La Serie Universitaria de la Fundación Juan March presenta resúmenes, realizados por el propio autor, de algunos estudios e investigaciones llevados a cabo por los becarios de la Fundación y aprobados por los Asesores Secretarios de los distintos Departamentos.

El texto íntegro de las Memorias correspondientes se encuentra en la Biblioteca de la Fundación (Castelló, 77. Madrid-6).

La lista completa de los trabajos aprobados se presenta, en forma de fichas, en los Cuadernos Bibliográficos que publica la Fundación Juan March.

Los trabajos publicados en Serie Universitaria abarcan las siguientes especialidades: Arquitectura y Urbanismo; Artes Plásticas; Biología; Ciencias Agrarias; Ciencias Sociales; Comunicación Social; Derecho; Economía; Filosofía; Física; Geología; Historia; Ingeniería; Literatura y Filología; Matemáticas; Medicina, Farmacia y Veterinaria; Música; Química; Teología. A ellas corresponden los colores de la cubierta.

Edición no venal de 300 ejemplares
que se reparte gratuitamente a investigadores,
Bibliotecas y Centros especializados de toda España.

Fundación Juan March

FJM-Uni 196-Est
Supervivencia de patógenos bacteriano
Estevez Toranzo, Alicia.
1031522
Biblioteca FJM

SERIE UNIVERSITARIA

Fundación Juan March

Alicia Estévez Toranzo

Supervivencia de patógenos bacterianos y virales de peces en sistemas de cultivo

196 Supervivencia de patógenos bacterianos y virales de peces en sistemas de cultivo/Alicia Estévez Toranzo.

FJM
Uni-
196
Est
196

Fundación Juan March (Madrid)

Fundación Juan March (Madrid)

Fundación Juan March

Serie Universitaria

196

FUNDACION JUAN MARCH
LIBRIS

Alicia Estévez Toranzo

Supervivencia de patógenos bacterianos y virales de peces en sistemas de cultivo

Fundación Juan March
Castelló, 77. Teléf. 435 42 40
Madrid-6

Fundación Juan March (Madrid)

Este trabajo fue realizado con una Beca de la Convocatoria de Dxtranjero, 1980, individual
Departamento de BIOLOGIA Y CIENCIAS AGRARIAS
Centro de trabajo: Division of Agricultural and Life Sciences. Department of Microbiology. University of Maryland. College Park, Maryland (USA)

Los textos publicados en esta Serie Universitaria son elaborados por los propios autores e impresos por reproducción fotostática.

Depósito Legal: M-40981-1982
I.S.B.N.: 84-7075-262-6
Impresión: Gráficas Ibérica. Tarragona, 34 - Madrid-7

Fundación Juan March (Madrid)

El creciente interés en todo el mundo en el cultivo de peces tanto en agua dulce como de mar, hace que estén aumentando los problemas asociados con patógenos de peces. Dentro de las medidas de control de estas enfermedades, el trabajo se centra en el estudio de los factores ambientales como temperatura, salinidad, pH..., que pueden influir en la estabilidad en el medio acuático de virus patógenos de peces salmónidos: **Virus de Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV) y Virus de la Necrosis Hematopoyética Infecciosa (IHNV),** así como de los patógenos bacterianos **Vibrio anguillarum** y **Pasteurella piscicida.** El conocimiento de las características del medio que influyen en la viabilidad de estos patógenos, permitirá adaptar a los peces a diferentes condiciones ambientales sin el gasto que ocasionarían otras medidas de control.

Fundación Juan March (Madrid)

Fundación Juan March (Madrid)

INDICE

		Página
I	INTRODUCCION	7
II.A.	SUPERVIVENCIA DE VIRUS DE PECES SALMONIDOS EN DIFERENTES TIPOS DE AGUA	16
	MATERIAL Y METODOS	16
	RESULTADOS	21
	DISCUSION	34
II.B.	SUPERVIVENCIA DE PATOGENOS BACTERIANOS EN EL MEDIO ACUATICO	38
	RESULTADOS	39
	DISCUSION	42
III.	BIBLIOGRAFIA	43

Fundación Juan March (Madrid)

Fundación Juan March (Madrid)

I. INTRODUCCION

Debido al creciente interés en todo el mundo en el cultivo de peces tanto de agua dulce como de mar, están aumentando de forma alarmante los problemas asociados con patógenos de peces ya sean bacterianos o virales. Esto hace necesario el desarrollo de medidas de control y erradicación de dichas enfermedades que tantas pérdidas están ocasionando en las piscifactorías y en la naturaleza.

Por otra parte, no basta con controlar la enfermedad, sino que es necesario prevenirla, por ello es interesante el perfeccionamiento de las técnicas de indentificación de estos patógenos aislados tanto a partir de aguas como de peces "portadores". La aplicación de estas técnicas en los peces, que procedentes de otras áreas geográficas, se intentan introducir en España por su mayor rendimiento, reduciría el riesgo de transmisión de nuevos patógenos a los especies autóctonas.

Generalmente se acepta que brotes de una enfermedad transmisible son el resultado de la interación entre el huesped, agente patógeno y medio. El mar abierto es muy estable pero en las aguas interiores y en piscifactorías, temperaturas extremas del agua, contenido bajo de Oxígeno disuelto, presencia de productos catabólicos de peces y polución, producen a menudo un "stress", que contribuye a brotes de enfermedades infecciosas o epizootias (Wedemeyer, 1974; Snieszko, 1978). Podemos definir Epizootiología como el estudio de la distribución y de los determinantes de la infección o enfermedad en el huesped y especies vectoras. Este conocimiento nos permitirá investigar métodos de transmisión y reservorios de infección para poder establecer su prevención y control.

La revisión más importante de virus de peces fue hecha por vez primera por Wolf en 1966, y desde entonces el número de virus

Fundación Juan March (Madrid)

conocidos, patógenos para peces, incrementa en cada revisión. En la actualidad, sólamente unos pocos virus de peces han sido caracterizados con suficiente detalle; sin embargo, basándonos en revisiones de Wolf (1976); Roberts (1978); McAllister (1979); Ahne (1979) y Pilcher & Fryer (1980), en el cuadro I Presentamos una clasificación de los virus o agentes denominados "like virus" patógenos para peces, conocidos hasta el momento.

Centramos el estudio en dos miembros representativos de virus de peces salmónidos: Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV) y Virus de la Necrosis Hematopoyética Infecciosa (IHNV), los cuales son de gran interés en todo el mundo ya que pueden causar mortalidades superiores al 90% de las piscifactorías en caso de epizootias.

El **virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV),** fue aislado por primera vez por Wolf (1960) en los E.E.U.U., pero a partir de 1969, el virus se aisló en diversas naciones Europeas como Dinamarca (Jorgensen & Kehlet, 1971), Suecia (Ljungberg & Jorgensen, 1973), Francia e Italia (Wolf & Quimby, 1971), Yugoslavia (Fijan, 1974), Inglaterra (Ball & col. 1971) y Noruega (Hastein & Krogsrud, 1976). Asimismo IPNV, fue aislado también en Japón por Sano (1971, 1972).

El rango de huéspedes de IPNV entre los salmónidos es muy amplio, afectando principalmente a los alevines de: **Salmo gairdneri** (Trucha arcoiris); **S. clarki; S. salar** (Salmón atlántico); **Salvelinus fontinalis; S. alpinus; Oncorhynchus nerka** (Salmón "sockeye"); **O. Kisutch** (Salmón "cocho"); **O. rhodurus.**

Análogamente IPNV fue aislado de salmónidos adultos (McKnight & Roberts, 1976; Yamamoto & Kilistuff, 1979; Swanson & Gillespie, 1979), así como de peces no salmónidos incluyendo carpa (**Cyprinus carpio**); perca **(Perca fluviatilis)**; lucio (**Esox**

Fundación Juan March (Madrid)

VIRUS	MORFOLOGIA	TAMAÑO (nm)	CARACTERISTICAS	LUGAR DE REPLICACION	CLASIFICACION
Virus del "Golden Shiner" (GSV)	Icosaédrica	61-82	RNA (cadena sencilla). Sin envoltura.	Citoplasma	Desconocida ("Reo-like")
Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV)	Icosaédrica	55-74	RNA (cadena doble). Sin envoltura. RNA-polimerasa.	Citoplasma	Desconocida ("Reo-like") BIRNAVIRIDAE(?)
Virus de la Necrosis Hematopoyética Infecciosa (IHNV)	Helicoidal (forma de "bala")	185 x 65	RNA (cadena sencilla). Envoltura lipídica. RNA-polimerasa.	Citoplasma	RHABDOVIRUS
Virus de la Septicemia Hemorrágica o "Egtved virus" (VHS)		185 x 65			
Rhabdovirus carpio o Viremia Primaveral de la Carpa (RCV o SVC)		160 x 70			
Rhabdovirus de los alevines de Lucio (PFR)		160 x 70			
Virus de la Anguila Europea (EVEX)		172 x 92			
Virus de la Anguila Americana (EVA)		143 x 68			
Virus del "Channel Catfish" (CCV)	Icosaédrica (compleja)	175-200	DNA (cadena doble). Envoltura lipídica.	Núcleo	HERPESVIRUS
Herpesvirus salmonis (HS)		150			
Herpesvirus "nerka" (NeVTA)		230			
Herpesvirus "scophthalmi"		200-220			
Virus asociado al Epitelioma Papiloso de Carpa (Carp pox)	Icosaédrica	140 -150	DNA (?)	Núcleo (?)	HERPESVIRUS (?)
Lymphocistis Virus (LCV)	Icosaédrica (compleja)	130-280	DNA (cadena doble). Envoltura lipídica.	Citoplasma	IRIDOVIRUS (?) (ICDV)
Virus de la Necrosis Eritrocítica de peces (PENV)	Icosaédrica	145-300	DNA (cadena doble)		

Cuadro I .- VIRUS PATOGENOS DE PECES y ENFERMEDADES CONSIDERADAS DE ETIOLOGIA VIRAL.

Fundación Juan March (Madrid)

VIRUS	MORFOLOGIA	TAMAÑO(nm)	CARACTERISTICAS	LUGAR DE REPLICACION	CLASIFICACION
Fibrosarcoma del Salmón Atlántico		~120			
Limfosarcoma del Lucio (ELV)		~100			
Hiperplasia epidérmica del Lucio	Compleja	120-150	RNA (cadena sencilla) Envoltura. Reverso-transcriptasa.	Citoplasma	RETROVIRUS (?) (Partículas tipo C)
Sarcoma dérmico del "Walleye"		~135			
Hiperplasia epidérmica del "Walleye"		~ 80			
Papiloma epidérmico del " White Sucker"		~100			
Virus Asociados a Neoplasias :					
Estomatopapiloma de Anguila (EVE)	Icosaédrica	52-56	DNA (?)	Núcleo (?)	PAPOVAVIRUS (?)
" " (EV-1)	Icosaédrica	(?)	DNA (?)	Núcleo (?)	Desconocida
" " (EV-2)	Pleomórfica	80-140	RNA (cadena sencilla)	Citoplasma	ARENAVIRUS (?)
Papilomatosis del Salmón Atlántico	Icosaédrica	100	DNA (?)	Núcleo (?)	ORTOMIXOVIRUS(?)
Papiloma del "Brown Bulhead"	Icosaédrica	50	DNA (?)	Núcleo (?)	PAPOVAVIRUS (?)
Papiloma Epidérmico de Pleuronéctidos	Icosaédrica	45 (?)	(?). Con envoltura	(?)	Desconocida
Virus del "Bluegill" (BGV)	Pleomórfico	80-100	RNA (cadena sencilla) Envoltura lipídica.	Citoplasma	ARENAVIRUS (?) PARAMIXOVIRUS(?) CORONAVIRUS (?) BUNYAVIRUS (?)
Agente de la "Grunt Fin"(GFA)	Helicoidal	130 x 100	RNA(estructura ?) Envoltura	Citoplasma	Desconocida
Necrosis Dérmica Ulcerativa (UDN)	Icosaédrica	30-33	(?). Sin envoltura	Citoplasma	Desconocida
Necrosis de las Branquias de Carpa	Icosaédrica	200-216	(?)	(?)	Desconocida

Cuadro I (cont.).- VIRUS PATOGENOS DE PECES y ENFERMEDADES CONSIDERADAS DE ETIOLOGIA VIRAL.

Fundación Juan March (Madrid)

lucius); lamprea (**Lampetra sp.**), entre otros (Hill, 1977; ahne, 1977, 1980; Munro & col. 1976).

