cupquelán, Región Aysén (Primera Etapa)", Salmones Cupquelán S.A. y Proyecto FIP N° 2014-60: "Determinación de factores epidemiológicos de riesgo en la presentación clínica de la enfermedad Necrosis Pancreática Infecciosa".

REFERENCIAS

- Alonso, M., S. Rodríguez & S.I. Pérez-Prieto. 1999. Nested PCR improves detection of infectious hematopoietic necrosis virus in cells coinfecting with infectious pancreatic necrosis virus. *J. Virol. Meth.*, 81(1-2): 1-9.
- Barlič-Maganja, D., M. Štrancar, P. Hostnik, V. Jenčič & J. Grom. 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. *J. Fish Dis.*, 25(2): 73-80.
- Blake, S., J.Y. Ma, D.A. Caporale, S. Jairath & B.L. Nicholson. 2001. Phylogenetic relationships of aquatic birnaviruses based on deduced amino acid sequences of genome segment a cDNA. *Dis. Aquat. Org.*, 45(2): 89-102.
- Blake, S.L., W.B. Schill, P.E. McAllister, M.K. Lee, J.T. Singer & B.L. Nicholson. 1995. Detection and identification of aquatic birnaviruses by PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, 33(4): 835-839.
- Calleja, F., M.G. Godoy, J.G. Cárcamo, I. Bandín, A.J. Yáñez, C.P. Dopazo, F.S. Kibenge & R. Avendaño-Herrera. 2012. Use of reverse transcription-real time polymerase chain reaction (real time RT-PCR) assays with universal probe library (UPL) probes for the detection and genotyping of infectious pancreatic necrosis virus strains isolated in Chile. *J. Virol. Meth.*, 183(1): 80-85.
- Cutrín, J.M., C. López-Vázquez, J.G. Oliveira, S. Castro, C.P. Dopazo & I. Bandín. 2005. Isolation in cell culture and detection by PCR-based technology of IPNV-like virus from leucocytes of carrier turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *J. Fish Dis.*, 28(12): 713-722.
- Dobos, P. 1995. The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Annu. Rev. Fish Dis.*, 5: 25-54.
- Domingo, E., E. Baranowski, J.I. Núñez, C.M. Ruiz-Jarabo, S. Sierra, N. Molina & F. Sobrino. 2000. Cuasiespecies y evolución molecular de virus. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 19(1): 55-63.
- Duncan, R., E. Nagy, P.J. Krell & P. Dobos. 1987. Synthesis of the infectious pancreatic necrosis virus polyprotein, detection of a virus-encoded protease, and fine structure mapping of genome segment a coding regions. *J. Virol.*, 61(12): 3655-3664.
- Eissler, Y., M.S. Pavlov, P. Conejeros, J.C. Espinoza & J. Kuznar. 2011. Detection and quantification of Chilean strains of infectious pancreatic necrosis virus by real-time RT-PCR assays using segment b as a target. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 39(3): 544-552.
- Espinoza, E., G. Farías, M. Soler & J. Kuznar. 1985. Identity between Infectious Pancreatic Necrosis Virus VR-299 and a Chilean isolate. *Intervirology*, 24(1): 58-60.
- Evensen, Ø. & N. Santi. 2008. Infectious Pancreatic Necrosis Virus. In: B.W.J. Mahy & M.V.H. Van Regenmortel (eds.). *Encyclopedia of virology*. Elsevier, Oxford, pp. 83-89.
- Garver, K.A., R.M. Troyer & G. Kurath. 2003. Two distinct phylogenetic clades of infectious hematopoietic necrosis virus overlap within the Columbia River basin. *Dis. Aquat. Org.*, 55(3): 187-203.
- Jorquera, E., P. Morales, D. Tapia, P. Torres, Y. Eissler, J.C. Espinoza, P. Conejeros & J. Kuznar. 2016. Chilean IPNV isolates: robustness analysis of PCR detection. *Electron. J. Biotechnol.*, 20: 28-32.
- López-Lastra, M., M. Gonzalez, M. Jashes & A.M. Sandino. 1994. A detection method for infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) based on reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR). *J. Fish Dis.*, 17(3): 269-282.
- McAllister, P.E. & X. Reyes. 1984. Infectious pancreatic necrosis virus: Isolation from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, imported into Chile. *J. Fish Dis.*, 7(4): 319-322.
- McCowan, C., J. Motha, M.S. Crane, N.J. Moody, S. Crameri, A.D. Hyatt & T. Bradley. 2015. Isolation of a novel aquatic birnavirus from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in Australia. *Dis. Aquat. Org.*, 114(2): 117-125.
- Mohr, P.G., N.J. Moody, L.M. Williams, J. Hoad & M.S. Crane. 2015. Molecular characterization of Tasmanian aquabirnaviruses from 1998 to 2013. *Dis. Aquat. Organ.*, 116(1): 1-9.
- Munro, E.S. & P.J. Midtlyng. 2011. Infectious pancreatic necrosis and associated aquatic birnaviruses. In: P.T.K. Woo & D.W. Bruno (eds.). *Fish diseases and disorders. Volume 3: Viral, bacterial and fungal infections*. CAB International, Oxfordshire, pp. 1-65.
- Mutoloki, S. & O. Evensen. 2011. Sequence similarities of the capsid gene of Chilean and European isolates of infectious pancreatic necrosis virus point towards a common origin. *J. Gen. Virol.*, 92: 1721-1726.
- Nishizawa, T., S. Kinoshita & M. Yoshimizu. 2005. An approach for genogrouping of Japanese isolates of aquabirnaviruses in a new genogroup, VII, based on the VP2/NS junction region. *J. Gen. Virol.*, 86: 1973-1978.
- Peñaranda, M.M.D., M.K. Purcell & G. Kurath. 2009. Differential virulence mechanisms of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) include host entry and virus replication kinetics. *J. Gen. Virol.*, 90: 2172-2182.
- Peñaranda, M.M.D., A.R. Wargo & G. Kurath. 2011. *In vivo* fitness correlates with host-specific virulence of Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in sockeye salmon and rainbow trout. *Virology*, 417(2): 312-319.
- Purcell, M.K., K.A. Garver, C. Conway, D.G. Elliott & G. Kurath. 2009. Infectious hematopoietic necrosis virus genogroup-specific virulence mechanisms in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) from Redfish Lake Idaho. *J. Fish. Dis.*, 32(7): 619-631.

