

77



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

DETECCION DEL VIRUS DE LA NECROSIS PANCREATICA
INFECCIOSA (VNPI) EN PORTADORES DE TRUCHA
ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*) EN GRANJAS DEL
ESTADO DE MEXICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

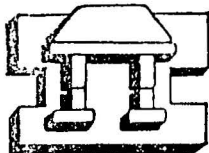
B I O L O G O

P R E S E N T A

LUIS GUERRERO CABRERA

DIRECTORES DE TESIS:

BIOL. JOSE DEL CARMEN BENITEZ FLORES
M. EN C. MARIA DEL ROSARIO GONZALEZ VALLE



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEX.

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedico este trabajo

A mi madre

*A todos los productores de trucha arcoiris del
país, esperando sea de utilidad.*

AGRADECIMIENTOS

A MI MADRE: Dra. Elia Cabrera Blanco.

Por todo su amor, cariño, paciencia y apoyo para el desarrollo y término de mi carrera profesional. Por haber creído en mí, Muchas gracias madre y que Dios te bendiga.

A MI FAMILIA: Dr. Adalberto Guerrero Virgen, Lic. Adalberto Guerrero Cabrera y familia.
Por todo su apoyo y cariño, gracias.

A MI ASESOR: Biol. José del Carmen Benítez Flores.

Por haber aportado todo su conocimiento y experiencia para mi formación profesional y el desarrollo de este trabajo, su apoyo, por haber confiado en mí y sobretodo por su amistad sincera. Muchas gracias maestro Carmelo.

A MI ASESORA: M. en C. María del Rosario González Valle.

Por ser tan firme y profesional, por su paciencia y dedicación, y sobretodo su apoyo sincero. Muchas gracias maestra Chayo.

Al Dr. José Alejandro Medina Gandara.

Por su amor al conocimiento y a la investigación. Por su cariño a la FES IZTACALA. Por todo su apoyo moral y académico para el desarrollo y término de este trabajo. Por haber confiado en mí y sobretodo por su amistad, la cual estimo mucho. Muchas gracias Dr. Medina.

Al M. en C. Mario Alfredo Fernández Araiza.

Por su apoyo académico y moral en mi formación profesional, por haber creído en mí y sobretodo su amistad. Muchas gracias maestro Mario.

A la Q.F.B. Luz María Rosales.

Por todo su apoyo y dedicación para el desarrollo y término de este trabajo. Por su amistad sincera y su profesionalismo. Muchas gracias Luzma

A MIS REVISORES:

M. en C. Rodolfo Cárdenas Reygadas

Por su conocimiento y apoyo para la realización de este trabajo, por su amistad. Gracias.

M. en C. Regina Sánchez Merino

Por sus valiosos comentarios y aportaciones al presente trabajo.

Biol. Héctor Barrera Escorcía

Por sus valiosos comentarios y aportaciones al presente trabajo.

A TODAS LAS PERSONAS QUE APOYARON DIRECTAMENTE ESTE TRABAJO:

Dr. Juan Antonio Montaña Hirose.

Por haberme permitido enriquecer mi formación profesional en su laboratorio, por su apoyo incondicional para el desarrollo de este trabajo y su interés por la investigación.

Dr. Raimundo Iturbe

Por brindarme su apoyo moral y académico, por su amistad sincera y por haber creído en mí. Gracias.

Dr. Euterio Saldivar

Por todo su conocimiento y apoyo para el desarrollo de este trabajo. Gracias.

Dr. Leopoldo Santos Argumedo

Lab. de biomedicina molecular. CINVESTAV, IPN.

M. en C. Teresa Jaramillo

Departamento de Biología de la reproducción, UAM IZTAPALAPA

Dr. Sara Isabel Pérez Prieto
Departamento de Microbiología molecular, Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid,
España.

Dr. Rafael Jiménez Flores
Lab. de inmunología, U.M.F, FES IZTACALA, UNAM

M. en C. Martha Salcedo
U.M.F, FES IZTACALA, UNAM

Tec. Patricia Aley Medina
Lab. de Microscopia Electrónica, UICSE, FES IZTACALA, UNAM.

M. en C. César Ortega Santana
CIESA, Universidad Autónoma del Estado de México.
Ing. Víctor Almazán de la Rosa
Rancho "El Pedregal", El pedregal, Estado de México.
Ing. Alejandro Medina Rangel
Rancho "Los Alevines", Amanalco de Becerra, Estado de México.

Sr. Sergio Jiménez
Productor de trucha arcoiris, Amanalco de Becerra, Estado de México.

Dr. Fernando Jiménez
Dirección de Sanidad Acuícola
Dr. Feliciano Segovia
Universidad Autónoma de Nuevo León
Dr. Luis Contreras
Dirección de Acuacultura

A LAS INSTITUCIONES:

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA
CENTRO DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS AVANZADOS UNIDAD ZACATENCO, IPN.

A LOS RANCHOS:
LOS ALEVINES
EL PEDREGAL

A TODOS LOS TRABAJADORES DE LOS RANCHOS "LOS ALEVINES" Y "EL PEDREGAL":
Por haberme trasmitido sus conocimientos y experiencias de la producción trutícola.

A TODOS MIS AMIGOS DE CARRERA:
Por su apoyo y amistad

A TODOS MIS MAESTROS DE CARRERA:
Por sus aportaciones para la formación de un Biólogo más que servirá a su patria.

A todos, muchas gracias!!!

INDICE

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCCIÓN | 6 |
| La sanidad acuícola, concepto e importancia | 6 |
| Normatividad | 8 |
| La necrosis pancreática infecciosa | 10 |
| Características del virus de la necrosis pancreática infecciosa | 10 |
| Patogenia de la necrosis pancreática infecciosa | 11 |
| Epidemiología de la necrosis pancreática infecciosa | 11 |
| Histopatología de la necrosis pancreática infecciosa | 11 |
| Aislamiento del virus de la necrosis pancreática infecciosa | 12 |
| ANTECEDENTES | 14 |
| JUSTIFICACIÓN | 16 |
| OBJETIVOS | 18 |
| METODOLOGÍA | 19 |
| RESULTADOS | 22 |
| Evaluación de organismos no portadores | 22 |
| Evaluación de organismos portadores | 29 |
| DISCUSIÓN | 42 |
| Histopatología | 42 |
| Microscopía electrónica | 44 |
| Citometría de flujo | 44 |
| Implicaciones de la presencia de la necrosis pancreática infecciosa en México | 46 |
| Implicaciones legislativas del primer diagnóstico de la necrosis pancreática infecciosa en México | 46 |
| Implicaciones económicas de la presencia de la necrosis pancreática infecciosa en México | 47 |
| Una perspectiva a futuro | 47 |
| CONCLUSIONES | 48 |
| BIBLIOGRAFÍA | 49 |
| APENDICE | 53 |

INTRODUCCION

Si se analiza en este momento la cantidad de pescado¹ que consume la población mundial encontraremos cifras que van desde los 8 kgr hasta los 70 kgr anuales por habitante dependiendo de cada región, dichas cifras son el resultado de un incremento en el consumo de este tipo de productos durante las últimas décadas; de 1970 a 1990 el consumo de pescado, crustáceos y moluscos de cultivo y captura, aumentó de un 16 a un 22% (Westlund, 1999). Esto indica la importancia que están adquiriendo estos productos dentro de la dieta humana y por consiguiente, las actividades que sustentan su producción, la pesca y la acuicultura, están siendo consideradas en muchas naciones como fuente primordial de alimento a largo, mediano y corto plazo.

De estas actividades, la pesca, hasta la década pasada, había tenido un gran incremento en su volumen de captura, sin embargo la existencia de las especies acuáticas para consumo en estado natural es limitada y en la actualidad del 47 al 50% de estas especies pesqueras están en el punto máximo de explotación, del 25 al 27% se encuentran próximas al límite y del 15 al 18% se encuentran sobreexplotadas (FAO, 2000) lo cual establece que el crecimiento anual de esta actividad en adelante será casi nulo.

La producción de pescado en 1999, según una estimación preliminar de la FAO, ascendió a unos 125 millones de toneladas, cifra alcanzada por un aumento de 20 millones de toneladas con respecto al decenio anterior aportado principalmente por la acuicultura, ya que la pesca se mantuvo relativamente estable.

La acuicultura provee un tercio de todo el pescado de la alimentación humana y su contribución se ha cuadruplicado pasando del 7% en 1950 al 30% en 1997, creciendo a un ritmo anual del 10.3% entre 1988 y 1997, mientras que la producción de carne de origen terrestre creció durante ese mismo periodo un 0.5% (FAO, 2000). Comparada con el cultivo terrestre la acuicultura es una actividad mucho más variada debido a que dispone de diferentes especies con características diversas que permiten adaptarse a diferentes ambientes, agua dulce, salobre o marina; además, la carga hacia el ambiente es mucho menor que la ganadería o incluso la agricultura (Sheperd, 1988). En términos económicos los costos por kilogramo de peso vivo producido en acuacultivos son mucho más bajos que el correspondiente, por ejemplo, a la producción de cerdo hasta en un 76% (Baranbé, 1991).