Hay que tener en cuenta también que virus semejantes a IPNV (birnavirus), fueron aislados en otros animales acuáticos como Moluscos (Underwood & col. 1977) y crustaceos (Johson, 1977; Kuris & col. 1979).

El virus de la Necrosis Hematopoyética Infecciosa (IHNV) es un Rhabdovirus endémico de salmónidos de las costas del Pacífico de América el Norte, siendo aislado por primera vez por Wingfield & col. en 1969. Sin embargo posteriormente han ocurrido epizootias de este virus en Japón y en diversos estados de la costa este de U.S.A., afectando a diversas especies de salmones (**Oncorhynchus nerka, O. Keta, O. rhodurus, O. masou**) y a la trucha arcoiris (**Salmo gairdneri**), debido al transporte de huevos o peces infectados desde piscifactorías del Pacífico, como demostraron Plumb (1972); Wolf & col. (1973); Sano & col. (1977) y Carlisle & col. (1979).

La **transmisión** de estos virus de salmónidos (IPNV e IHNV) puede ser **vertical** por transmisión congénita de adultos "portadores" a alevines a través de los huevos (Wolf & col. 1973; Amed, 1975; Fijan & Giorgeti, 1978; Carlisle & col. 1979), o bien horizontal de pez a pez ya sea por canibalismo (ingestión de peces moribundos o desechos de peces) o por excrecciones urinarias, heces o secrecciones sexuales descargadas al agua (Wingfield & Chan, 1970; Leong & Turner, 1979; Amed, 1975). Este tipo de transmisión horizontal ocurre principalmente en las piscifactorías debido a la superpoblación.

En 1954, Griffin revisó la biología de las bacterias patógenas de peces mejor conocidas en esa época. Sin embargo, desde entonces se han hecho progresos significativos en muchos aspectos

Fundación Juan March (Madrid)

de los patógenos bacterianos. Más que en el aumento del número de bacterias patógenas, los mayores avances fueron en la taxonomía y mecanismo de patogénesis de los ya conocidos. Siguiendo las recomendaciones del "Fish Health Blue Book" (American Fisheries Society, 1979), en el **cuadro II** se muestra un resumen de los más representativos patógenos bacterianos de peces conocidos hasta el momento, así como un esquema de los pasos seguidos para su identificación y clasificación.

Las bacterias gram negativas han sido y son los patógenos de peces más abundantes. Dentro de ellos, se eligieron para los estudios de supervivencia, a dos importantes patógenos de peces en aguas salinas: **Vibrio** y **Pasteurella.**

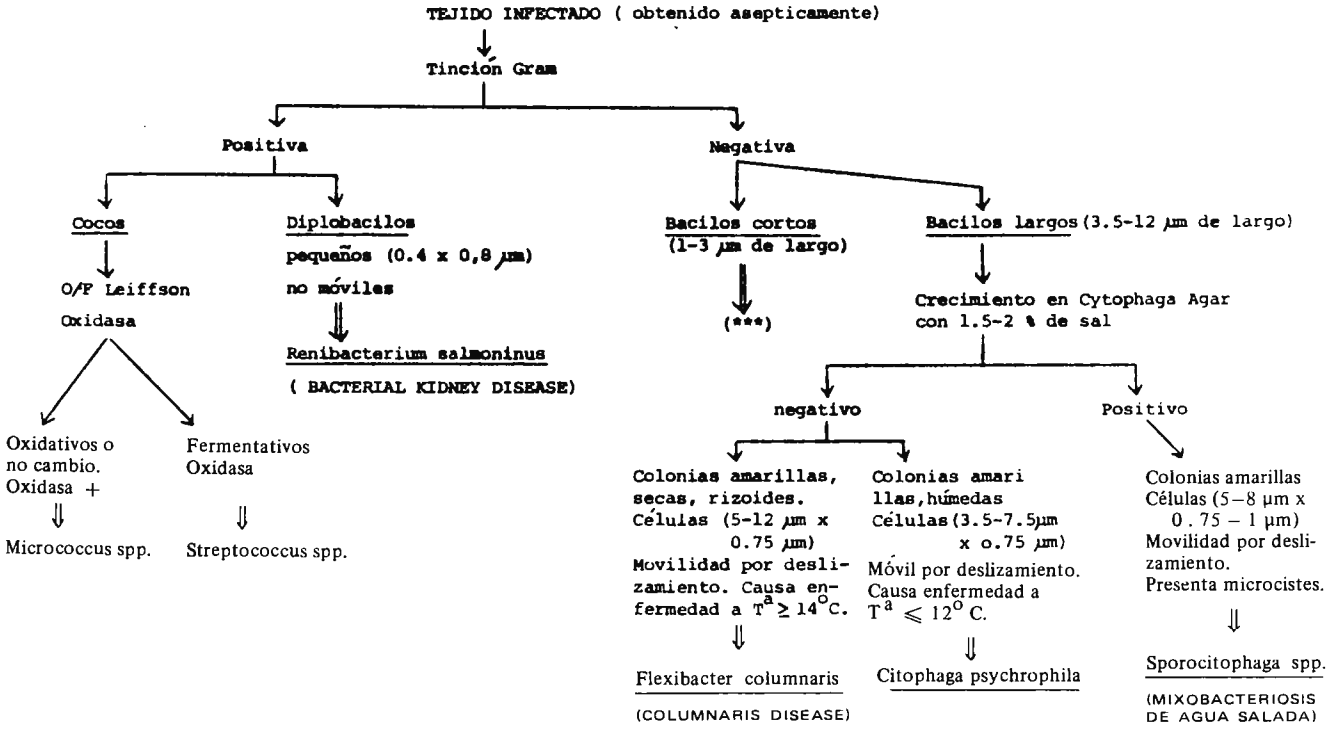
Vibriosis causada por **Vibrio anguillarum** ha sido particularmente desvastadora en el medio marino, afectando a salmónidos y a muchas otras especies de peces tanto anadromos como catadromos (Anderson & Conroy, 1970; Evelyn, 1971; Fryer & col. 1972; Strout & col. 1978; Tajima & col. 1981). Asimismo nosotros hemos caracterizado recientemente nuevas cepas de **V. anguillarum** patógenos para la lubina (**Morone saxatilis**) cultivada en aguas de Chesapeake Bay, Maryland, USA (Toranzo & col. 1982).

Aunque se ha prestado mucha atención en **V. anguillarum,** otros miembros del género **Vibrio** han sido implicados en epizootias bacterianas de peces cultivados y salvajes en todo el mundo (McCarthy, 1976; Muroga & col. 1976, 1979; Robohm & Brown, 1978; Kusuda & col. 1979).

V. anguillarum y otras especies de **Vibrios** se asociaron también a enfermedades en larvas de moluscos bivalvos y crustaceos (Tubiash & col. 1970; Di Salvo & col. 1978; Brown & Losee, 1978; Bowser & col. 1981). Aunque **V. anguillarum** infecta principalmente especies marinas, epidemias esporádicas de vibriosis han sido descritas en habitats de agua dulce.

Fundación Juan March (Madrid)

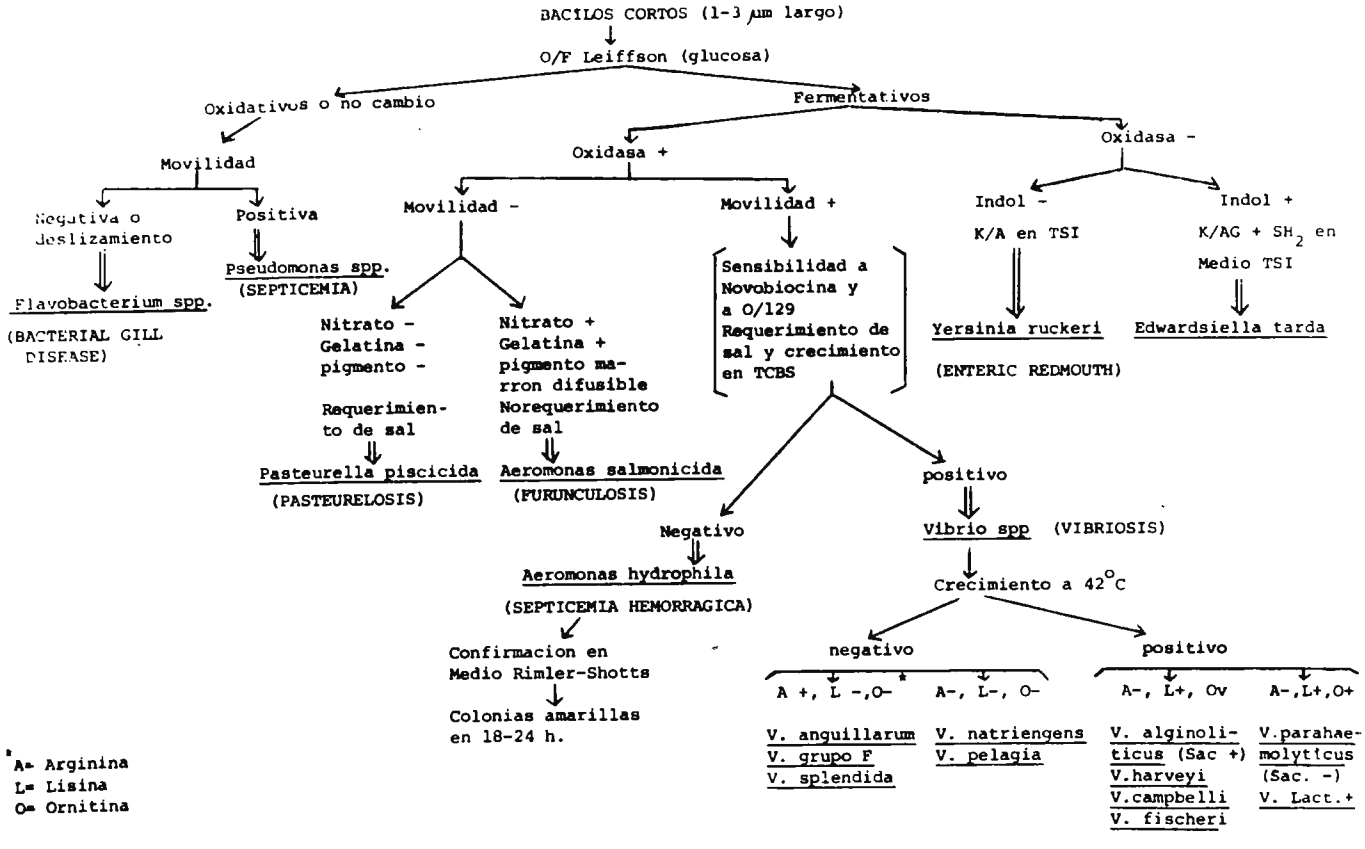
CUADRO II.– IDENTIFICACION PRESUNTIVA DE BACTERIAS ASOCIADAS CON ENFERMEDADES DE PECES



(***) Esquema de la identificación de bacilos cortos gram –, en hoja adjunta.

Fundación Juan March (Madrid)

CUADRO II (Cont.).- IDENTIFICACION DE BACILOS CORTOS GRAM NEGATIVOS ASOCIADOS CON ENFERMEDADES DE PECES



*A= Arginina
L= Lisina
O= Ornitina

Fundación Juan March (Madrid)

Pasteurella piscicida fue aislada por vez primera por Snieszco & col. (1964), a partir de perca (**Roccus americanus**) y lubina (**Morone saxatilis**) durante una epizootia en Chesapeake Bay, Maryland. Desde 1969, pseudotuberculosis bacteriana causada por **P. piscicida** ha sido asociada con serias mortalidades de "yellow tail" (**Seriola quinqueradiata**) Kusuda & Yamaoka, 1972; Simidu & Egusa, 191972; Koike & col. 1975) y de "black seabream" **Mylio macrocephalus**) (Muroga & col. 1977), en la costa oeste del Japón.

Las medidas para controlar las enfermedades de peces ya sean bacterianas o virales, siguen en general las siguientes líneas:

1.- Prevención del contacto del patógeno con el huesped
2.- Modificación de los factores ambientales que afectan a la viabilidad del patógeno.
3.- Inmunización.
4.- Quimioterapia.
5.- Obtención de stocks de peces resistentes a la enfermedad.
6.- Identificación de condiciones fisiológicas que hagan pez resistente a la enfermedad.

Es de gran importancia el conocimiento de los factores del medio como temperatura, salinidad, pH, etc. que pueden influir en la estabilidad de patógenos en el medio acuático. De esta forma será posible adaptar a los peces a diferentes condiciones ambientales sin el gasto que ocasionarían otras medidas de control. Esta parte del trabajo se centra en la segunda línea de control mencionada, estudiando la supervivencia de patógenos virales y bacterianos en diferentes tipos de agua.