- Rimstad, E., E. Hornes, O. Olsvik & B. Hyllseth. 1990. Identification of a double-stranded RNA virus by using polymerase chain reaction and magnetic separation of the synthesized DNA segments. *J. Clin. Microbiol.*, 28(10): 2275-2278.
- Ruane, N.M., S.J. McCleary, L.J. McCarthy & K. Henshilwood. 2015. Phylogenetic analysis of infectious pancreatic necrosis virus in Ireland reveals the spread of a virulent genogroup 5 subtype previously associated with imports. *Arch. Virol.*, 160(3): 817-824.
- Saitou, N. & M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4(4): 406-425.
- Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA). 2013. Informe sanitario de salmonicultura en centros marinos año 2012. [https://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_remository&Itemid=246&func=startdown&id=6820]. Revisado: 12 Enero 2016.
- Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA). 2014a. Informe sanitario salmonicultura en centros marinos primer semestre año 2014. [https://www.sernapesca.cl/presentaciones/PPT_Informe%20Sanitario_1er_Semestre_2014.pdf]. Revisado: 12 Enero 2016.
- Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA). 2014b. Informe sanitario de salmonicultura en centros marinos año 2013. [https://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_remository&Itemid=246&func=fileinfo&id=8014]. Revisado: 12 Enero 2016.
- Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA). 2015. Informe sanitario de salmonicultura en centros marinos 1° semestre 2015. [https://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_remository&Itemid=246&func=fileinfo&id=14754]. Revisado: 12 Enero 2016.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski & S. Kumar. 2013. Mega6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 30(12): 2725-2729.
- Tapia, D., Y. Eissler, P. Torres, E. Jorquera, J.C. Espinoza & J. Kuznar. 2015. Detection and phylogenetic analysis of infectious pancreatic necrosis virus in Chile. *Dis. Aquat. Org.*, 117(3): 173-184.
- Taud, S. & S. Palacios. 2003. La acuicultura en Chile. TechnoPress y Salmon Chile, Santiago, 335 pp.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins & T.J. Gibson. 1994. Clustal w: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22(22): 4673-4680.
- Williams, K., S. Blake, A. Sweeney, J.T. Singer & B.L. Nicholson. 1999. Multiplex reverse transcriptase PCR assay for simultaneous detection of three fish viruses. *J. Clin. Microbiol.*, 37(12): 4139-4141.

Received: 29 February 2016; Accepted: 8 July 2016