La acuicultura desarrollada en cualquiera de sus modalidades; en agua dulce (representando el 58%), en mar (correspondiente al 35%) o en agua salobre (7%); produce peces de agua dulce 17%, moluscos 23%, plantas acuáticas 22%, peces diáromos 8%, crustáceos 8%, peces marinos 2%, y otros 20%, por ende la acuicultura no sólo es considerada de mayor potencial de desarrollo que la pesca de captura y el cultivo terrestre sino que también es un instrumento importante para elevar la seguridad alimentaria (FAO, 2000). En México no ha sido la excepción, la acuicultura ha representado más del 15 % de la producción pesquera anual teniendo un incremento progresivo hasta 1999; la acuicultura nacional esta representada por el cultivo de peces de agua dulce 57%, moluscos 24%, crustáceos 17% y otros 2% (Pesca, 1999).

Muchos países han identificado una escasez futura de suministros de productos pesqueros y apoyan el desarrollo de la acuicultura mediante planes de desarrollo que afronten problemas importantes como: los usos conflictivos de la tierra, problemas ambientales generales, la introducción de especies, la contaminación del agua y suelo destinados para la acuicultura, el acceso al conocimiento de técnicas para el manejo adecuado del cultivo, entre otros (FAO, 2000). Es importante establecer que existe una estrecha relación entre estos problemas, ya que la presencia de uno o varios dentro del proceso de desarrollo de la actividad acuícola, afecta de manera directa e indirecta la salud de los organismos. Una vez afectada se desencadena un problema que repercute de forma inmediata y progresiva en el crecimiento de la actividad, este problema son las enfermedades.

¹ Refiriéndose a peces, moluscos y crustáceos de consumo humano.

Con el desarrollo de la acuicultura se ha puesto de manifiesto la incidencia creciente de enfermedades de los organismos y a menudo se ha favorecido la aparición y propagación de estas. Es entonces que la Sanidad Acuícola adquiere una creciente importancia económica que hace necesaria su atención (Kinkelin, 1991).

La sanidad acuícola implica una serie de programas de salud que involucran la prevención (medicina preventiva y profilaxis), monitoreo, control y el diagnóstico. Sin embargo, el establecimiento de un programa de salud en la industria acuícola conlleva en sí una evaluación económica que debe buscar un balance entre cualquier estrategia y la productividad del negocio, es decir que ante cualquier riesgo de salud, se debe tener en cuenta las posibles acciones preventivas que una vez aplicadas tendrán efectos técnicos y económicos sobre la producción con diferentes costos.

Un programa de salud es multifactorial e integra componentes como la higiene, nutrición, manejo, características genéticas, monitoreo, vacunas y tratamientos. Además, va relacionado con la administración ya que durante el desarrollo de los organismos, el acuicultor se ve en la necesidad de tomar decisiones e implementar prácticas administrativas que hagan posible una perspectiva favorable de costo/beneficio (Reddington, 2000).

La detección de cualquier patógeno es tomada en cuenta por la administración para excluir o destruir el lote infectado, un diagnóstico temprano y acertado es la primera línea de defensa contra la propagación y potencial catástrofe financiera que sale de control y resulta en una enfermedad muy extendida. (Reddington, 2000). De hecho ya diferentes epizootias han comprobado dicho principio dentro de la producción, un claro ejemplo está en el cultivo de crustáceos como el camarón (*Litopenaeus vannamei*), donde se han dado pérdidas económicas importantes debido a los brotes manifestados en 1992 del síndrome de Taura, ocasionado por el virus TSV de la familia Picornaviridae. Dicho síndrome se ha extendido ya en muchas regiones de América (incluyendo México) y Asia (Cruz, 1998).

Dentro de las enfermedades que se llegan a presentar, las infecciosas son las que llegan a afectar de manera considerable. Se ha estimado que más del 10% de la producción de la acuicultura se pierde cada año debido a éstas (Pérez, 1997).

Para poder ser capaz de diagnosticar y controlar cualquier enfermedad es necesario reconocer cuando el lote de organismos esta sano y próspero, además de conocer la relación de los organismos con su medio, para así entender cómo es que se da la interacción con factores externos que influyen directamente causándole estrés (Constantino, 1997; Kinkelin, 1991).

En la acuicultura los animales están frecuentemente expuestos a agentes infecciosos y pueden ser infectados pero no desarrollar la enfermedad, es decir ser solo portadores y el estrés puede determinar el desarrollo de la enfermedad.

Algunos factores de estrés pueden ser desnutrición, alto o bajo oxígeno disuelto, alta o baja salinidad, alta o baja temperatura del agua, presencia de algunos tipos de algas, contaminación y manejo (Figura 1). También tiene fuerte influencia la predisposición genética que para algunas especies es inherente (Baranbé, 1991; Kinkelin, 1991; Reddington, 2000).

Es importante distinguir entre infección subclínica por un patógeno y la enfermedad que puede llegar a establecerse. Un ejemplo es cuando una población está expuesta a un patógeno en una temporada determinada, la mayoría llegará a ser infectada, sin embargo solo un porcentaje desarrollará la enfermedad clínica. De estos, pueden ser jóvenes que no habían sido expuestos a un patógeno similar con anterioridad y algunos viejos que presentan falla en su sistema inmune. Otro grupo son los que están en un estado de estrés o deficiencia fisiológica o ambiental que son supresores potentes del sistema inmune el cual lo predispone a la enfermedad (Weyts, 1999).

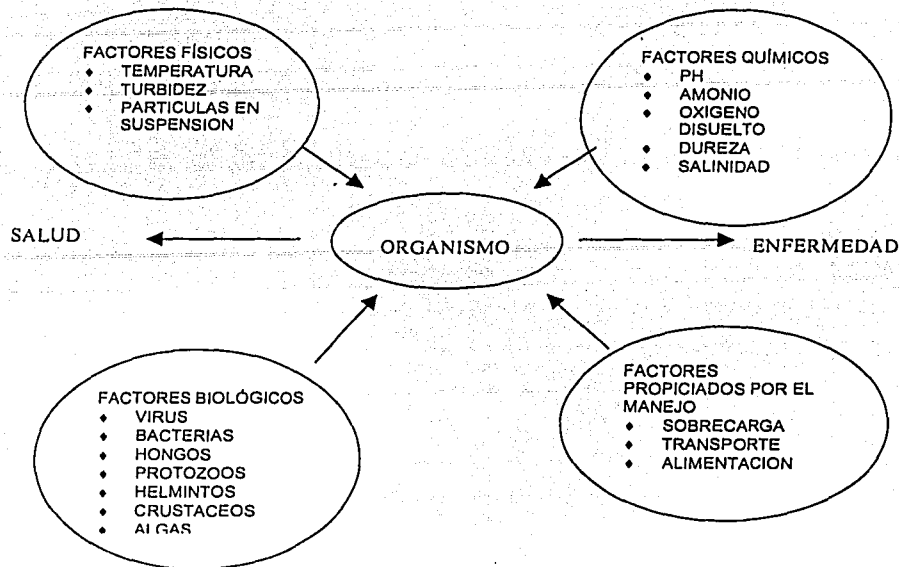


Figura 1. Diagrama de flujo de los factores que afectan a los organismos acuáticos en cultivo intensivo (modificado de Kinkelin, 1991).

Para prevenir o controlar enfermedades (medicina preventiva) es, de primera necesidad, entender el qué, por qué y dónde de los patógenos; Para esto es de suma importancia desarrollar bases de información de los agentes infecciosos de especies acuáticas y de sus enfermedades para utilizar los métodos de diagnóstico estandarizados y certificados de manera adecuada y oportuna (Reddington, 2000).

Los países desarrollados han elaborado programas de prevención e información a fondo. En Europa y E.U.A. se han legislado normas de control sanitario, que incluyen enfermedades de etiología viral y bacteriana.

El inicio de estos programas se dio en la Organización Mundial para la Salud Animal en la Oficina Internacional de Epizootias con sede en París, Francia, que publicó en 1995 el manual de diagnóstico para enfermedades de organismos acuáticos, que desglosa y caracteriza todas las enfermedades que son certificables (Tabla 1), en esta lista se incluyen, además de otras, cinco enfermedades que dentro del código zoonosanitario de la OIE se denominan: Septicemia hemorrágica Viral (SHV), Necrosis Pancreática Infecciosa (NPI), Furunculosis, Mixobolosis e hidropesía infecciosa, por ser enfermedades que tienen un impacto económico en la producción. De forma paralela, la comisión Europea Consultiva de la Pesca Interior (CECPI) de la FAO discutió regularmente, durante sus sesiones, la lucha contra las enfermedades de peces, que condujo en 1994 a una consulta gubernamental sobre una convención internacional de este asunto. Entre las enfermedades contenidas, estaban las ya inscritas en el código zoonosanitario internacional de la OIE, además de otras. Estos últimos trabajos siguieron siendo consultivos pero, tanto en la FAO como en la OIE, las directrices eran similares: contar con técnicas específicas de diagnóstico, definir y dar a conocer la reglamentación sanitaria de cada país, elaborar certificados al respecto, y prescribir al transporte internacional de peces que careciera de certificados (Rodríguez, 1998).