Fundación Juan March (Madrid)

II.A) SUPERVIVENCIA DE VIRUS DE PECES SALMONIDOS EN DIFERENTES TIPOS DE AGUA.

El propósito de esta parte del trabajo es comparar simultáneamente los tiempos de supervivencia de dos miembros de virus de peces salmónidos, IPNV e IHNV, encondiciones que pueden encontrarse normalmente en la naturaleza, estudiando los factores físico-químicos del medio acuático que pueden disminuir la viabilidad de estos virus, con la posible aplicación práctica para el control de estas enfermedades en sistema de cultivo. Estos estudios de supervivencia se realizaron utilizando con fines comparativos el virus Polio 1 como modelo de enterovirus humano.

Se han examinado los siguientes puntos:

a) Supervivencia en agua dulce por ser vehículo de transmisión de estos virus.
b) Supervivencia en aguas de diferentes salinidades, por razones semejantes y por el interés actual en el cultivo de salmónidos en el medio marino.
c) Influencia de la temperatura en la estabilidad de cada virus.

MATERIAL Y METODOS

Cultivos celulares

Para la propagación y ensayos de los virus IPNV e IHNV, fue utilizada la línea contínua CHSE-214, procedente de embrión de salmón chino suministrada por el Dr. J. Fryer, Oregon state university, Corvallis, OR, USA. Para los ensayos virales del virus polio se emplearon células VERO, línea contínua de riñón de mono verde africano. Ambas líneas celulares fueron rutinariamente cul-

Fundación Juan March (Madrid)

tivadas con Minimum Essential Medium (MEM) de Eagle, suplementado con 10% de suero fetal de ternera (SFT) y conteniendo 100 u/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 50 µg/ml de gentamicina. Las células CHSE-214 se mantienen a 15ºC, mientras que las células VERO a 37ºC. Para los ensayos de infectividad viral, las células crecieron en placas de microcultivo utilizando medio L-15 con 10% de SFT.

Virus y obtención de stocks virales

El virus IPN (cepa VR-209) utilizado en este estudio, fue obtenido a partir de K. Wolf, National Fish Health Research Laboratory, Kearneysville, WV, USA; y el virus IHN (cepa Metolius) fue suministrado por J. Fryer, Oregon State university, OR, USA. El virus Polio 1 (cepa Mahoney) fue suministrada por el National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA.

La obtención de los stocks virales se llevó a cabo inoculando monocapas confluentes de células con las suspensiones virales a una baja multiplicidad de infección (m.o.i. < 0,1). Los cultivos se incuban a la temperatura apropiada para cada virus hasta avanzado efecto citopático (CPE). Las suspensiones celulares se centrifugan a 2.500 X g durante 10 min. para eliminar los restos celulares, y los sobrenadantes que contienen los virus se conservan a -70ºC, constituyendo los stocks virales de trabajo.

Ensayos virales: Titulación

Las titulaciones virales se llevaron a cabo mediante la técnica de Microtitulación, utilizando placas de 96 pocillos. Después de sembrar las placas con 4-5 x 10^4 cels. por pocillo, se adiciona a cada uno de ellos 0,1 ml de diluciones seriadas de cada virus, empleando 8 pocillos por dilución. Las placas

Fundación Juan March (Madrid)

inoculadas con Polio 1 se incuban durante 7 días a 37ºC en atmosfera húmeda conteniendo 5% de CO_2. Las placas inoculadas con IPNV e IHNV fueron incubadas 14 días a 15ºC. La determinación de la Dosis Infectiva 50% del cultivo de tejido ($TCID_{50}$/ml) se realiza según el método de Reed & Muench (1938).

Muestras de agua y análisis de parámetros fisicoquímicos y biólogicos.

Las muestras de agua fueron recogidas a una profundiad de 2-3 m, en tres lugares diferentes: **El agua dulce** procedió del Río Patuxent, Maryland, USA; **el agua de estuario** de Chesapeake Bay, MD, USA; **y el agua de mar** del Océano Atlántico en Lewes, Delaware, USA. Todas las muestras de agua se tomaron el mismo día de comienzo de los experimentos.

La salinidad fue determinada con un T/C refractómetro (American Optical, Buffalo, NY) y el Oxígeno disuelto se midió con un electrodo de Oxígeno YSI (modelo 51 A, Yellow Springs Instrument Co., Yellow Springs, OH).

La absorbancia a 254 nm fue medida en espectofotómetro Beckman modelo 25 (Beckman Instruments, Fullerton, CA). La absorbancia a la luz UV está relacionada con la materia orgánica soluble en el agua, y puede ser usada como una medida de polución.

El número de coliformes totales se determinó por el método del "Número Más Probables" (American Public Health Association, 1976), y se expresa como MPN/100 ml.

El número Total de bacterias aerobias heterótrofras fue determinado en medio "Upper Bay Yeast Stract" (Sayler & col. 1975) ajustándose a la apropiada concentración de sales de cada tipo de agua. El número de Unidades Formadoras de colonias (CFU/ml)

Fundación Juan March (Madrid)

se calculó a los 4-5 días de incubación a las mismas temperaturas utilizadas en los estudios de supervivencia.

Los datos de estos parámetros se representan en **Tabla 1.**

TABLA 1. CHARACTERISTIC OF WATER SAMPLES EMPLOYED

Parameters	**Freshwater**	**Estuarine water**	**Seawater**
Salinity ‰	0	6.5	29.0
pH	6.8	7.8	8.0
Dissolved oxygen (ppm) at 18º C	6.6	10.0	8.4
Ca^{+2} (mg/l)	10.7	76.7	342.0
Mg^{+2} (mg/l)	2.7	240.5	1.073
Total hardness (mg/l $CaCO_3$)	31.0	--	--
Turbidity (Absorbance at 254 nm)	0.142	0.083	0.031
Total coliformes (MPN/100 ml)[a]	93	1.100	9
Heterotrophic bacteria (TVC/ml)[b]	$1.1x10^5$	$8.7x10^4$	$4.1x10^4$

[a] MPN, Most Probable Number of coliforms

[b] TCV, Total Viable Counts of hererotrophic bacteria

--, Not determined

Fundación Juan March (Madrid)

Estudio de la supervivencia viral

Las muestras de agua fueron utilizadas sin filtración u otro tratamiento. Seis alicuotas de 100 ml de cada tipo de agua se repartieron en matraces de 250 ml.

Para preparar los inóculos virales, los stocks de Polio, IPN e IHN se centrifugan a 78.000 x g a 4ºC durante 2 h en una ultracentrífuga Beckman 13-50 utilizando un rotor SW 27. Los pellets virales fueron resuspendidos en agua desmineralizada, sonicados con el fin de romper los agregados virales e inoculados en los correspondientes matraces test. Esta parcial purificación fue realizada para minimizar la influencia de las proteínas o sales provenientes de las células o del medio de cultivo.

Los matraces fueron incubados a 15ºC y 20ºC en agitación (150 rpm). Las muestras de cada uno de los matraces se tomaron a los 5 min. (tiempo 0) y posteriormente a intervalos de 5-7 días hasta que no pudimos detectar infectividad viral residual. Periodicamente, alicuotas de las muestras de agua se ensayaron para determinar el número de heterótrofos totales, lo que permitió conocer la evolución de la microflora nativa durante todos los estudios de supervivencia.

Las tasas de inactivación Viral se determinaron siguiendo una cinética de primer orden $Nt/No = 10^{-Kt}$, en donde Nt es el título viral en una muestra a un determinado tiempo t, y No es el título viral en el tiempo 0.

Los estudios de supervivencia consistieron por tanto en **18 sistemas experimentales** representando:

- Tres virus: IPNV, IHNV y polio 1.
- Tres tipos de agua: dulce, estuario y oceánica.
- Dos temperaturas de incubación.

Fundación Juan March (Madrid)

RESULTADOS

Inactivación viral con relación al tipo de virus

Las tasas de inactivación de cada uno de los virus en los tres tipos de agua se representan en la **Fig. 1 y 2.**

- **IPNV**, presentó la mayor estabilidad en agua de estuario a 15ºC, con una pérdida de infectividad de 3 logs después de 27 días. Sin embargo en agua dulce y oceánica, las tasas de inactivación fueron similares a esta temperatura.

- **IHNV**, fue más estable en agua dulce a 15ºC, mientras que en aguas salinas los tiempos de supervivencia resultaron semejantes a ambas temperaturas.

- **Polio 1**, está muy influenciado por el tipo de agua. El $T_{99,9}$ en agua dulce fue tres veces superior que en agua de estuario y seis veces superior que en agua oceánica.

- Es de destacar, que el tiempo de supervivencia de cada uno de los virus a 20ºC fue independiente de la concentración de sales del agua (estuario o del mar).

Inactivación viral con relación al tipo de agua

En la **Fig. 3 y 4** y **tabla 2,** comparamos la diferente influencia de cada tipo de agua sobre la viabilidad de los tres virus:

- En **agua dulce**, polio 1 e IHNV sobre viven durante un periodo de tiempo más prolongado que IPNV, a las dos temperaturas ensayadas.

- En **agua de estuario**, IPNV fue el más estable de los tres virus a 15ºC, mostrando IHNV y Polio tasas de supervivencia infe-

Fundación Juan March (Madrid)

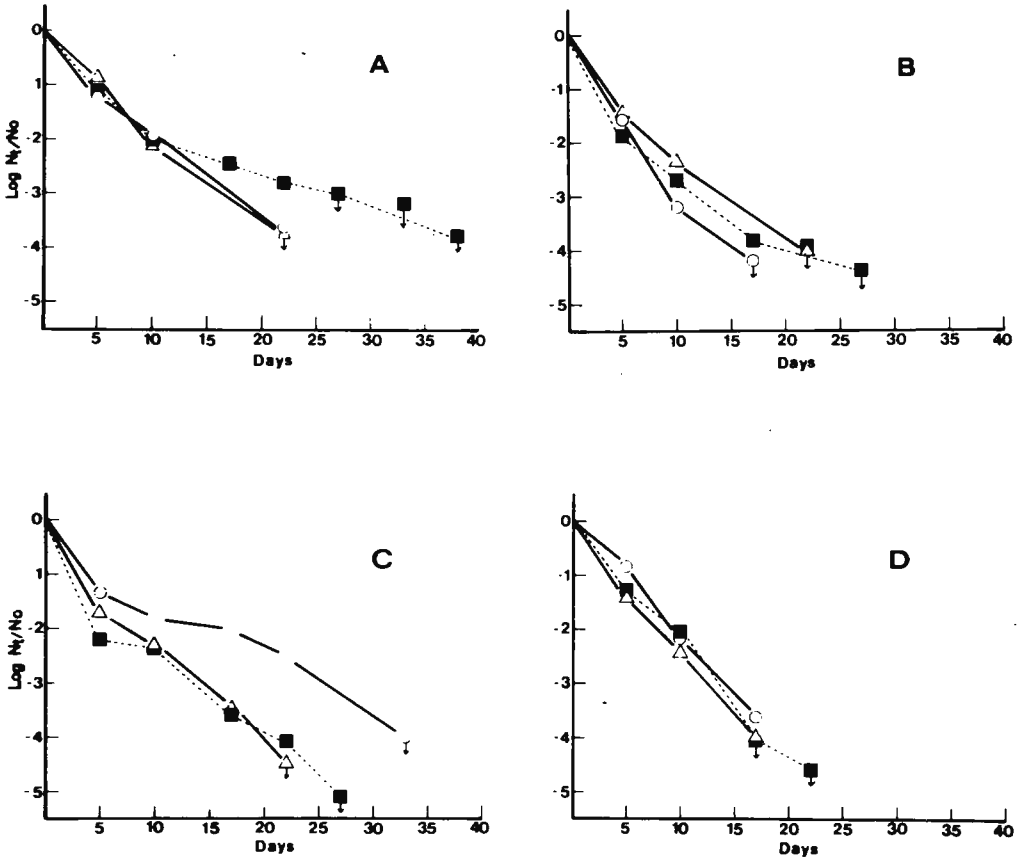


FIG. 1 .- INACTIVACION EN AGUA DULCE (—O—), AGUA DE ESTUARIO (—■—), y AGUA OCEANICA (—Δ—), DE LOS VIRUS IPNV a 15°C (A) y 20°C (B) e IHNV a 15°C (C) y 20°C (D).