Dichos certificados deben establecerse a partir de un enfoque homogéneo del control sanitario de las poblaciones animales acuáticas y de métodos normalizados de diagnóstico de las principales enfermedades de los animales acuáticos.

La certificación es un requisito previo indispensable para controlar y evitar la propagación de enfermedades de animales acuáticos a través de los intercambios internacionales e internos de cada país y debe basarse en normas éticas y rigurosas.

| Enfermedades de declaración obligatoria a al OIE | |
|--|---|
| PECES | Necrosis hematopoyética epizoótica |
| | Necrosis hematopoyética infecciosa |
| | Enfermedad por el <i>Oncorhynchus masou virus</i> |
| | Viremia primaveral de la carpa |
| | Septicemia hemorrágica viral |
| MOLUSCOS | Bonamiosis |
| | Haplosporidiosis |
| | Marteilosis |
| | Microcitosis |
| | Perkinsosis |
| CRUSTÁCEOS | Enfermedad de las manchas blancas |
| | Síndrome de taura |
| | Enfermedad de la cabeza amarilla |
| Otras enfermedades importantes | |
| PECES | Virosis del bagre de canal |
| | Encefalopatía y retinopatía víricas |
| | Necrosis pancreática infecciosa |
| | Anemia Infecciosa del Salmón |
| | Síndrome ulcerante epizoótico |
| | Renibacteriosis |
| | Septicemia entérica del bagre |
| | Piscirickettsiosis |
| | Girodatilosis |
| | Iridovirosis de la dorada japonesa |
| | Iridovirosis del esturión blanco |
| CRUSTÁCEOS | Necrosis del páncreas por baculovirus |
| | Poliedrosis nuclear por baculovirus |
| | Necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa |
| | Plaga del cangrejo de río |
| | Virosis mortal de los genitores |

Tabla 1. Cuadro de enfermedades certificables por tipo de organismo según el Código Sanitario Internacional para los Animales Acuáticos (OIE, 2001).

Las medidas de profilaxis tienen por objetivo impedir que los agentes patógenos afecten a los animales sanos contaminando su medio ambiente. La aplicación de estas medidas se realiza según dos métodos: la intervención puntual, personal, sobre los peces de los que se dispone, o la intervención coordinada a escala nacional ó internacional. Con esta segunda forma de intervención sanitaria, se trata de interrumpir la transmisión de las enfermedades producidas por bioagresores en zonas mas o menos amplias, destruyendo por una parte la fuente de infección (destrucción de animales contaminados y desinfección de los lugares de producción, así como de los materiales) y por otra parte, repoblando las explotaciones saneadas con animales indemnes. La aplicación de esta metodología hace necesario contar con medios de diagnóstico que permitan definir las zonas indemnes y medios de vigilancia y protección de estas zonas, así como de las que han sido saneadas. Estas medidas se llevan a cabo actualmente en Europa y Estados Unidos (Kinkelln, 1991).

En México, también se ha iniciado la implementación de estas medidas. El 23 de Noviembre de 1993 aparecieron en el Diario Oficial de la Federación, los proyectos de normas oficiales mexicanas con los requisitos necesarios para la importación de organismos acuáticos vivos en cualquiera de sus fases de desarrollo, destinados a la acuicultura u ornato en el territorio nacional.

La aplicación de cuarentenas, a efecto de prevenir la introducción y dispersión de enfermedades certificables y notificables, en la importación y movilización de organismos acuáticos vivos de cualesquiera de sus fases de desarrollo, destinados a la acuicultura y ornato en los Estados Unidos Mexicanos. (NOM-010-PESC-1993 y NOM-011-PESC-1993, respectivamente, vigentes a partir del 1 de enero de 1996) (Auró, 1996).

En apoyo para la ejecución de dicha normatividad La Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca, considerando el Programa de Pesca y Acuicultura 1995-2000, del Poder Ejecutivo Federal ha instrumentado a través de la Dirección General de Acuicultura desde 1992 el Programa Nacional de Sanidad Acuícola con la participación de Instituciones de Investigación y Enseñanza Superior de distintos puntos del país, a fin de responder a las demandas sobre sanidad en cada uno de los estados de la república consolidando la Red de Diagnóstico y Prevención de Enfermedades de Organismos Acuáticos a Nivel Nacional (Rodríguez, 1998).

Dentro de las enfermedades más importantes para acuicultura resaltan aquellas cuya etiología es de origen viral. En los peces el número de virus aislados ha aumentado en los últimos años, de los virus descritos, solo unos cuantos pueden considerarse graves y de impacto económico; ellos son los que se encuentran en cuatro familias Birnaviridae, Rhabdoviridae, Iridoviridae y Reoviridae (Pérez, 1997). Cada una de estas familias alberga patógenos altamente virulentos con diferentes características en: su estructura (ADN o ARN), forma, tamaño, patogenicidad y tipo de huésped al que infectan, teniendo así enfermedades para cualquier etapa del ciclo de vida de los organismos. En particular para las especies de la familia Salmonidae algunos virus de la familia Rhabdoviridae y uno de la Birnaviridae son considerados de impacto para la producción. Este último, el virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI) ha sido el más estudiado de los virus de peces debido que presenta ambas formas de transmisión vertical y horizontal y por presentar una gran variación serológica.

LA NECROSIS PANCREÁTICA INFECCIOSA

La necrosis pancreática infecciosa (NPI) es una enfermedad sistémica contagiosa de alevines y juveniles de Salmónidos, producida por un Birnavirus. Esta enfermedad causa mortalidades que son inversamente proporcionales a la edad de los peces, típicamente es mayor en peces jóvenes y rara en peces viejos (Wolf, 1988). En esta enfermedad se presentan elevadas mortalidades que van desde el 10 al 90% según la variedad de virus. Se presenta en crías generalmente a las seis semanas de empezar a comer (Constantino, 1997). Esta enfermedad existe en muchas partes de Norteamérica, Europa y Japón (Roberts, 1986).

CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS DE LA NECROSIS PANCREÁTICA INFECCIOSA (VNPI)

El agente etiológico viral de esta enfermedad fue establecido en 1960 por Wolf *et al.* en el International Committee on Nomenclature of Viruses (ICNV) el VNPI está dentro de los virus RNA doble cadena (ds), sin envoltura, con simetría cúbica, perteneciente a la familia Birnaviridae en donde se encuentran 3 géneros, a los que pertenecen el virus de la enfermedad bursal infecciosa de ave (IBDV) y el virus de la Drosophila X (DXV).

El VNPI es icosaédrico con un diámetro variado entre 55 a 75 nm, El virión tiene una cápside de 132 unidades. El genoma contiene 2 segmentos de RNA (doble cadena) A y B. El segmento A de 3092 pares de base (pb) y el B de 2784pb. El segmento A codifica las proteínas pre VP2, VP3 y una no estructural (NS). El segmento B codifica la RNA polimerasa VP1 (Pérez, 1993).

La infectividad del VNPI es la más persistente de cualquier virus de pez. En agua destilada a 4°C la infectividad persiste de 5 a 6 meses; en agua de grifo a 10°C la infectividad persiste de forma similar hasta más de 7 meses, pero a 10°C en agua de canal no tratada con flora natural persiste 14 días, siendo este el más resistente de los virus de peces por conservar su infectividad expuesto al ambiente por más tiempo que otros. En estudios a 15°C en agua natural no tratada de estuario su persistencia fue de 27 días. En un pH de 3 y con una temperatura de 60°C durante los primeros 30 minutos el virus se inactiva, pero a pH de 9 puede persistir durante varias horas (Wolf, 1988).

PATOGENIA DE LA NECROSIS PANCREATICA INFECCIOSA

Es típico en organismos infectados la presencia de movimientos rotatorios alternados y postración, estos movimientos pueden ser lentos y débiles o rápidos y frenéticos (Roberts, 1986). Este comportamiento comúnmente es un signo terminal pero puede suceder que el organismo se recupere. Este comportamiento también se presenta en otras enfermedades tanto virales como parasitarias (Wolf, 1988), además de la forma de un nado agónico, los organismos tienden a estar en el fondo del estanque o a depositarse en las mallas de protección en la salida de agua del estanque.

En trucha generalmente ocurre un oscurecimiento del organismo (Roberts, 1986; Constantino, 1997), también puede presentarse exoftalmia de leve a moderada y distensión abdominal (Roberts, 1986; Wolf, 1988). En algunos casos se presentan hemorragias en las áreas ventrales, las branquias están atípicamente pálidas y muchos peces acarrean largas y delgadas heces en el ano llamadas pseudofecas, estas heces son más frágiles y largas que en la Necrosis Hematopoyética Infecciosa (NHI) (Wolf, 1988).