Fundación Juan March (Madrid)

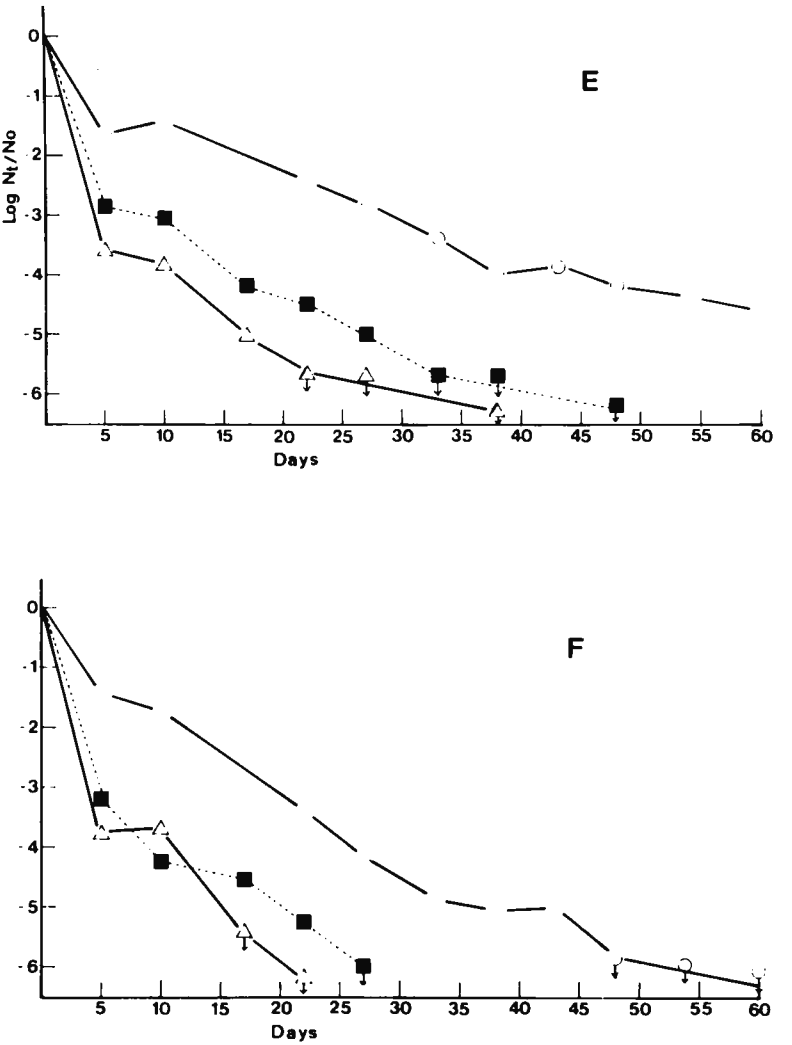


FIG. 2

- INACTIVACION EN AGUA DULCE (—O—), AGUA DE ESTUARIO (-■--) Y AGUA OCEANICA (—Δ—), DEL VIRUS POLIO 1 A 15°C (E) y 20°C (F).

Fundación Juan March (Madrid)

TIPO DE AGUA	TIPO DE VIRUS	TEMPERATURA DE INCUBACION	
		15°C.	20°C.
DULCE	Polio 1	29	19
	IPNV	17-18	9
	IHNV	25	14
ESTUARIO	Polio 1	10	4-5
	IPNV	27	12
	IHNV	14	13
OCEANICA	Polio 1	<5	<5
	IPNV	17	14
	IHNV	14	12

TABLA 2 .- INACTIVACION VIRAL CON RESPECTO AL TIPO DE AGUA. Tiempo necesario (en días), para una reducción del 99,9 % en el Título viral($T_{99,9}$).

Fundación Juan March (Madrid)

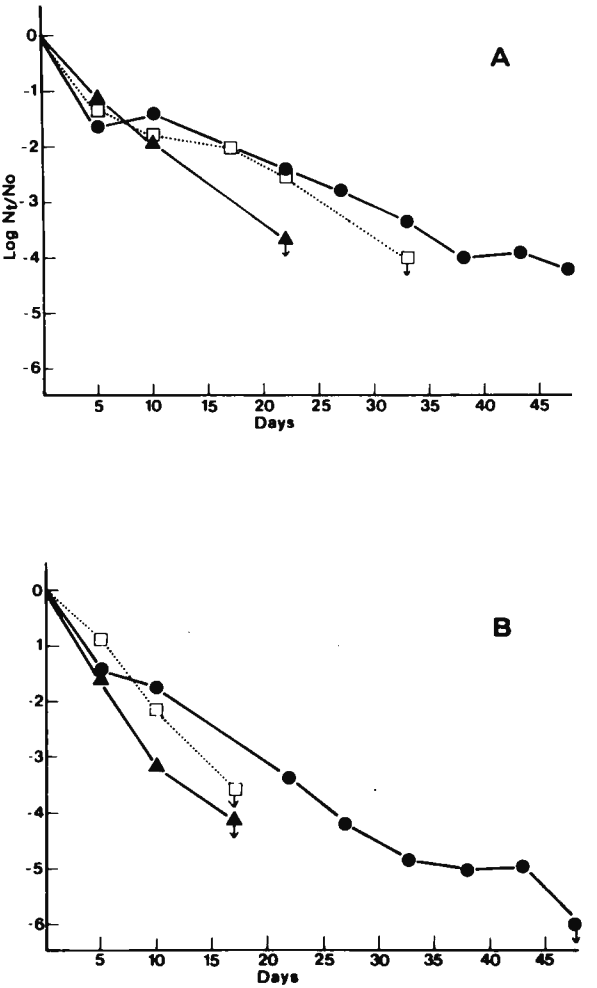


FIG. 3.

- INACTIVACION DE LOS VIRUS IPNV (—▲—), IHNV (···□···) Y POLIO 1 (—●—), EN AGUA DULCE A 15°C (A) y 20°C (B).

Fundación Juan March (Madrid)

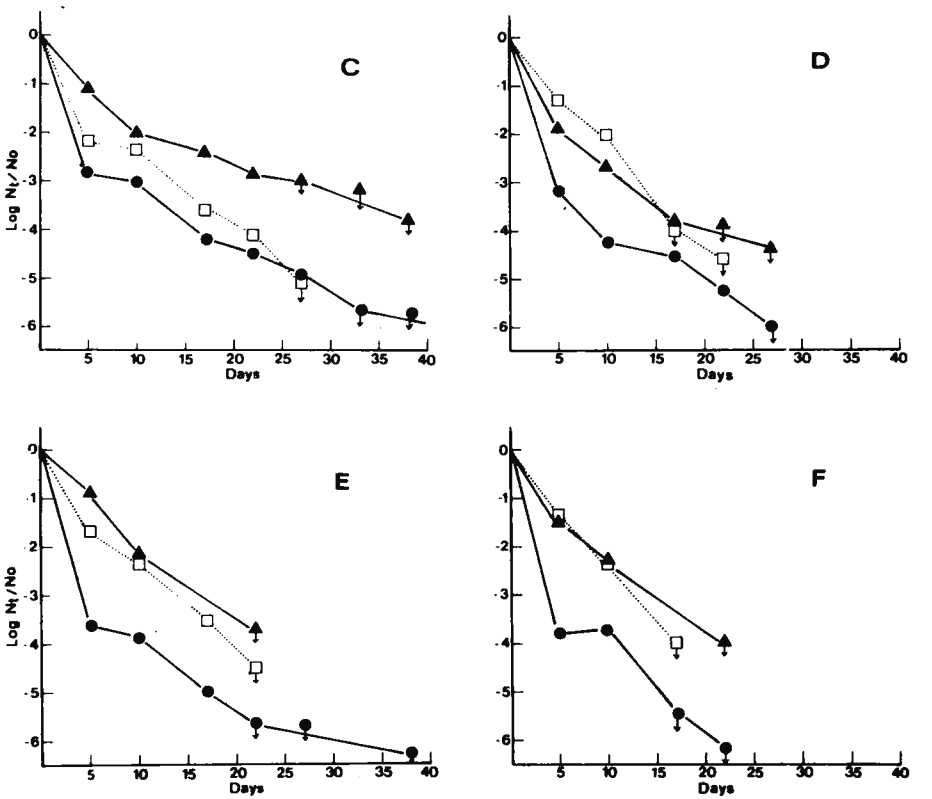


FIG. 4 .- INACTIVACION DE LOS VIRUS IPNV (—▲—), IHNV (···□···) Y POLIO 1 (—●—), EN AGUA DE ESTUARIO A 15°C (C) Y 20°C (D) y EN AGUA OCEANICA A 15°C (E) y 20°C (F).

Fundación Juan March (Madrid)

riores y más próximas entre sí. A 20ºC, sin embargo los dos virus de salmónidos presentaron un descenso paralelo de infectividad.

- En **agua oceánica**, el virus polio sobrevivió durante un período de tiempo mucho más corto que ambos virus de peces con una pérdida de infectividad de 3 logs en menos de 5 días, tanto a 15ºC como a 20ºC.

- Se puede decir que en general en aguas salinas (estuario y del mar) los virus de salmónidos tiene una mayor estabilidad que polio, mientras que en agua dulce el virus polio fue el más estable de los tres virus.

Influencia de la Temperatura

A pesar de la proximidad de las temperaturas ensayadas, se puede observar la característica general del efecto de la temperatura en la supervivencia viral, ya que a medida que la temperatura de incubación se incrementa, la estabilidad viral es más rápida.

- En agua dulce la temperatura tuvo una influencia importante en la supervivencia de los tres virus. Así como ejemplo, el $T_{99,9}$ de IPNV pasó de 17 días a 15ºC a 9 días a 20ºC **(Fig. 5)**.

-En agua de estuario, la temperatura ejerció su mayor efecto en la estabilidad del IPNV, mientras que en agua de mar la influencia de la temperatura en la supervivencia viral fue muy poco importante **(Fig. 6 y 7)**.

Variación de la flora bacteriana autóctona en cada tipo de agua a las diferentes temperatura

En los tres tipos de agua, a las dos temperaturas, la máxima concentración bacteriana tuvo lugar enre 5-10 días, que se corres

Fundación Juan March (Madrid)

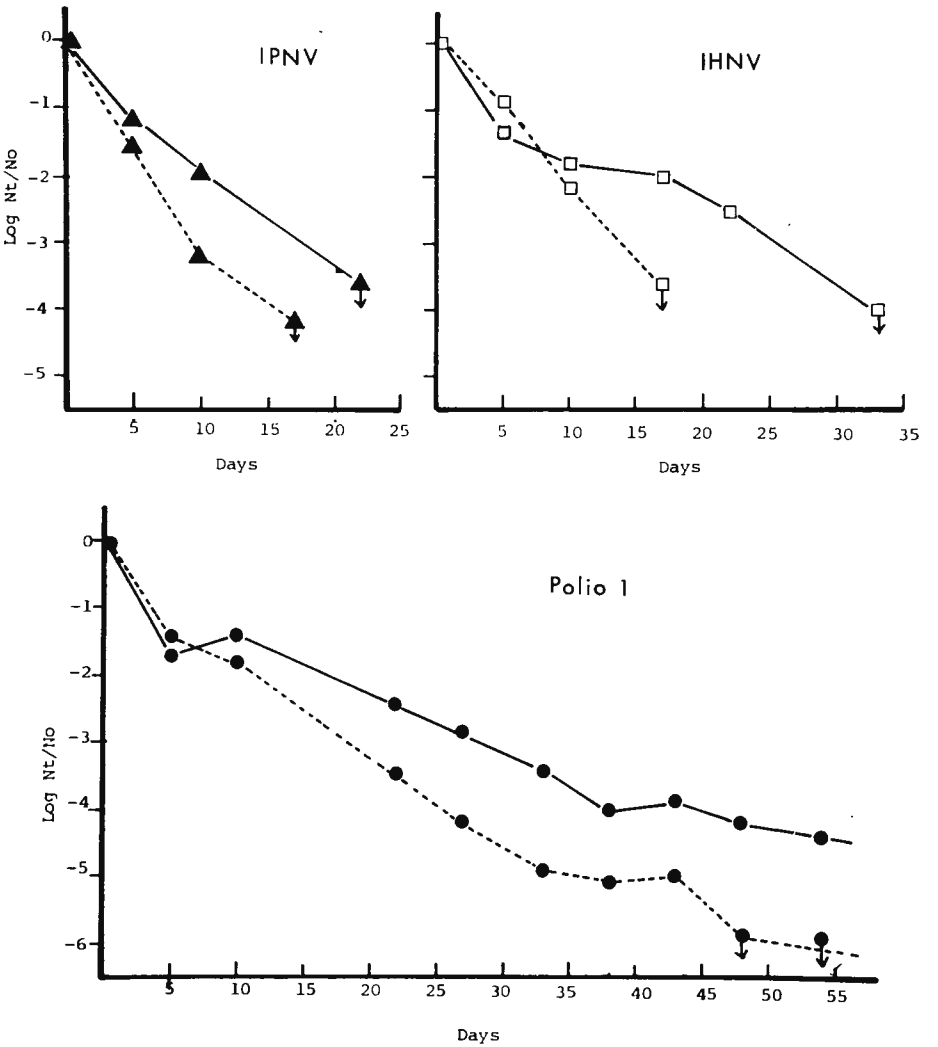


Fig. 5.- Influencia de la Temperatura en la Supervivencia de Polio 1 (●), IPNV (▲) e IHNV (□) en Agua de Río a 15°C. (——) y a 20°C.(----)

Fundación Juan March (Madrid)

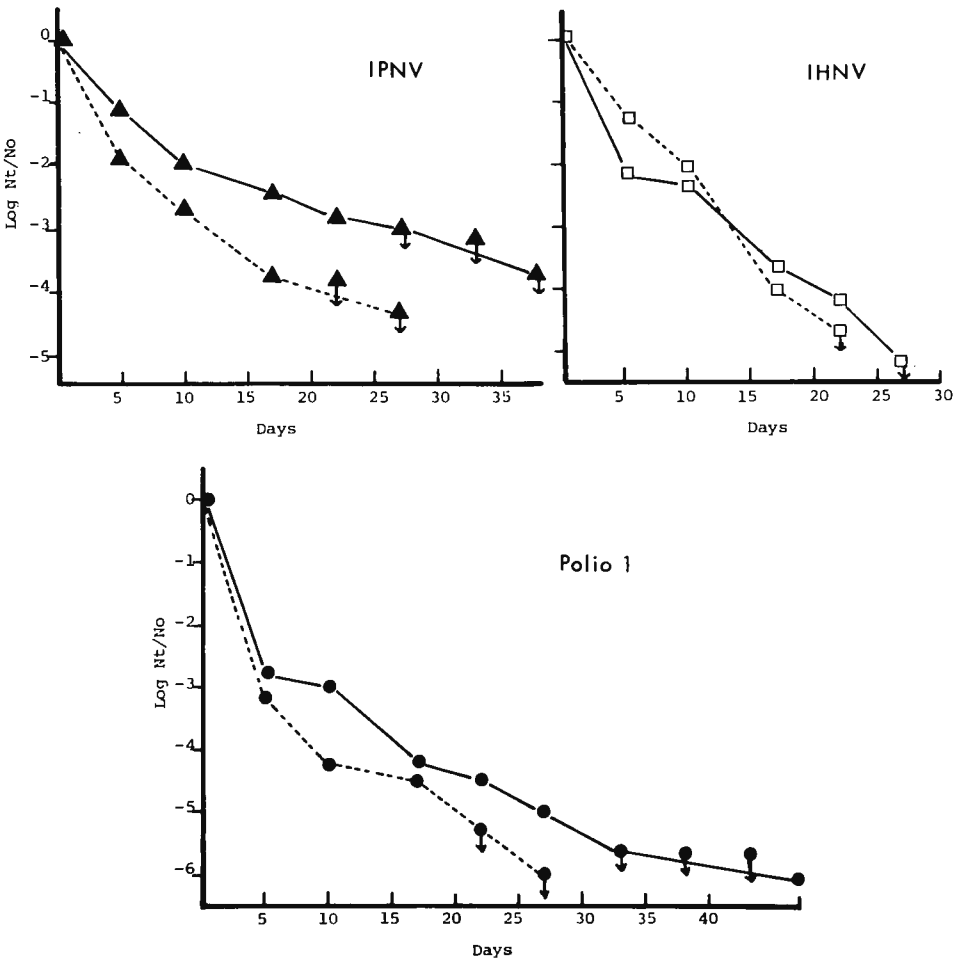


Fig. 6.- Influencia de la Temperatura en la Supervivencia de Polio 1 (●), IPNV (▲) e IHNV (□) en Agua de Estuario a 15°C. (——) y a 20°C. (----).

Fundación Juan March (Madrid)

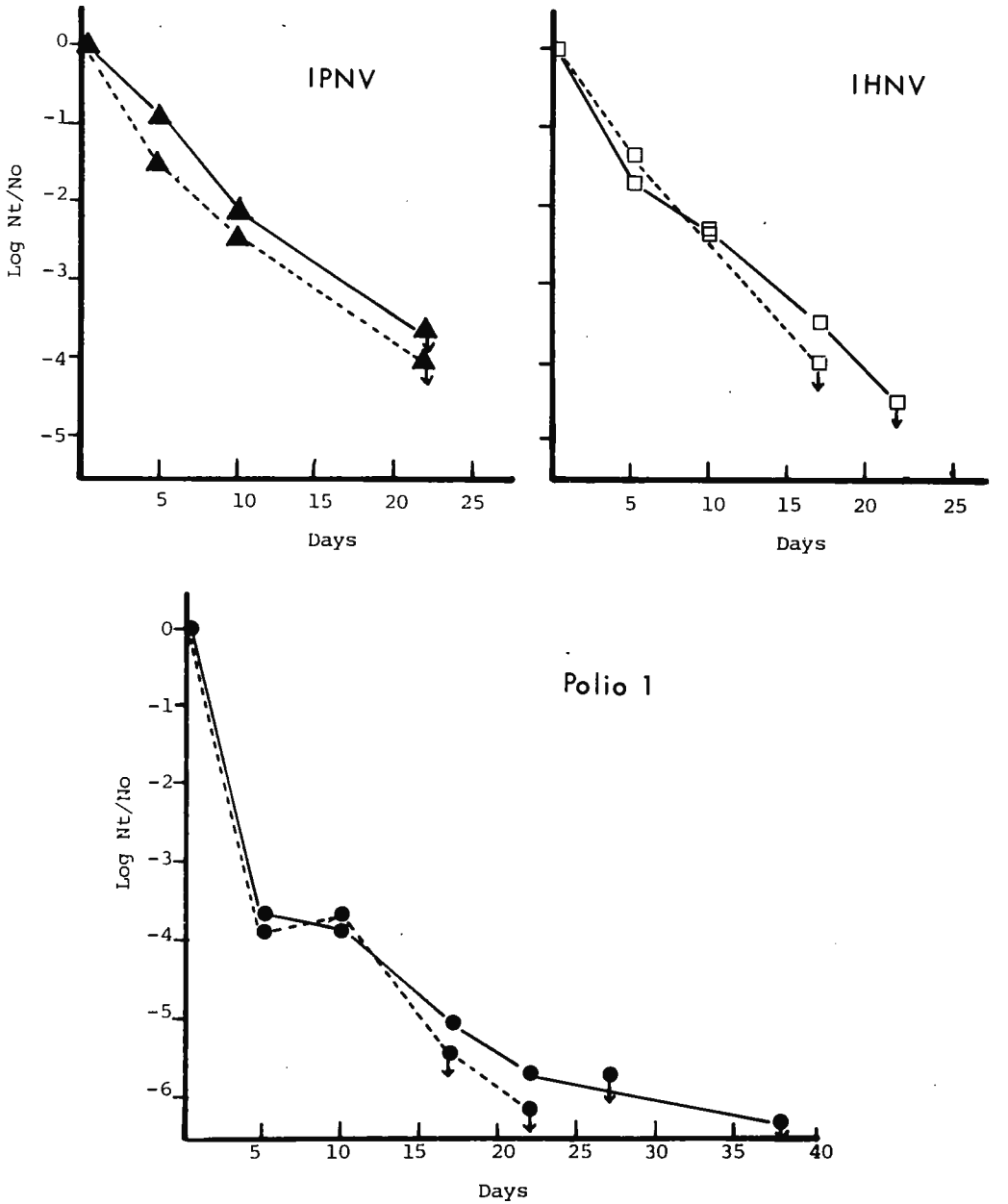


Fig. 7 .- Influencia de la Temperatura en la Supervivencia de Polio 1 (●); IPNV (▲)e IHNV (□) en Agua Oceánica, a 15°C.(——) y a 20°C.(---).

Fundación Juan March (Madrid)

ponde con el descenso más rápido de infectividad viral.

Hemos observado a lo largo del experimento una variación de la población bacteriana no sólo en número sino también en diversidad, haciéndose dominante un determinado tipo morfológico.

Supervivencia comparativa de IPNV en agua de estuario natural, filtrada y autoclavada.

Con el fin de determinar si los datos presentados por otros investigadores sobre supervivencia de los virus de peces en agua filtradas o autoclavadas, pueden compararse con lo que sucede realmente en el medio acuático natural, se estudió la estabilidad del virus IPNV en agua de estuario natural (sin ningún pretratamiento), así como en agua sometida a los tratamientos físicos de:

- Filtración a través de membranas de 0,2 µm de tamaño de poro.
- Autoclavaje a 121ºC, 15 min.

El agua procedió de la estación oceanográfica de Chesapeake Bay, MD, USA, denominada "Wicomico River". Las características del agua fueron las siguientes:

- Salinidad.- 11,5 gr ClNa/l
- pH.- 7,6
- Oxígeno disuelto.- 8,2 ppm
- Absorbancia a 254 nm.- 1,47
- Coliformes totales.- 4/100 ml.

Los resultados de este estudio se representan en la **Fig. 8.** Los datos de inactivación viral se analizaron por regresión lineal y la diferecia entre las pendientes fue comparada al nivel del 0,5 % aplicando el test F.

Fundación Juan March (Madrid)

Hemos encontrado una diferencia significativa ($P < 0{,}001$) entre las tasas de inactivación de IPNV en agua del mar natural y autoclavada. Análogamente, aunque las estabilidades son más próximas, la diferencia entre la viabilidad viral en agua natural y filtrada es significativa al nivel del 0,001.

Estos resultados ponen de manifiesto que datos presentados por otros autores no son aplicables a condiciones naturales, recalcando más la importancia de nuestros estudios de supervivencia viral en donde se emplearon siempre condiciones naturales.

Fundación Juan March (Madrid)

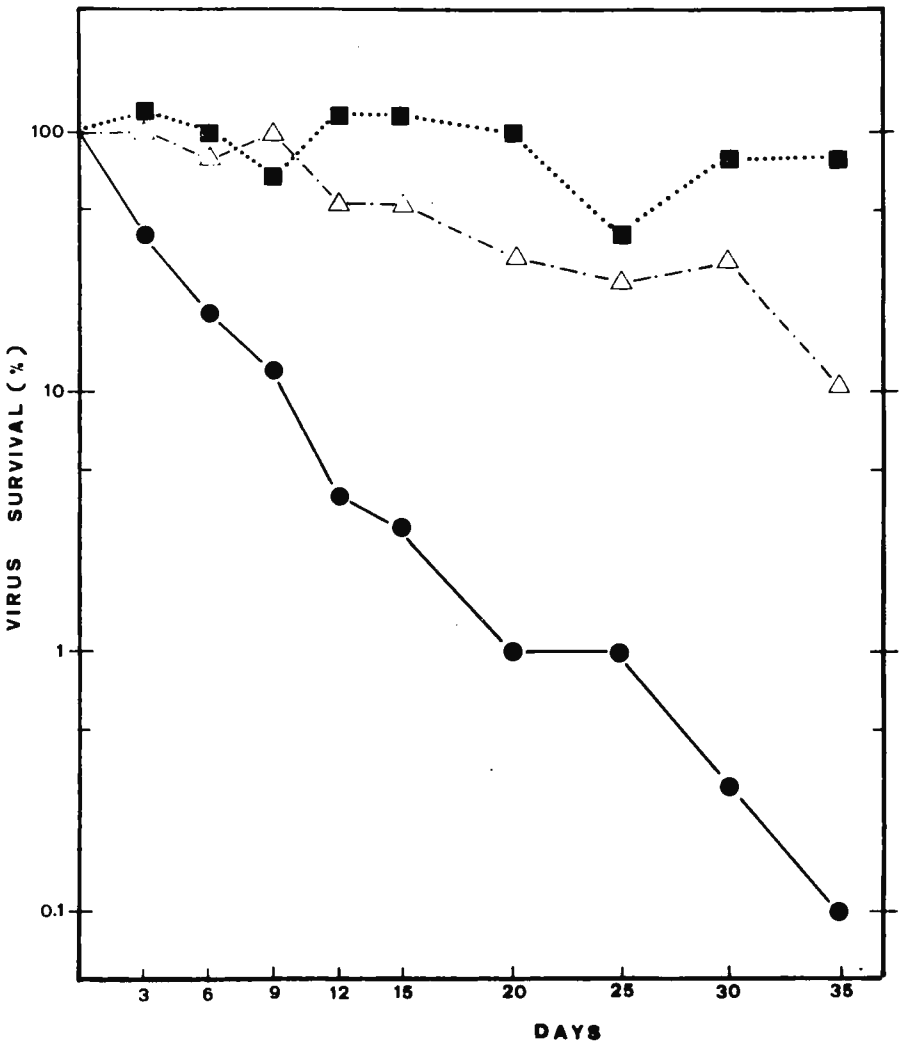


Fig. 8.- Supervivencia del virus IPNV en agua de estuario natural (-●-), filtrada (-·△·-) y autoclavada (·■··)

Fundación Juan March (Madrid)

DISCUSION

La transmisión de virus patógenos a través del agua es de especial importancia en el caso de animales acuáticos, sobre todo en estos momentos donde el cultivo de especies en agua dulce y salada está adquiriendo activa promoción, así como por la conocida resistencia de los virus de salmónidos IPNV e IHNV, a los agentes de desinfección (Wedemeyer & col. 1978). El objetivo de este trabajo es por tanto determinar las tasas de supervivencia que estos virus pueden tener en condiciones naturales después de una epizootia.