Cuando se disecciona al pez se puede observar; en el tracto digestivo, la presencia de gotas de grasa, moco abundante y sin comida como una característica patognomónica, si en raras ocasiones se encuentra alimento, este es poco y está confinado a la porción posterior (Wolf, 1988). Ocasionalmente hay hemorragias petequiales en el área del estómago (Roberts, 1986) y vísceras, en organismos jóvenes el bazo, corazón, hígado y riñón están anormalmente pálidos. En algunos organismos los ciegos pilóricos y el tejido adiposo anterior están punteados por petequias y la cavidad del cuerpo puede tener fluido ascítico (Wolf, 1988).

EPIDEMIOLOGIA DE LA NECROSIS PANCREATICA INFECCIOSA

El virus puede ser transmitido verticalmente vía huevos y semen y horizontalmente por heces; cuando el pez es infectado el virus ataca intestino y páncreas y en peces sanos portadores puede estar asociado con varias secreciones que dentro del agua continúan el ciclo de infección (Roberts, 1986).

La presencia continua de portadores del VNPI puede hacer muy difícil erradicar el virus del lugar donde ya fue introducido, puede ser que un lote de peces de un año esté infectado durante un periodo de estudio y no haberse infectado el año previo en etapa de cría, ya que las infecciones activas pueden ocurrir en la ausencia de signos con la presencia de numerosos viriones en varios órganos, este es el caso cuando organismos de un año de edad son artificialmente infectados en laboratorio tanto trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) como trucha de arroyo (*Salmo trutta*) (Yamamoto, 1974).

La señal clave de la enfermedad para saber si en un brote está involucrada una variedad muy patógena, es la presencia de una alta mortalidad (Roberts, 1986; Wolf, 1988). La manifestación de cambios patológicos en los organismos está influenciada por factores como la edad y la condición fisiológica del organismo, temperatura del agua y el tipo de virus que infecta. En granjas de trucha la infección puede variar de inaparente o subclínica, a baja o mediana, hasta aguda en donde la mortalidad es total o casi total. Exceptuando cuando hay mortalidad total, los sobrevivientes pueden ser portadores del virus y un estudio para su detección puede reducir los factores condicionales para que vuelva a suscitarse la infección (Wolf, 1988).

HISTOPATOLOGIA DE LA NECROSIS PANCREATICA INFECCIOSA

La infección produce marcada necrosis pancreática, pero algunas veces los cambios histopatológicos ocurren en el tejido adiposo adyacente al páncreas, en el tejido hematopoyético renal, en el intestino y en el hígado.

Tejido Pancreático

La necrosis pancreática es típicamente evidente en células acinares, algunas áreas muestran cambios graduales lo que ocasiona una apariencia normal del tejido (Wolf, 1988), los núcleos de las células acinares presentan picnosis y cariorrhexis con moderado infiltrado inflamatorio (Ferguson, 1989) y cuerpos de inclusión constituidos por partículas virales regularmente vistas en células con avanzados estadios de degeneración. También pueden encontrarse en el citoplasma de células acinares ligeros cambios patológicos, mitocondrias hinchadas y marginación de cromatina en el núcleo. Las células se encuentran aparentemente funcionales ya que el retículo endoplásmico rugoso, el aparato de Golgi y los gránulos de zimógeno aparecen intactos (Lightner y Post, 1969).

Los cuerpos de inclusión del virus de la necrosis pancreática infecciosa varían en composición y tamaño, se clasifican en tres tipos básicos: el primer tipo consiste de partículas virales en arreglos cristalinos; el segundo esta compuesto de partículas virales arregladas al azar con masas de citoplasma en degeneración y en el tercer tipo las partículas están mezcladas con masas de membranas mielínicas (Lightner y Post, 1969).

Tejido Adiposo Adyacente al Páncreas

El tejido adiposo adyacente a los ciegos pilóricos puede mostrar necrosis de adipositos que puede ser causada por la liberación de zimógeno ó por el ataque directo del virus. En algunas ocasiones puede haber zonas con infiltrado inflamatorio.

Riñón

También pueden ocurrir cambios patológicos en los tejidos excretorio renal y hematopoyético, los daños renales son consistentes con el título alto de virus encontrado en riñón y en menor grado en peces portadores. De igual forma se ha descrito para trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) daño renal como congestión o hemorragia en glomérulos, edema y destrucción o descamación de epitelio tubular (Wolf, 1988).

Intestino

Otro cambio que ocurre es la necrosis y desprendimiento de la mucosa intestinal con infiltrado inflamatorio. Puede ir acompañado de abundante moco contenido en el lumen.

Hígado

Sano en 1971 describió que algunas truchas con necrosis pancreática infecciosa (NPI) tuvieron congestión y necrosis del tejido hepático. Swanson y Gillespie en 1979 notaron de manera similar una degeneración focal de las células parenquimatosas del hígado en juveniles de salmón del atlántico inoculados con el virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI). Kudo *et. al.* en 1973 mostró la presencia de viriones en hepatocitos (Wolf, 1988).

AISLAMIENTO DEL VIRUS DE LA NECROSIS PANCREÁTICA INFECCIOSA (VNPI)

Ya sea para determinar la causa de una infección o detectar portadores, el Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (VNPI) puede ser generalmente aislado de forma fácil y con alto grado de confianza. Las líneas celulares CHSE-214 (chinook salmon embryo) y RTG-2 (rainbow trout gonad) son recomendables para aislar el virus, por su susceptibilidad y respuestas líticas.

La línea celular RTG-2 proporciona identificación presuntiva de la presencia del virus de la necrosis pancreática infecciosa por producir placas líticas, la temperatura de incubación para las células está en el rango de 4°C a 26°C. En RTG-2 el efecto citopático se produce varios días después a incubación de 4°C, pero puede aparecer en 9 hrs. a 26°C (que es la temperatura más alta tolerada). Ciertamente el VNPI a más temperatura produce resultado de efecto citopático más rápido, pero otros virus de salmónidos pueden ser inhibidos. A una temperatura de 10°C es posible revelar cualquier virus de salmónidos, la temperatura promedio

usada para el del virus de la necrosis pancreática infecciosa es de 20°C y usualmente el efecto citopático aparece después de 48 hrs. en condiciones óptimas de cultivo, raras veces aparece a los 5 días (Wolf, 1988).

Evidentemente los órganos de portadores podrían contener muchos viriones, cuando las heces y los productos sexuales no contienen. El resultado obtenido en trucha de arroyo y arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) presentan evidencia de que los riñones son órganos importantes para la detección de animales portadores del virus.

La importancia de los riñones para el aislamiento del virus es real para todas las edades de los peces. En los organismos grandes solo se puede muestrear una pequeña parte del riñón y dar buen resultado. La parte posterior del riñón ha tenido mayores resultados en el contenido del virus (Yamamoto, 1974), sin embargo, ya diversos estudios han determinado que durante la infección los órganos riñón, bazo y ciegos pilóricos presentan una diferencia mínima para aislar el virus, y después de la infección como portador en bazo y riñón. (Reno *et.al*, 1978; Kinkelin, 1991).

Para trabajos de detección de portadores, donde la sensibilidad de los métodos es un requerimiento, los fluidos ováricos o el semen no requieren ser diluidos porque están fisiológicamente y generalmente libres de toxicidad para las células a las que se inoculan. Para trabajos de detección en peces con signología el tejido homogeneizado, el cual podría contener materiales inhibidores, se recomienda diluir a 1:10 o más. Lo ideal es 2 o más diluciones para inocular en pruebas de detección y diagnóstico. Nicholson y Dexter en 1975, observaron que el efecto citopático no se da en diluciones 1:10 de tejido homogeneizado, pero era claramente evidente a diluciones 1:1000 ó más, ellos postularon una posible interferencia homóloga. Otra razón más para hacer múltiples diluciones es que se requieren para cuantificar en aislamiento y poder determinar si es causante de mortalidad ó esta solamente presente (Wolf, 1988).

En poblaciones de salmónidos donde la mortalidad es consecuencia de necrosis pancreática infecciosa, el virus puede ser aislado no solo en el periodo donde la enfermedad es clínicamente evidente, sino que hasta varios años después en algunos sobrevivientes, esto mismo no es aplicable para otros virus de salmónidos. No todos los sobrevivientes son portadores del virus de la necrosis pancreática infecciosa e igualmente algunos de los portadores pueden expulsar virus intermitentemente (Wolf, 1988).

El rango de aislamiento de virus en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) es más bajo que el obtenido en trucha de arroyo lo cual podría ser por las diferencias entre estos salmónidos. El bajo rango de presencia del virus en trucha arco iris también podría indicar una resistencia general a la infección por el virus, debida a una resistencia natural que presentan los organismos viejos o a una inmunidad adquirida por la infección en etapa de cría (Yamamoto, 1974).