Existe una literatura creciente sobre las propiedades fisico-químicas de estos virus de peces (IPNV e IHNV), pero hay poca información de su viabilidad en estado libre en agua dulce o de origen salino. Han sido descrito que varios factores pueden influir en la supervivencia viral en el medio acuático como son: Temperatura (Lo & col. 1976); Salinidad (Akin & col. 1976); radiación solar (Berry & Noton, 1976); Presencia de compuestos químicos (Mitchell, 1971); Antagonismo bacteriano (Shuval & col. 1971; Toranzo & col. 1982) y sólidos en suspensión (Wellings & col. 1976). Los resultados obtenidos de esos estudios son a menudo variables y conflictivos, debido a las diferentes condiciones experimentales o muestras de agua utilizadas, ya que dichos factores están cambiando contínuamente dando lugar a tasas de inactivación diferentes. Por ello, nosotros creemos que los resultados de supervivencia en diferentes tipos de agua pueden ser sólo comparables si los experimentos se llevan a cabo simultáneamente, como es el caso de nuestros estudios de estabilidad viral.

Han sido descrito un amplio rango de estabilidad para IPNV e IHNV en varios tipos de agua. Tu & col. (1975), encontraron que IPNV fue estable en agua dulce de río o de pozo durante 10

Fundación Juan March (Madrid)

días a 4ºC, y 5 días a 15ºC, después delos cuales la pérdida de infectividad fue exponencial. Desautels & MacKelvie (1975), describieron una pérdida de infectividad del 99% para IPNV en agua dulce filtrada en 10-12 semanas a 4ºC, mientras que el descenso viral en agua del mar filtrada fue despreciable tanto a 4ºC como a 10ºC después de 10 semanas de incubación. En nuestro trabajo nosotros también observamos que la supervivencia de IPNV estaba en general favorecida en agua salina con su mayor estabilidad en agua de estuario a 15ºC (Figs 1 y 3). Esto podría ser un factor que contribuiría a la patogenicidad de Birnavirus para los organismos de zonas de estuario.

McAllister & col. (1974), observaron que la estabilidad de IHNV estaba muy afectada por la temperatura y salinidad del agua, presentando la mayor supervivencia en agua dulce. Este efecto perjudicial de los electrolitos sobre IHNV fue también descrito por Pietsch & col. (1977) quienes encontraron que el tiempo de supervivencia del virus fue 4 veces más largo en agua destilada que en agua de mar artificial, agua de mar filtrada o ciertas soluciones salinas. Análogamente, nosotros hemos encontrado que el virus IHNV sobrevive casi dos veces más en agua dulce que en agua de estuario o de mar a 15ºC (Fig. 1). Por tanto creemos que la transmisión de IHNV en el medio marino estará limitada a cortas distancias si se requiere una larga viabilidad para la transmisión horizontal.

En pocos trabajos sobre supervivencia de virus de peces se analizaron los parámetros físico-químicos y biológicos del agua, y la mayoría fueron realizados con muestras de agua filtrada o autoclavada, careciendo por tanto de actividad microbiana. Hemos demostrado que el tiempo necesario para una reducción del 90% en la infectividad viral de IPNV en agua de estuario filtrada

Fundación Juan March (Madrid)

o autoclavada fue 3 ó más de 3 veces superior, respectivamente, que en agua natural (Fig. 8). Estos resultados están apoyados por los trabajos de Baudouy (1976) que encontró también que el tiempo de supervivencia de este virus en agua de río filtrada era 2 veces más prolongado que en agua dulce natural. El hecho de que la flora microbiana autóctona puede ejercer un papel importante en el proceso de inactivación viral está corroborado por el encuentro de que el tiempo de más rápida inactivación viral se correspondía con el máximo crecimiento de la población bacteriana en las muestras de agua.

Algunos investigadores (Mitchell, 1971; Gerba & col. 1975), han descrito un efecto protectivo de partículas orgánicas en la estabilidad viral; otros (Shuval & col. 1971; Fujioka & col. 1.980) observaron una mayor inactivación viral en las aguas más polucionadas; mientras que Smith & col. (1978) ponen de manifiesto que la supervivencia viral en el agua fue independiente del grado de polución. Las diferencias en adsorción a partículas en suspensión orgánicas e inorgánicas, encontradas entre los diversos tipos de virus, pueden resultar de la variabilidad en la configuración de las proteínas de cápside, lo que influye en la carga neta del virión. (Goyal & Gerba, 1979). Esto podría explicar, en parte, los diferentes patrones de supervivencia encontrados con los virus utilizados en nuestro estudio.

En nuestras experiencias hemos observado que la Temperatura tuvo una gran influencia en la viabilidad de los virus de salmónidos en agua dulce (Fig. 5; Tabla 2). Entonces, la manipulación de la Tª del agua podría utilizarse para el control de estas enfermedades en sistemas de cultivo. Sin embargo, como describió Amend(1976) aunque el incremento de la temperatura altera el curso de la enfermedad no elimina el estado de "carrier" o portador.

Fundación Juan March (Madrid)

Es de destacar de nuestros resultados, la gran supervivencia de Polio e INHV en agua dulce y de IPNV en agua de estuario. Sin embargo, cuando se pretenda aplicar medidas de control para evitar estas enfermedades de peces, hay que tener en cuenta que es posible la infección doble de salmónidos con estos virus (Mulcahy & Fryer, 1976).

Todas las aguas naturales pueden contener una variedad de factores antivirales potenciales, químicos o biológicos, y el efecto observado sobre la supervivencia viral es generalmente la expresión del factor dominante. Un entendimiento de esos factores que afectan significativamente a la viabilidad viral en el medio acuático natural es esencial para estudios epizootiológicos, sobre todo de aquellas enfermedades que afectan a especies de gran interés comercial.

Fundación Juan March (Madrid)

II. B) SUPERVIVENCIA DE PATOGENOS BACTERIANOS DE PECES EN EL MEDIO ACUATICO

Cepas bacterianas

Las bacterias utilizadas en este estudió fueron:

- **Vibrio anguillarum** 775 suministrada por J.H. Crosa, Oregon Health Sci. Center, Portland, OR, USA.

- **Pasteurella piscicida** ATCC 17911, obtenida de la American Type Culture Collection, MD, USA.

Estudios de supervivencia

- Los experimentos de estabilidad de estos patógenos bacterianos de peces se realizaron en matraces de 500 ml conteniendo 100 ml de agua de estuario filtrada o autoclavada (121ºC, 15 min.) procedente de Chesapeake Bay (salinidad 12 ppm), o bien agua dulce filtrada. Los matraces se mantuvieron a 150 rpm a 20ºC.

- Para preparar los inóculos bacterianos, se obtuvieron primeramente curvas standard en donde se representa el número de bacterias viables frente a las medidas de densidad óptica (OD).

- Los cultivos bacterianos, en fase exponecial, se centrifugaron y los "pellets" resultantes se resuspendieron en cada uno de los tipos de agua utilizados en los estudios de supervivencia.

- El número deseado de bacterias fue obtenido diluyendo las suspensiones bacterianas al correspondiente valor de OD.

- Muestras de cada uno de los matraces se tomaron en el tiempo 0, y a diversos intervalos hasta que no se pudieron detectar bacterias viables.

Fundación Juan March (Madrid)

RESULTADOS

Las curvas de supervivencia de los dos patógenos bacterianos **V. anguillarum** y **P. piscicida**, se representan en las **Figuras 9 y 10.**

Como se observa en la Fig. 9, el título de **V. anguillarum** en agua dulce no fue detectable después de 10 días de incubación, sin embargo en agua de estuario el organismo fue estable durante ese período de tiempo, después del cual el descenso del número de bacterias fue dependiendo de la concentración bacteriana inicial utilizada. Así, cuando las muestras de agua se inocularon con 10^6 cels/ml el tiempo de supervivencia fue de 33 días, mientras que si el número inicial fue 10 cels/ml después de un incremento de 2 logs. dentro de los 4 primeros días, el número de bacterias viables disminuyó muy lentamente encontrando todavía título detectable a los 10o días de comenzado el experimento. La estabilidad de **V. anguillarum** en agua de estuario autoclavada siguió una evolución similar a la encontrada en agua filtrada.

P. piscicida resultó ser un organismo muy lábil tanto en agua dulce como de estuario (Fig. 10). Hemos observado un efecto muy perjudicial del agua dulce en la supervivencia de **P. piscicida**, ya que el número de células viables descendió 4 logs en sólo 24 horas, no habiendo título detectable a los 2 días de incubación. Sin embargo en agua de estuario el descenso fue menor de 2 logs en el mismo período de tiempo.

Aunque las tasas de inactivación de **P. piscicida** en agua de estuario fueron más rápidas con la concentración inicial de bacterias más baja (10^4 cels/ml), no se detectaron organismos viables al cabo de 4-5 días, independientemente del número inicial de bacterias. No fue encontrada diferencia significativa en la estabilidad de **P. piscicida** en agua de estuario filtrada o autoclavada.

Fundación Juan March (Madrid)

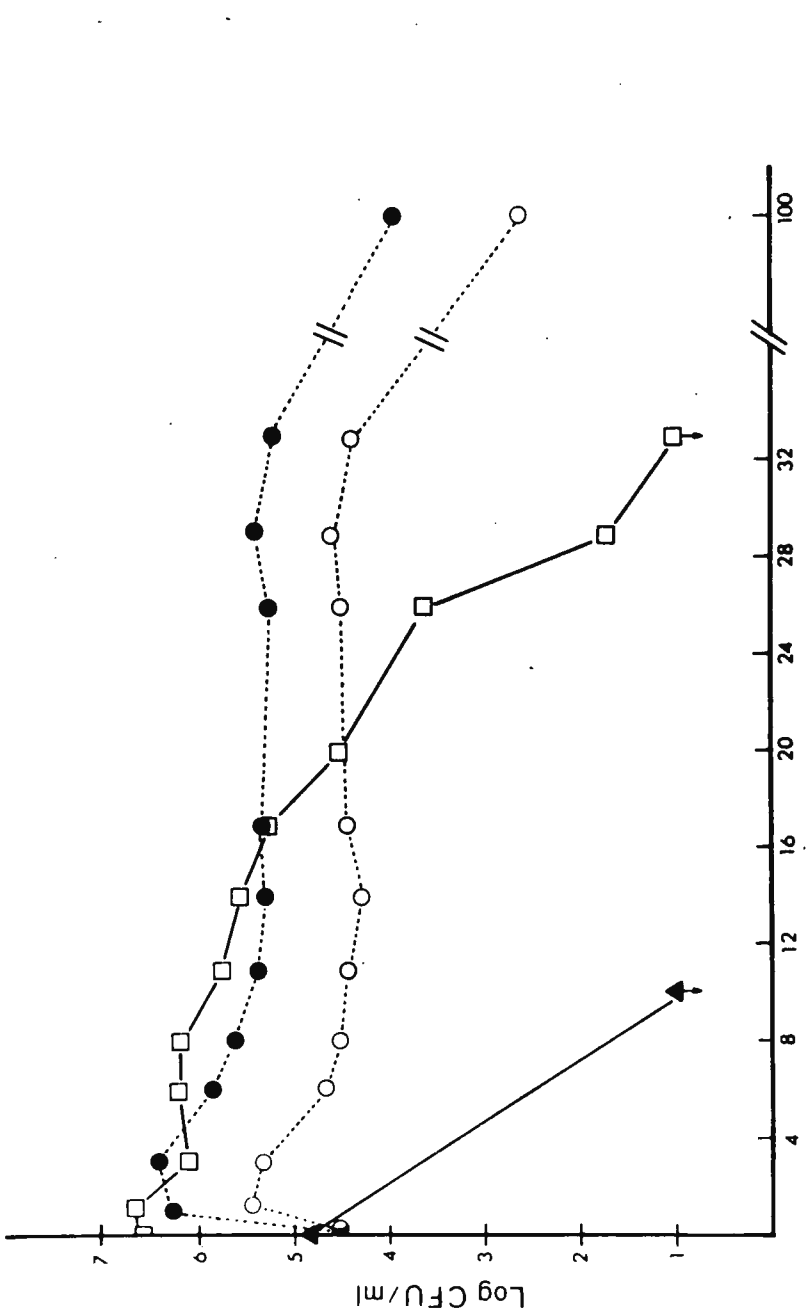


Fig. 9.- Supervivencia de Vibrio anguillarum 775 en diferentes tipos de agua y concentración inicial de bacterias 10^4 ó 10^6 cels/ml. Agua de estuario filtrada (-●-) (-□-). Agua de estuario autoclavada (·○·). Agua dulce filtrada (-▲-).