ANTECEDENTES

En 1955 Wood *et.al.* describieron una enfermedad infecciosa con características de una enteritis catarral que atacaba a alevines de trucha en granjas de producción en Norteamérica. Con estudios histopatológicos complementarios la llamaron **necrosis pancreática infecciosa (NPI)**, postulando una etiología viral. No fue sino hasta 1958 cuando Wolf *et.al.* reportaron el primer virus aislado de pez, el **virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI)** aislado gracias a los trabajos de Wolf y Dumber un año antes (1957) donde publicaron procedimientos para cultivar tejido de trucha. Posteriormente Wolf y Quimby (1968) immortalizaron la línea celular RTG-2 (rainbow trout gonad) por su susceptibilidad al virus de la necrosis pancreática infecciosa (citados por Wolf, 1988).

En 1960 un brote de NPI se suscitó en la Granja Nacional de Peces de Leetown, oeste de Virginia, con una mortalidad del 50% en poblaciones de trucha arco iris. En este estudio se muestrearon las vísceras de los organismos y se homogeneizaron, de estas muestras el virus fue aislado y clonado para depositarlo en la American Type Culture Collection como el tipo VR-299 (citados por Wolf, 1988).

En 1965 Cerini y Malsberger utilizaron por primera vez el microscopio electrónico para determinar la morfología del virus de la NPI, a lo que sucedieron una serie de reportes más sobre la enfermedad durante la década de 1960. Trabajos como el de Malsberger y Cerini, en ese mismo año (1965) indicaron que el VNPI era un RNA virus; Parisot *et.al.* (1965) reportaron la presencia de NPI en 10 estados más del oeste de Norteamérica. Los trabajos de Klonz *et.al.* en este año arrojaron datos acerca de la respuesta inmune de especies de salmónidos infectados experimentalmente con VNPI (citados por Wolf, 1988; Cerini y Malsberger, 1965).

Wolf *et.al.* (1963) rastreando y llevando a cabo pruebas virológicas en un lote de progenies de trucha de arroyo que estuvieron implicadas en un brote de NPI como portadores, encontraron al VNPI en ovario y fluidos gonádicos. Y a finales de la década Moss y Gravell (1969) incluyeron un descubrimiento preliminar de que el RNA del virus era de doble cadena. El mismo año Wolf y Quimby reportaron la respuesta inmunológica de trucha de arroyo y arcoiris contra el VNPI.

Posteriormente Wolf, Quimby y Carlso (1969), durante pruebas de virulencia de 15 tipos de VNPI, mostraron que las mortalidades van desde el 10 hasta el 90%, ellos también midieron índices de neutralización con suero de conejo anti VR-299 contra 28 aislados del virus (citados por Wolf, 1988).

Ya en la década de 1970 Frantsi y Swan (1971) en muestreos de rutina para detectar el virus, revelaron que tomando el riñón de muestra se identificaban mejor los portadores del virus que tomando solo las heces; sin embargo ellos notaron que el estrés incrementa el número de portadores que desalojaban virus en heces. Durante 1971 apareció más información sobre la diversidad de tipos de VNPI, Sano (1971) encontró NPI en Japón y sus aislados del VNPI fueron semejantes serológicamente al tipo Norteamericano y Francés. A su vez Wolf y Quimby (1971) que aislaron diferentes tipos de VNPI en peces de Francia mostraron que estos eran regularmente diferentes al tipo norteamericano VR-299 (citados por Wolf, 1988).

Vestergard Jogersen y Meyling en 1972 mencionaron brevemente la primera aplicación sucesiva de una técnica directa de inmunofluorescencia en células en cultivo infectadas con VNPI. Sano en ese mismo año aisló VNPI de peces en 27 granjas inspeccionadas en Japón. Por otra parte Piper *et.al.* (1973), aplicaron una técnica directa de inmunofluorescencia a un estudio cinético de replicación de VNPI *in vitro*, mostraron que el antígeno podría ser detectado dentro de un estanque varias horas después de la infección (citados por Wolf, 1988).

Se pueden citar algunos trabajos de las investigaciones llevadas a cabo de 1975 a 1980 como: Alayse *et al.* 1975 que describió la síntesis de RNA del VNPI seguido de 2 reportes de Desautels y Mackelure (1975) sobre la estabilidad e inactivación del mismo. Schlotfeldt y Frost (1975) reportaron en Alemania el primer caso de infección doble en trucha arco iris en condiciones naturales por 2 virus, el Egtved virus y el VNPI. Yamamoto en 1975 encontró VNPI y enfermedad bacteriana en el riñón de un mismo pez. Mulcahy y Fryer en 1976 descubrieron una infección debida a VNHI y VNPI en trucha arco iris. Reno *et al.* (1978) confirmaron que adultos de trucha podrían ser infectados con VNPI y presentar respuesta inmune y eliminar la infección, por el contrario en alevines de trucha de arroyo experimentalmente infectados, la enfermedad continuaba y se tenían más portadores. Mientras Reno en 1976 había usado una prueba indirecta de inmunoperoxidasa para la identificación del VNPI, Nicholson y Henchal (1978) encontraron que la prueba directa de inmunoperoxidasa era más específica (citados por Wolf, 1988).

Cerca del 20% de las referencias de los años 1980 a 1988 fueron reportes de casos de nuevos brotes u hospederos y aislamientos de VNPI en nuevas áreas geográficas como Chile, Corea y Taiwán. Las revisiones de Hill (1982) y Ahne (1985) incluyeron listados de especies de peces en las que había aislado el VNPI, los nuevos hospederos incluyeron diversas especies de importancia comercial en acuacultura, que mostraron signos de enfermedad y presentaron mortalidades: pez cola amarilla (*Seriola quinqueradiata*) por Sorimachi y Hara (1985); locha (*Misgurnus anguillicolubatus*) por Kou y Chen (1984) y la perca marina (*Dicentrarchus labrax*) por Bonami *et al.* (1983). (citados por Wolf, 1988).

Otro 20% de los reportes son sobre el aislamiento e identificación del virus. Se dió mucha atención a técnicas serológicas: métodos de rápida identificación del VNPI usando anticuerpos acoplados a fluorocromos por Swanson y Gillespie (1984); ELISA por Dixon y Hill (1983) y Coaglutinación por Kimua *et al.* (1984). Otros trabajos de interés fueron: Inmunización y vacunas, discutidas por Dixon y Hill (1983) y Hill *et al.* (1980); hallazgos sobre transmisión del VNPI particularmente sobre aspectos de transmisión vertical, se presentaron en trabajos de Ahne y Neyele (1985) y Dorson y Torchy (1985). Los reportes de Okamoto *et al.* (1984) y Swanson *et al.* (1982) trataron sobre la patogénesis y los efectos antivirales de drogas y desinfectantes usados en acuacultura incluyendo para el VNPI. Desde finales de 1985 a 1988 se comenzaron a desarrollar trabajos sobre anticuerpos monoclonales contra virus de peces incluyendo el VNPI por J.C. Leong de la Universidad de Oregon y B.L. Nicholson de la Universidad de Marina. (Citados por Wolf, 1988) (Swanson y Gillespie, 1984) (Dixon y Hill, 1983).

Métodos utilizados para el diagnóstico de NPI.

Inmunofluorescencia (IF)

La prueba con anticuerpos marcados con fluorocromos ha sido empleada para el estudio del virus de la NPI incluyendo la presencia de antígenos virales en células cultivadas (Vestergard y Jorgensen, 1974), replicación del VNPI en células de Salmón del Atlántico (Piper, Nicholson y Dum, 1973), el efecto de la temperatura sobre el crecimiento y sobrevivencia del virus (Hedrick, Leong y Fryer, 1978).

Sin embargo, los métodos de inmunofluorescencia (IF) están limitados en su mayor parte para estudios *in vitro* y no habían sido usados para detección de antígenos virales en tejido de peces infectados. Podríamos mencionar que a partir de Swanson y Gillespie (1981) se da el uso de la técnica de inmunofluorescencia (IF) indirecta sobre tejidos pancreático, intestinal y hepático de organismos infectados experimentalmente, con manifestación aguda de la enfermedad usando un suero polivalente de conejo anti VNPI. Caswell-Reno *et al.* (1986) comenzaron sus trabajos en la producción de anticuerpos monoclonales (MAbs) en estudios de tipificación serológica y análisis de epítomos virales en diferentes aislados de IPNV.

En el manual de la OIE (1995) se incluye el uso de anticuerpos para la certificación de lotes de organismos para la NPI en pruebas de neutralización y ELISA, tanto para portadores como para diagnóstico de brote. Se incluye también el aislamiento del virus por cultivo en células BF-2 y CHSE-214.

Citometría de flujo (C.M.F)

La citometría de flujo (C.M.F) es una técnica relativamente nueva de análisis automático de células, por macromoléculas sensibles (DNA, RNA o proteínas) con fluorescentes específicos. Dentro de los campos de aplicación de esta técnica hay estudios sobre diferenciación celular, análisis cromosómico, microbiología, genética, examen clínico hematológico, inmunología y oncología. Sin embargo hay relativamente pocas publicaciones sobre virología usando C.M.F (Rodríguez, 1991, 1995).

En peces la técnica se ha utilizado para detectar infecciones virales por cambios en el contenido de los ácidos nucleicos y por la expresión de antígenos virales en las células (1988), para identificar poblaciones de leucocitos en pez gato (*Ictalurus punctatus*) en 1990, para identificar células fagocíticas y células productoras de inmunoglobulinas en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) 1990.

Las amplias posibilidades de este método han hecho que se aplique en la detección de VNPI en leucocitos y células espermáticas de poblaciones de reproductores de trucha arcoiris (Rodríguez *et al.* 1991, 1993)

Otras técnicas.

Las investigaciones realizadas en el transcurso de la última década 1990 a 1997 tratan sobre efectivas inmunizaciones y desarrollo de vacunas, aplicación de técnicas como la citometría de flujo para la detección y caracterización del virus (Pérez, 1991, Rodríguez, 1993) y Biología Molecular del virus (Pérez, 1997) y detección por PCR (Alonso, 1999). Sin embargo progresos recientes están teniendo una orientación hacia la aparición de NPI entre cada vez más peces no Salmónidos y más áreas geográficas en donde no se había reportado.

JUSTIFICACION

La Red de Diagnóstico y Prevención de Enfermedades de Organismos Acuáticos a Nivel Nacional a llevado a cabo estudios de diagnóstico, aislamiento de patógenos, estudios toxicológicos, histopatológicos, de calidad del agua, etc. en diversas granjas de producción de diferentes especies en el territorio nacional. En particular de la trucha se han diagnosticado enfermedades producidas por parásitos como *Hexamita salmonis*, *Ichthyophthirius multifiliis* y *saprolegnia* sp. (Ortega, 1997) sin embargo, las enfermedades de etiología viral en esta especie no han sido investigadas, hasta 1999 la Necrosis pancreática Infecciosa (NPI) no se había evidenciado en México.

En 1996 y 1997 en el Municipio de Amanalco de Becerra, Estado de México, ocurrió un brote que presentó varias características compatibles con NPI y que fue diagnosticado como presuntivo de NPI. Se presentó una mortalidad acumulada de crías de aproximadamente el 60% de un lote (100,000 crías) proveniente de una importación.. Externamente los organismos presentaron distensión abdominal, oscurecimiento de piel y pseudofecas.

Estudios histopatológicos evidenciaron lesiones severas en páncreas, intestino y ciegos pilóricos. No se encontró agente etiológico bacteriano alguno. La evaluación al microscopio electrónico evidenció algunas partículas hexagonales en el citoplasma de células infectadas. El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Histología, de la unidad de Morfofisiología en la UNAM Campus Iztacala. Mortalidades semejantes están ocurriendo en diferentes regiones del Estado por lo que es necesario realizar estudios más precisos para la detección de posibles brotes de NPI así como del estadio de portador en nuestro país.

DESCRIPCIÓN DEL AREA DE ESTUDIO

Para el desarrollo del presente trabajo se realizaron 6 muestreos en dos granjas trutícolas del Estado de México, por motivos que convienen a los productores se les denominó a las granjas como "A" y "B".

La granja "A" se encuentra en la localidad de Corral de Piedra dentro del municipio de Amanalco de Becerra. Su ubicación esta dada por las coordenadas longitud 99° 58' 99", latitud 19° 12' 24" a una altura de 2900 m.s.n.m..

La granja esta instalada dentro de la subcuenca mayor de Amanalco, el abastecimiento de agua es de un río sustentado por un manantial ubicado a 800m fuera de la propiedad. Corresponde a la 5ª granja de 11 que usan el agua de ese mismo afluente, el flujo de entrada es de 40 lts/seg y es continuo en todo el año con una temperatura promedio de 14°C.

La granja tiene 5 años de actividad de engorda, tiene estanquería rústica y circular de concreto sin aireadores, no tiene sala de incubación ni alevinaje. El suministro de alimento, marca Purina, es manual. El abastecimiento de los lotes de crías es del centro acuícola el Zarco, y en ocasiones de importación en grupo de E.U.A de la empresa Trout Lodge.

El lote estudiado fue denominado como no portador y presentó una densidad de N=10000 organismos de tallas entre 15 a 20 cm y se tomó una muestra de n=30 organismos vivos.

La Granja "B" se encuentra en la localidad del Pedregal, Venta Morales, dentro del poblado del Pedregal. Su ubicación esta dada por las coordenadas longitud 99°55'01", latitud 18°56'95" a una altura de 2400 m.s.n.m.

El abastecimiento de agua se sustenta en 2 manantiales ubicados dentro de la propiedad con un flujo de 80 lts/seg. Es el único usuario del afluente.

La granja tiene 15 años de actividad de engorda con estanquería tipo "raceways" sin aireadores. La estanquería para crianza es de concreto con protección de malla ciclónica y abastecimiento de agua independiente. Tiene sala de incubación y cuarentena certificada.

El suministro de alimento, marca propia, es manual. El abastecimiento de crías es por importación en grupo de E.U.A. de la empresa Trout Lodge.

El lote estudiado proviene de una importación original de la empresa Trout Lodge, E.U.A de 800,000 huevos oculados que entraron directamente de aduana con certificado de ausencia de patógenos como el VNHI, OMV, VSH Y VNPI. De estos huevos solo 300,000 fueron destinados a esta granja. Posteriormente dicho lote presentó una mortalidad acumulada aproximadamente del 90% durante la incubación, alevinaje y crianza. El acuicultor solicitó un diagnóstico durante la mortalidad al CIESA de la Universidad Autónoma del Estado de México. Dicho diagnóstico fue confirmado como brote de NPI (información no publicada). Los sobrevivientes de este lote fueron considerados como el lote portador. El lote estudiado presentó una densidad de N=8000 organismos de diferentes tallas y se tomó una muestra de n=30 organismos vivos.

OBJETIVO GENERAL

- Y DETECTAR EL VIRUS DE LA NECROSIS PANCREÁTICA INFECCIOSA (VNPI) EN ORGANISMOS PORTADORES EN GRANJAS DEL ESTADO DE MEXICO.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar lesiones de necrosis pancreática infecciosa en ciegos pilóricos, riñón y bazo de organismos portadores de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) mediante histopatología.
2. Detectar el virus de la necrosis pancreática infecciosa en bazo de portadores de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), con un anticuerpo monoclonal contra VNPI evidenciando por citometría de flujo.
3. Detectar el virus de la necrosis pancreática infecciosa en riñón de portadores de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), mediante Microscopia Electrónica.
4. Detectar el virus de la necrosis pancreática infecciosa en riñón de portadores de trucha arco iris con un anticuerpo monoclonal contra VNPI (*Oncorhynchus mykiss*), mediante prueba de ELISA.

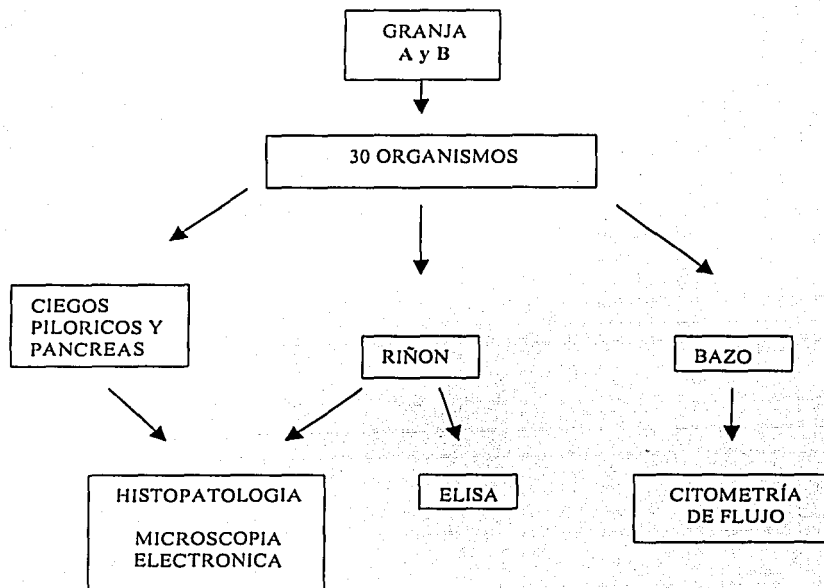
METODOLOGIA

HISTORIA CLINICA DE LOS LOTES: Se registraron los antecedentes de los organismos a muestrear, origen (externo o interno), movimientos que ha tenido en los estanques y parámetros fisicoquímicos del agua.

COLECTA: Se colectaron 30 organismos por granja.

REGISTRO: Por cada organismo colectado se hizo una descripción de la anatomía externa, esto se registró en forma de expediente asignándose un número de identificación para cada uno.

DIAGRAMA DE FLUJO METODOLOGIA



PROCESAMIENTO HISTOLOGICO: para la obtención de las muestras se realizó una incisión desde la base de las aletas pectorales hasta la base de las aletas anales sobre la parte ventral, se observaron los órganos internos y se registraron sus características.