Fundación Juan March (Madrid)

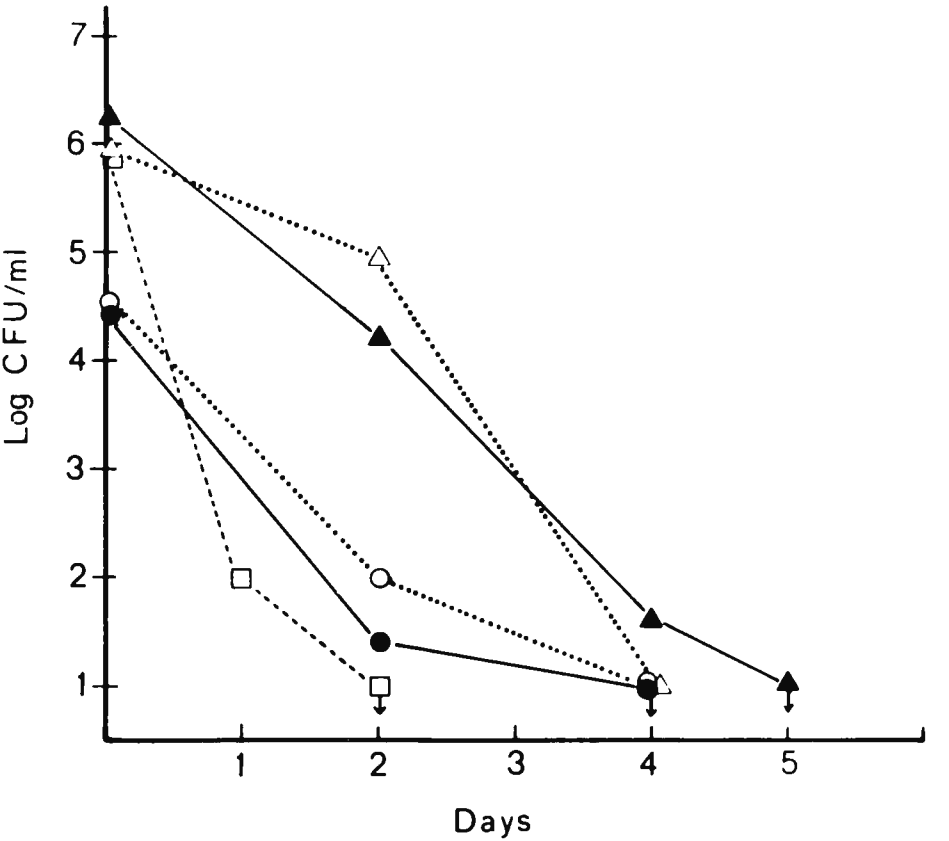


Fig. 10.– Supervivencia de Pasteurella piscicida ATCC 17911 en diferentes tipos de agua y concentración inicial de bacterias 10^4 ó 10^6 cels/ml.
Agua de estuario autoclavada (··○··) (··△··). Agua de estuario filtrada (—● —) (—▲—). Agua dulce filtrada (••□••).

Fundación Juan March (Madrid)

DISCUSION

Han sido descritos pocos estudios sobre la estabilidad en el medio acuático de patógenos bacterianos de peces. Evelyn (1971), encontró un tiempo de supervivencia muy reducido para **V. anguillarum** en agua de mar, mostrando que una concentración inicial de bacterias de 10^7 cels/ml se reducía 6 logs. en 14 días a 0ºC-3ºC. Robohn & Brown (1978), estudiaron la supervivencia en agua de mar filtrada por un período de 5 meses, de un **Vibrio sp.** causante de ulceras en peces planos, observando un descenso de 4 ó 5 logs a 15ºC o 20ºC, respectivamente. Esta elevada estabilidad es más similar a nuestros resultados de supervivencia de **V. anguillarum** 775 en agua de estuario procedente de Chesapeake Bay.

Es interesante destacar que **V. anguillarum** puede incrementar su número inicial presente en el agua (Fig. 9), hecho importante que se debe tener en cuenta cuando se utilizan varias dosis bacterianas en infecciones experimentales de peces con este patógeno a través del agua.

La diseminación de las enfermedades de peces está relacionada con la estabilidad de los patógenos en el medio acuático. La elevada labilidad de **P. piscicida** en agua salina, en comparación con **V. anguillarum**, observada en nuestro experimento, sugiere que un requerimiento de contacto directo pez-pez, debe ser más importante en mantener la infección con **P. piscicida** que con **V. anguillarum.**

Fundación Juan March (Madrid)

III. BIBLIOGRAFIA

Ahne, W. (1979). Bull. Off. Int. Epizoot. 87:415-416

Ahne, W. (1980). Berl. Muench. Tierarztl. Wschr. 93:14-16

Akin, E.W., W.F. Hill, G.B. Cline & W. Benton. (1976) Water Res. 10:59-63

Amed, D.F. (1975). J. Wild. Dis. 1: 471-478

Amed, D.F. (1976). J. Fish. Res. Board Canada 33:1059-1086

Anderson, J.I.W. & D.A. Conroy (1970). Am. Fish. Soc. Spec. Publ. 5:266-272

American Public Health Association (1976). 14th Edit. APHA,NY

Ball, H.L., A.L. Munro, A, Ellis, K.G. Elson, W. Hodgkiss & I.S. McFarlane (1971). Nature 234:417-418

Baudouy, A.M. (1976). Ann. Rech. Vétér. 7:75-82

Berry, S.A. & B.G. Noton (1976). Water Res. 10: 323-327

Bowser, P.R., R. Roseman & C.R. Reiner (1981). J. Invertebr. Pathol. 37: 80-85

Brown, C. & E. Losee (1978). J. Invertebr. Pathol. 31: 41-47

Carlisle, J.C., K.A. Schat & R. Elston (1979). J. Fish Dis. 2: 511-518

Desautels, D. & R.M. Mackelvie (1975). J. Fish. Res. Board Can. 32: 523-531

Di Salvo, L.H., J. Blecka & R. Zebal (1978). Appl. Environ. Microbiol. 35:219-221

Evelyn, T.P.T. (1971). J. Fish. Res. Board Can 28:517-525

Fijan, N. (1974). Vet. Archiv. Zagred 44: 187-192

Fijan, N. & G. Giorgeti (1978). J. Fish Dis. 1: 269-270

Fish Health Blue Book (1979). American Fisheries Society. D. Mc Daniel (ed)

Fryer, J.L., J.S. Nelson & R.L. Garrison (1972). Prog. Fish. Food Sci. 5: 129-131

Fujioka, R.S., P.C. Loh & L.S. Lau (1980). Appl. Environ. Microbiol. 6: 1105-1110

Gerba, C.P., C. Wallis & J.L. Melnick (1975). Environ. Sci and Techn. 9:1112-1126

Fundación Juan March (Madrid)

Goyal, S.M. & C.P. Gerba (1979). Appl. Environ. Microbiol. 38: 241-247

Griffin, P.J. (1954). Trans. Amer. Fish. Soc. 83: 241-253

Hastein, T. & J. Krogsrud (1976). Acta Vet. Scand. 17:109

Hill, B.J. (1977). Proc. Int. Symp. Dis. of Cultured Salmonids Tavolek, Inc., Rechmond, Wash. p. 117

Johnson, P.T. (1977). J. Invertebr. Pathol. 29: 201-209

Jorgensen, P.E.V. & N.P. Kehlet (1971). Arch. Ges. Virusforch. 34:144-145

Koike, Y., A. Kuwahara & H. Fujiwara (1975). Japan J. Microbiol. 19: 241-247

Kuris, A.M., G.O. Pinar, R. Hess & T.S. Horris (1979). J. Invertebr. Pathol. 34: 26-31

Kusuda, R. & M. Yamaoka (1972). Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 38: 1325-1332

Kusuda; R., H. Sako & K. Kawai (1979). Fish Pathol. 13: 123-137

Leong, J. & S. Turner (1979). Fish Health News 8: vi-vii

Ljungberg, O. & P.E.V. Jorgensen (1973). Tech. paper 17, FAO EIFAC. Suppl. 2:67-70

Lo, S., J. Gilbert & F.M. Hetrick (1976). Appl. Environ. Microbiol. 32: 245-249

McAllister, P.E., J.L. Fryer & K.S. Pilcher (1974). Arch. Ges. Virusforsch 44: 270-279

McAllister, P.E. (1979). Comprehensive Virol. (Fraenkel-Conrat) T. 14; p. 401-455.

McCarthy, D.H. (1976). J. Fish Biol. 8:317-320

McKnight, I.J. & R.J. Roberts (1976). Br. Vet. J. 132: 76-85

Mitchell, R. (1971). J. San Eng. Div. 97: 425-432

Mulcahy, D.M. & J.L. Fryer (1976). Fish Health News 5:5-6

Munro, A.L.S., J. Liversidge & K.G.R. Elson (1976). Proc. Royal Soc. 75: 223-232

Muroga, K., J. Yasuhiko & M. Nisibuchi (1976). Fish. Pathol. 11:141-145

Muroga, K., T. Sugiyama & N. Ueki (1977). J. Fac. Fish. Anim. Husb. 16: 17-21

Muroga, K., S. Takahaski & H. Yamanoi (1979). Bull. Jap. Soc. Sci. Fish 45:829-834

Fundación Juan March (Madrid)

Pietsch, J.P., D.F. Amend & C.M. Miller (1977). J. Fish. Res. Board Can. 34: 1360-1364

Pilcher, K.S. & J.L. Fryer (1980). CRC, Critical Rev. in Microbiol. 7:287-364

Plumb, J.A. (1972). Trans Am. Fish. Soc. 101:121-123

Reed, L.J. & H. Muench (1938). Am, J. Hyg. 27: 493-497

Robohm, R.A. & C. Brown (1978). Mar. Fish Rev. 40:5-7

Roberts, R.J. (1978). The Virology of Teleosts. In Fish Pathol. Ed. Bailliere Tindall, London, p. 114-143

Sano, T. (1971). Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 37: 499-503

Sano, T. (1972). Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 38: 313-316

Sano, T., T. Nishimura, N. Okamoto, T. Yamazaki, H. Hanada & R. Watanabe. (1977). J. Tokyo Univ. Fish. 63:81

Sayler, G.S., J.D. Nelson, A. Justice & R.R. Colwell (1975) Appl. Environ. Microbiol. 30: 625-638

Shuval, H.I., M. Asce, A. Thompson, B. Fattal, S. Cymabalista (1971). J. San. Eng. Div. 5: 587-600

Simidu, U., & S. Egusa (1972). Bull. Jap. Soc. Sci. 38:803-812

Smith, E.M., C.P. Gerba & J.L. Melnick (1978). Appl. Environ. Microbiol. 35:685-694

Snieszco, S.F., G.L. Bullock, E. Hollis & J.G. Boone (1964) J. Bacteriol. 88: 1325-1322

Snieszco, S.F. (1978). Mar. Fish. Rev. 40: 65-68

Strout, R.G., E.S. Sawyer & B.A. Coutermarck (1978). J. Fish. Res Board Can. 35: 403-408

Swanson, R.N. & J.H. Gillespie (1979). J. Fish. Res. Board Can. 36: 562-567

Tajima, K., M. Yoshimizu, Y. Eruza & T. Kimura. (1981). Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 47: 35-42

Toranzo, A.E., J.L. Barja & F.M. Hetrick (1982). Can. J. Microbiol. 28: 231-238

Toranzo, A.E & F.M. Hetrick (1982). J. Fish. Dis. 5: 223-231

Toranzo, A.E., J.L. Barja, F.M. Hetrick, S. Potter & J.H. Crosa (1982). 82 th. Annual Meeting A.S.M. p.195, N. 104

Fundación Juan March (Madrid)

Toranzo, A.E., J.L. Barja, F.M. Hetrick, S. Potter & J.H. Crosa (1982). Infect. Immun. (En prensa)

Tu, K.C., R.S. Spendlove & R.W. Goede (1975). Infect. Immun. 11: 1409-1412

Tubiash, H.S., R.R. Colwell, & R. Sakazaki (1970). J. Bacteriol. 103:272-173

Underwood, B.D., C.J. Smale, F. Brown & B.J. Hill (1977). J. Gen. Virol. 36:93-109

Wedemeyer, C., N. Nelson, & C.S. Smith (1978). J. Fish. Res. Board Can. 35: 875-879

Wedemeyer, C.A., (1974). Div. Coop. Res. Wash. FDL-38; 8p.