De cada uno de los organismos se extrajo el tracto digestivo completo para tomar una muestra de ciegos pilóricos y páncreas, también se tomaron muestras de riñón e hígado y se fijaron en solución Bouin (apéndice), estas muestras se procesaron en el laboratorio por técnica histológica de rutina. El bazo se colectó y se conservó en solución salina isotónica en refrigeración hasta su procesamiento para citometría de flujo.

Las muestras fijadas en solución Bouin se sometieron a varios lavados con agua corriente hasta eliminar el color, posteriormente se deshidrataron por medio de cambios graduales de alcohol desde 70% hasta absoluto con tiempos de 30 min. en cada cambio.

El tejido deshidratado se aclaró con 2 cambios de xilol de 15 min. cada uno y se procedió a una preinclusión con una solución 1:1 de xilol/parafina por 60 minutos, seguida de 60 minutos de infiltración en parafina con dos cambios. El tejido se incluyó en parafina.

Se realizaron cortes de 5 micrones en microtomo rotatorio. Se obtuvieron 4 series de cortes por muestra colocados en portaobjetos. 2 series de cortes de cada muestra se tiñeron por la técnica Hematoxilina y Eosina (ver apéndice) y las 2 series restantes con tinción Gram (ver apéndice).

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

El tejido fijado en formol al 10% fue lavado con amortiguador de fosfatos pH 7.4 (PBS) en 2 cambios de 10 minutos cada uno. Se realizó una post-fijación con una solución v/v de tetraóxido de osmio en PBS durante 40 minutos. Posteriormente se lavó con PBS en 2 cambios de 10 minutos cada uno.

La deshidratación se realizó con cambios graduales de alcohol de la siguiente manera:

50°, 60° y 70°, 5 minutos cada uno.

80°, 10 minutos.

90° y 96°, 12 minutos cada uno.

3 cambios de alcohol de 100°, 15 minutos cada uno.

Después de la deshidratación se dieron 2 cambios de óxido de propileno durante 10 minutos cada uno. La preinclusión se hizo con una mezcla de resina EPON con óxido de propileno 1:3 durante 1 hora. Seguido se hizo un cambio con resina EPON y óxido de propileno v/v durante toda la noche, posteriormente se incluyó en resina EPON y se procedió a cortar los bloques en ultra microtomo.

Los cortes se montaron en rejillas de cobre y se tiñeron con citrato de plomo-acetato de uranio para su observación al microscopio electrónico de transmisión.

EVALUACION POR CITOMETRIA DE FLUJO:

La muestra de bazo fue macerada sobre una rejilla de acero que descansa sobre una caja Petri con 10 ml de medio de cultivo, se presionó con un émbolo de jeringa utilizando la parte plana. La suspensión se filtró a través de la rejilla para evitar que queden pedazos de tejido demasiado grandes y la suspensión celular se centrifugó a 1300 r.p.m. durante 7 minutos en frío.

El paquete celular fué resuspendido en 3ml de cloruro de amonio y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos (para lisar eritrocitos). Se lavó con 10 ml de solución amortiguadora de fosfatos salina pH 7.2 con 0.5% de albúmina sérica y 0.1% de azida de sodio (PBA) a 1300 r.p.m. durante 7 minutos. El paquete celular se resuspendió en 1 ó 2 ml de PBA y se contó el número de células; se ajustó la concentración a 1×10^6 células por ml y se repartió 1 ml en cada tubo para citómetro (FACS Sorter).

Los tubos se rotularon de la siguiente manera:

- 1.- células sin teñir
- 2.- control de estreptoavidina acoplada a isotiocianato de fluoresceína
- 3.- IgG1 de ratón comercial acoplada a biotina.
- 4.- anticuerpo monoclonal comercial AS1 anti-virus de la necrosis pancreática infecciosa acoplado a biotina.

La suspensión celular se centrifugó a 1300 r.p.m. durante 7 minutos y la pastilla se resuspendió en 350µl de solución permeabilizante comercial (Dilución 1:10), se incubó durante 10 minutos y se lavó con 3 ml de PBA a 1300 r.p.m. durante 7 minutos. El paquete celular se resuspendió para cada tubo de la siguiente manera:

Tubo:

- 1.- 30µl de amortiguador de fosfato salino pH 7.2 (PBS)
- 2.- 30µl de amortiguador de fosfato salino pH 7.2 (PBS)
- 3.- 30µl de una dilución 1:500 de IgG1 de ratón acoplada a biotina.
- 4.- 30µl de una dilución 1:500 del anticuerpo monoclonal AS1 anti-virus de la necrosis pancreática infecciosa.

Se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron con 3 ml de PBA a 1300 r.p.m. durante 7 min. y se resuspendió el paquete celular para cada tubo de la siguiente manera:

Tubo:

- 1.- 30µl de PBS
- 2.- 30µl de una dilución 1:1000 de estreptoavidina acoplada a isotiocianato de fluoresceína
- 3.- 30µl de una dilución 1:1000 de estreptoavidina acoplada a isotiocianato de fluoresceína
- 4.- 30µl de una dilución 1:1000 de estreptoavidina acoplada a isotiocianato de fluoresceína

Se incubaron durante 30 min. a temperatura ambiente. Se lavaron las células con 3 ml de PBA a 1300 r.p.m. durante 7 minutos en frío y se resuspendió el paquete celular en 500µl de solución de formol amortiguado al 4% y se analizaron las células teñidas por citometría de flujo.

EVALUACION POR ELISA

Para esta prueba se hicieron 5 agregados (pool) de 6 riñones cada uno fijados en formol al 10%, los riñones de los organismos portadores y no portadores se maceraron y se distribuyeron en 6 pozos de la placa para ELISA para cada pool, depositando 100µl de muestra por pozo, se incubó durante toda la noche a una temperatura de 4°C. Se lavó 5 veces con amortiguador de fosfatos salina con Tween al 0.1% (PBS-TW). Se bloqueó agregando 100µl de una solución de leche descremada al 4% en PBS-TW (por pozo) durante 1 hr y se lavó 5 veces con PBS-TW.

Se agregaron 100µl por pozo del primer anticuerpo diluido en PBS según correspondía: Pozo A1 y A2 muestra problema dilución 1:500 de anticuerpo monoclonal AS1 anti virus de la necrosis pancreática infecciosa acoplado a biotina A3 y A4 control de isotipo dilución 1:500 de anticuerpo IgG1 de ratón acoplado a biotina. A5 y A6 control de estreptoavidina acoplada a peroxidasa, se agregó solución PBS. Se incubaron a 37°C durante 1 a 2 horas, y se lavó con PBS-TW.

Se agregaron a cada pozo 100µl de estreptoavidina acoplada a peroxidasa y se incubó a 37°C por 1 o 2hrs. Se lavó 5 veces con PBS-TW. Se agregaron a cada pozo 100µl de peróxido de hidrógeno al 20% y 10 mgr de ortofenilendiaminobencidina por 10 ml de peróxido de hidrógeno, se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La reacción se detuvo agregando 50µl de solución 4N de H₂SO₄ (por pozo). El resultado de la prueba fue determinado por la ausencia o presencia de color.

RESULTADOS

EVALUACIÓN DE ORGANISMOS NO PORTADORES (GRANJA "A")

Valoración Anatómica

En la evaluación general del lote de no portadores se observó comportamiento normal de los organismos como: buena respuesta a estímulos externos, coloración homogénea entre los individuos e ingesta normal de alimento. Las condiciones del estanque y agua estuvieron dentro de los parámetros normales.

Se colectó una muestra de 30 organismos de talla entre 10 a 20 cm con buena pigmentación en piel, cantidad de moco normal, aletas completas y sin cambios patológicos aparentes; ojos, opérculo y branquias también sin cambios patológicos aparentes,

A la disección se observó la cavidad abdominal y el tracto digestivo sin cambios de tamaño, coloración o posición y sin hemorragias aparentes. Grasa abundante en el área de los ciegos pilóricos en los organismos más grandes; el bazo, corazón, vejiga gaseosa, hígado y riñón sin cambios patológicos aparentes.

Valoración histológica

Ciegos pilóricos: en la mayoría de las muestras de ciegos pilóricos no se observaron cambios significativos. Se apreciaron bien las capas constitutivas del tubo, mucosa con vellosidades; submucosa; muscular y serosa. (Figura 2). Sin embargo en el 40% de estas muestras se observaron algunos focos de lesión de la mucosa y submucosa consistentes en: necrosis focal leve o moderada y necrosis severa multifocal.

Páncreas: El tejido pancreático localizado en las inmediaciones de los ciegos pilóricos (figura 3), presentó en general un arreglo regular con células dispuestas en acinos y con abundante contenido de gránulos de cimógeno eosinofílicos (Figura 4). En el 10% de estas muestras se presentaron cambios en el arreglo de los acinos acompañados de fibrosis, (Figura 5). Como una generalidad de los organismos no portadores, se observaron pequeñas áreas con desarreglo celular y disminución de gránulos de cimógeno (Figura 6).