Wellings, F.M., A.L. Lewis & C. W. Mountain (1976). Appl. Environ. Microbiol. 31: 354-358

Wingfield, W.H., J.L. Fryer & K.S. Pilcher (1969). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 20: 1055-1059

Wingfield, W.H., & L.D. Chan (1979). Spec. Publ. Am. Fish. Soc. 5: 307-318

Wolf, K., S.F. Snieszko, C.E. Dunbar & E. Pyle (1960). Proc. Soc. Exp. Biol. 21: 317-321

Wolf, K. (1966). Adv. Virus Res. Vol. 12, p:35-101, Academic Press

Wolf, K. & M.C. Quimby (1971). Arch. Ges. Virusforsch. 34:144-145

Wolf, K., M.C. Quimby, L.L. Pettijohn & M.L. Landolt (1973). J. Fish. Res. Board Can 30:1625-1627

Wolf, K. (1976). Fish. Pathol. 10:135-154

Yamamoto, T. & J. Kilistuff (1979). J. Fish. Res. Board Can 36: 562-567.

Fundación Juan March (Madrid)

FUNDACION JUAN MARCH
SERIE UNIVERSITARIA

TITULOS PUBLICADOS

Serie Verde

(Matemáticas, Física, Química, Biología, Medicina)

2 Mulet, A.:
Estudio del control y regulación, mediante un calculador numérico, de una operación de rectificación discontinua.

4 Santiuste, J. M.:
Combustión de compuestos oxigenados.

5 Vicent López, J. L.:
Películas ferromagnéticas a baja temperatura.

7 Salvá Lacombe, J. A.:
Mantenimiento del hígado dador in vitro en cirugía experimental.

8 Plá Carrera, J.:
Estructuras algebraicas de los sistemas lógicos deductivos.

11 Drake Moyano, J. M.:
Simulación electrónica del aparato vestibular.

19 Purroy Unanua, A.:
Estudios sobre la hormona Natriurética.

20 Serrano Molina, J. S.:
Análisis de acciones miocárdicas de bloqueantes Beta-adrenérgicos.

22 Pascual Acosta, A.:
Algunos tópicos sobre teoría de la información.

25 I Semana de Biología:
Neurobiología.

26 I Semana de Biología:
Genética.

27 I Semana de Biología:
Genética.

28 Zugasti Arbizu, V.:
Analizador diferencial digital para control en tiempo real.

29 Alonso, J. A.:
Transferencia de carga en aleaciones binarias.

30 Sebastián Franco, J. L.:
Estabilidad de osciladores no sinusoidales en el rango de microondas.

39 Blasco Olcina, J. L.:
Compacidad numerable y pseudocompacidad del producto de dos espacios topológicos.

44 Sánchez Rodríguez, L.:
Estudio de mutantes de saccharomyces cerevisiae.

45 Acha Catalina, J. I.:
Sistema automático para la exploración del campo visual.

47 García-Sancho Martín, F. J.:
Uso del ácido salicílico para la medida del pH intracelular.

48 García García, A.:
Relación entre lones calcio, fármacos ionóforos y liberación de noradrenalina.

49 Trillas, E., y Alsina C.:
Introducción a los espacios métricos generalizados.

50 Pando Ramos, E.:
Síntesis de antibióticos aminoglicosídicos modificados.

51 Orozco, F., y López-Fanjul, C.:
Utilización óptima de las diferencias genéticas entre razas en la mejora.

Fundación Juan March (Madrid)

52 Gallego Fernández, A.:
Adaptación visual.

55 Castellet Solanas, M.:
Una contribución al estudio de las teorías de cohomología generalizadas.

56 Sánchez Lazo, P.:
Fructosa 1,6 Bisfosfatasa de hígado de conejo: modificación por proteasas lisosomales.

57 Carrasco Llamas, L.:
Estudios sobre la expresión genética de virus animales.

59 Afonso Rodríguez, C. N.:
Efectos magneto-ópticos de simetría par en metales ferromagnéticos.

63 Vidal Costa, F.:
A la escucha de los sonidos cerca de Tλ en el 4_{He} líquido.

65 Andréu Morales, J. M.:
Una proteína asociada a membrana y sus subunidades.

66 Blázquez Fernández, E.:
Desarrollo ontogénico de los receptores de membrana para insulina y glucagón.

69 Vallejo Vicente, M.:
Razas vacunas autóctonas en vías de extinción.

76 Martín Pérez, R. C.:
Estudio de la susceptibilidad magnetoeléctrica en el Cr_2O_3 policristalino.

80 Guerra Suárez, M.ª D.:
Reacción de Amidas con compuestos organoalumínicos.

82 Lamas de León, L.:
Mecanismo de las reacciones de iodación y acoplamiento en el tiroides.

84 Repollés Moliner, J.:
Nitrosación de aminas secundarias como factor de carcinogénesis ambiental.

86 II Semana de Biología:
Flora y fauna acuáticas.

87 II Semana de Biología:
Botánica.

88 II Semana de Biología:
Zoología.

89 II Semana de Biología:
Zoología.

91 Viéitez Martín, J. M.:
Ecología comparada de dos playas de las Rías de Pontevedra y Vigo.

92 Cortijo Mérida, M., y García Blanco, F.:
Estudios estructurales de la glucógeno fosforilasa b.

93 Aguilar Benítez de Lugo, E.:
Regulación de la secreción de LH y prolactina en cuadros anovulatorios experimentales.

95 Bueno de las Heras, J. L.:
Empleo de polielectrolitos para la floculación de suspensiones de partículas de carbón.

96 Núñez Alvarez, C., y Ballester Pérez, A.:
Lixiviación del cinabrio mediante el empleo de agentes complejantes.

101 Fernández de Heredia, C.:
Regulación de la expresión genética a nivel de transcripción durante la diferenciación de Artemia salina.

103 Guix Pericas, M.:
Estudio morfométrico, óptico y ultraestructural de los inmunocitos en la enfermedad celíaca.

105 Llobera i Sande, M.:
Gluconeogénesis «in vivo» en ratas sometidas a distintos estados tiroideos.

106 Usón Finkenzeller, J. M.:
Estudio clásico de las correcciones radiactivas en el átomo de hidrógeno.

107 Gallán Jiménez, R.:
Teoría de la dimensión.

111 Obregón Perea, J. M.ª:
Detección precoz del hipotiroidismo congénito.

Fundación Juan March (Madrid)

115 Cacicedo Egües, L.:
Mecanismos moleculares de acción de hormonas tiroideas sobre la regulación de la hormona tirótropa.

121 Rodríguez García, R.:
Caracterización de lisozimas de diferentes especies.

122 Carravedo Fantova, M.:
Introducción a las Orquídeas Españolas.

125 Martínez-Almoyna Rullán, C.:
Contribución al estudio de la Manometría Ano-rectal en niños normales y con alteraciones de la continencia anal.

127 Marro, J.:
Dinámica de transiciones de fase: Teoría y simulación numérica de la evolución temporal de aleaciones metálicas enfriadas rápidamente.

129 Gracia García, M.:
Estudio de cerámicas de interés arqueológico por espectroscopia Mössbauer.

131 García Sevilla, J. A.:
Receptores opiáceos, endorfinas y regulación de la síntesis de monoaminas en el sistema nervioso central.

132 Rodríguez de Bodas, A.:
Aplicación de la espectroscopía de RPE al estudio conformacional del ribosoma y el tRNA.

136 Aragón Reyes, J. J.:
Interacción del Ciclo de los Purín Nucleótidos con el Ciclo del Acido Cítrico en Músculo Esquelético de Rata durante el Ejercicio.

139 Genís Gálvez, J. M.:
Estudio citológico de la retina del camaleón.

140 Segura Cámara, P. M.:
Las sales de tiazolio ancladas a soporte polimérico insoluble como catalizadores en química orgánica.

141 Vicent López, J. L.:
Efectos anómalos de transporte eléctrico en conductores a baja temperatura.

143 Nieto Vesperinas, M.:
Técnicas de prolongación analítica en el problema de reconstrucción del objeto en óptica.

145 Arias Pérez, J.:
Encefalopatía portosistémica experimental.

147 Palanca Soler, A.:
Aspectos Faunísticos y Ecológicos de Carábidos Altoaragoneses.

150 Vioque Cubero, B.:
Estudio de procesos bioquímicos implicados en la abscisión de la aceituna.

151 González López, J.:
La verdadera morfología y fisiología de Azotobacter: células germinales.

152 Calle García, C.:
Papel moduiador de los glucocorticoides en la población de receptores para insulina y glucagón.

154 Alberdi Alonso, M.ª T.:
Paleoecología del yacimiento del Neógeno continental de Los Valles de Fuentidueña (Segovia).

156 Gella Tomás, F. J.:
Estudio de la fosforilasa kinasa de hígado y leucocitos: purificación, características y regulación de su actividad.

157 Margalef Mir, R.:
Distribución de los macrofitos de las aguas dulces y salobres del E. y NE. de España y dependencia de la composición química del medio.

158 Alvarez Fernández-Represa, J.:
Reimplantación experimental de la extremidad posterior en perros.

161 Tomás Ferré, J. M.ª:
Secreción y reutilización de trifosfato de adenosina (ATP) por sinaptosomas colinérgicos.

163 Ferrándiz Leal, J. M.:
Estudio analítico del movimiento de rotación lunar.

Fundación Juan March (Madrid)

164 Rubió Lois, M.; Uriz Lespe, M.ª J., y Bibiloni Rotger, M.ª A.:
Contribución a la fauna de esponjas del litoral catalán. Esponjas córneas.

165 Velasco Rodríguez, V. R.:
Propiedades dinámicas y termodinámicas de superficies de sólidos.

166 Moreno Castillo, I.:
Ciclo anual del zooplancton costero de Gijón.

168 Durán García, S.:
Receptores insulínicos en hipotálamo de rata: localización subcelular y mecanismo (s) de regulación.

169 Martínez Pardo, R.:
Estudio del mecanismo secretor de hormona juvenil en oncopeltus fasciatus.

171 García Jiménez, J.:
Fusariosis del gladiolo: un estudio preliminar.

173 Fernández Aláez, C.:
Análisis estructural en sabinares de la provincia de León.

174 Furio Egea, J.:
Citokinas en agrios. Actividades endógenas, efectos fisiológicos y aplicaciones.

180 Moreno Rodríguez, J. M.:
Estudios ecológicos en jarales (cistion laurifolii): Variación anual de algunos factores del entorno y manifestaciones fenológicas.

182 Pons **Vallés, M.:**
Estudios espectroscópicos de fosfolípidos polimerizables.

183 Herrero Ruiz de Loizaga, V. J.:
Estudio de reacciones químicas por haces moleculares. Aplicación a la reacción $C_2H_5Br + K \quad Brk + C_2H_5$.

193 Martín García, V. S.:
Utilización sintética en química orgánica de metales pesados como catalizadores. Oxidación asimétrica.

195 Badía Sancho, A.:
Receptores presinápticos en el conducto deferente de rata.

Fundación Juan March (Madrid)