Riñón: El tejido renal posterior se observó en general sin cambios patológicos aparentes, los túbulos contorneados presentaron epitelio completo y pigmentación normal con variaciones en el contenido de depósitos eosinofílicos en lumen y epitelio tubular. (Figura 7). Con respecto a los corpúsculos renales, los glomérulos, espacio y cápsula de Bowman se observaron normales. Solo con variaciones en tamaño y contenido de depósitos eosinofílicos. (Figura 7). El intersticio no tuvo cambios patológicos aparentes.

En algunas secciones de riñón se pudieron observar con poca frecuencia necrosis leve del epitelio tubular.

Microscopia Electrónica.

En la valoración de la ultraestructura del tejido pancreático y renal no se observaron cambios en las células.

Prueba de ELISA

Los resultados de esta prueba para la detección del VNPI en organismos no portadores fueron negativos.

| POOL | CONTROL DE ESTREPTOAVIDINA | CONTROL DE ISOTIPO | PROBLEMA |
|------|----------------------------|--------------------|-----------------|
| 1. | <i>Negativo</i> | <i>Negativo</i> | <i>Negativo</i> |
| 2. | <i>Negativo</i> | <i>Negativo</i> | <i>Negativo</i> |
| 3. | <i>Negativo</i> | <i>Negativo</i> | <i>Negativo</i> |
| 4. | <i>Negativo</i> | <i>Negativo</i> | <i>Negativo</i> |
| 5. | <i>Negativo</i> | <i>Negativo</i> | <i>Negativo</i> |

Valoración por citometría de flujo.

Las células obtenidas de cada bazo de los organismos del lote no portador, fueron mezclados para formar 6 agregados (pool), cada uno con 5 organismos, se analizaron por citometría de flujo 10,000 células por pool. Los resultados de los histogramas corresponden a la intensidad de fluorescencia en la población celular seleccionada (Figura 21). Tomando de referencia los histogramas de los controles A, B y C, la ubicación del histograma D sobre el eje X nos indica que las muestras del lote de la granja "A", no tienen células infectadas con el VNPI y por lo tanto fueron negativas de fluorescencia específica.

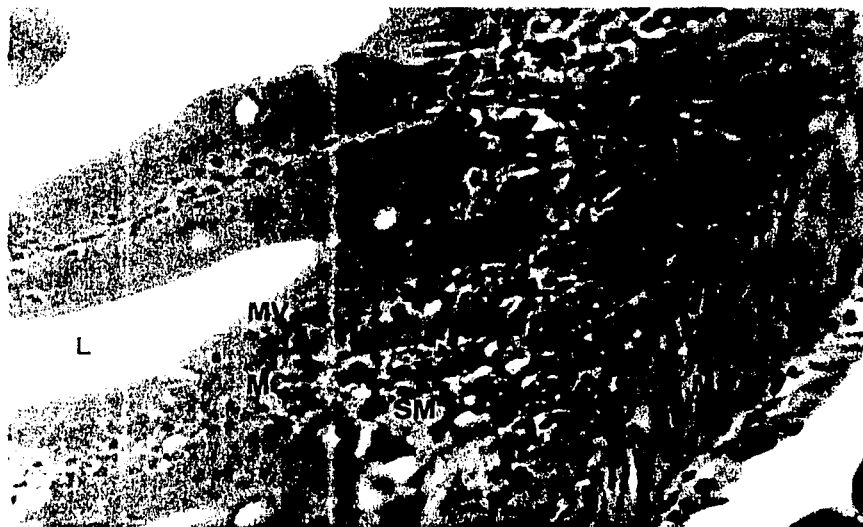


Figura 2. Fotomicrografía de sección de ciegos pilóricos de un organismo no portador donde se observan las capas estructurales del tubo intestinal, lumen (L) microvellosidades (MV), mucosa (MC), submucosa (SM) y muscular (M) con apariencia normal. Tinción H-E. 800X.

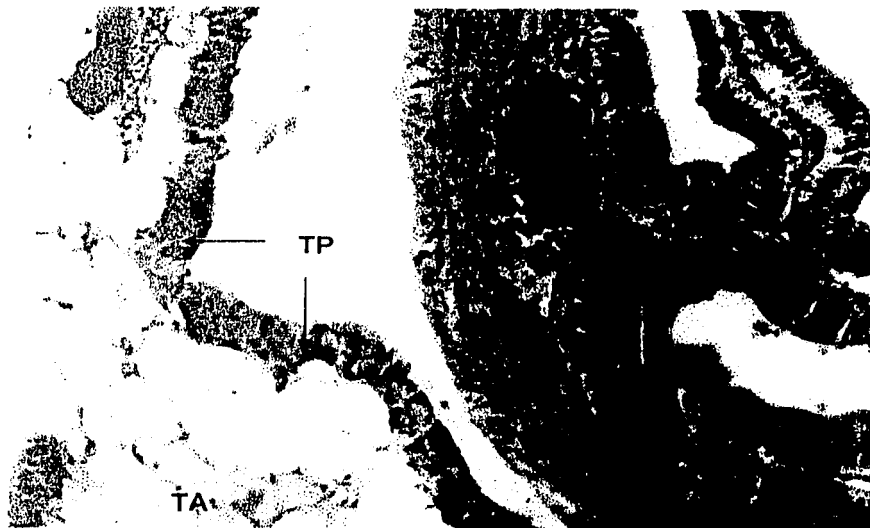


Figura 3. Fotomicrografía de una sección transversal de ciegos pilóricos de organismo no portador, el tejido pancreático (TP) se encuentra embebido entre los ciegos pilóricos y se dispone alrededor del tubo intestinal (TI). Tejido adiposo adyacente (TA). Todo de apariencia normal. Tinción H-E. 400X

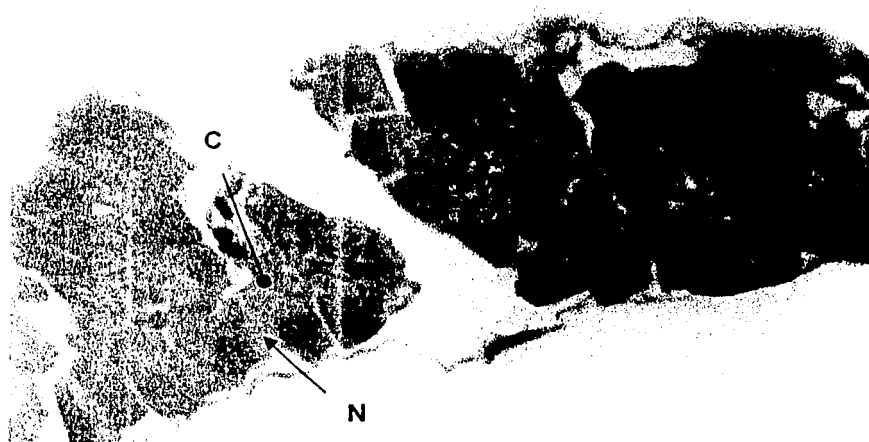


Figura 4. Fotomicrografía de sección de tejido pancreático normal de un organismo no portador, se puede apreciar la forma típica trilobulada de las células, así como su arreglo en acinos. Resalta el color eosinófilo característico de los gránulos zimógenos (C) en el citoplasma celular y el núcleo basófilo de tamaño normal (N). Tinción H-E. 1600X.

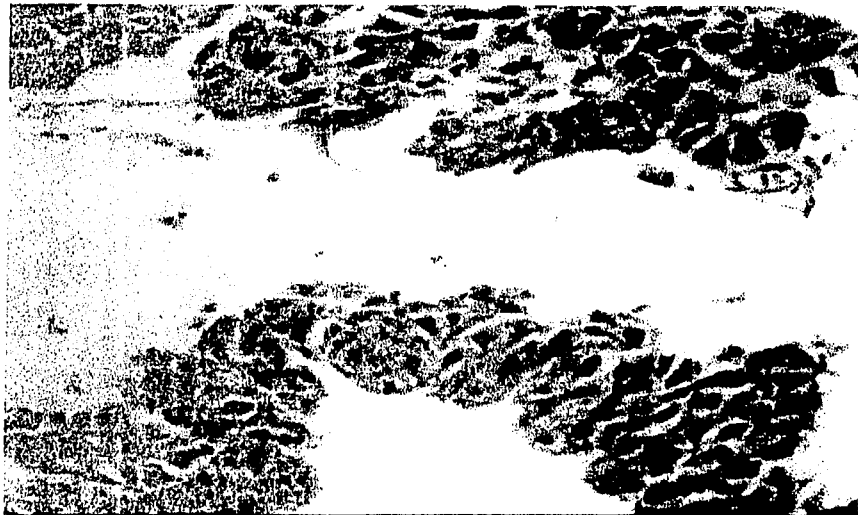


Figura 6. Fotomicrografía de tejido pancreático de un organismo no portador, donde se aprecia pérdida de gránulos de zimógeno y cambio morfológico de las células acinares tinción H-E, 800X.

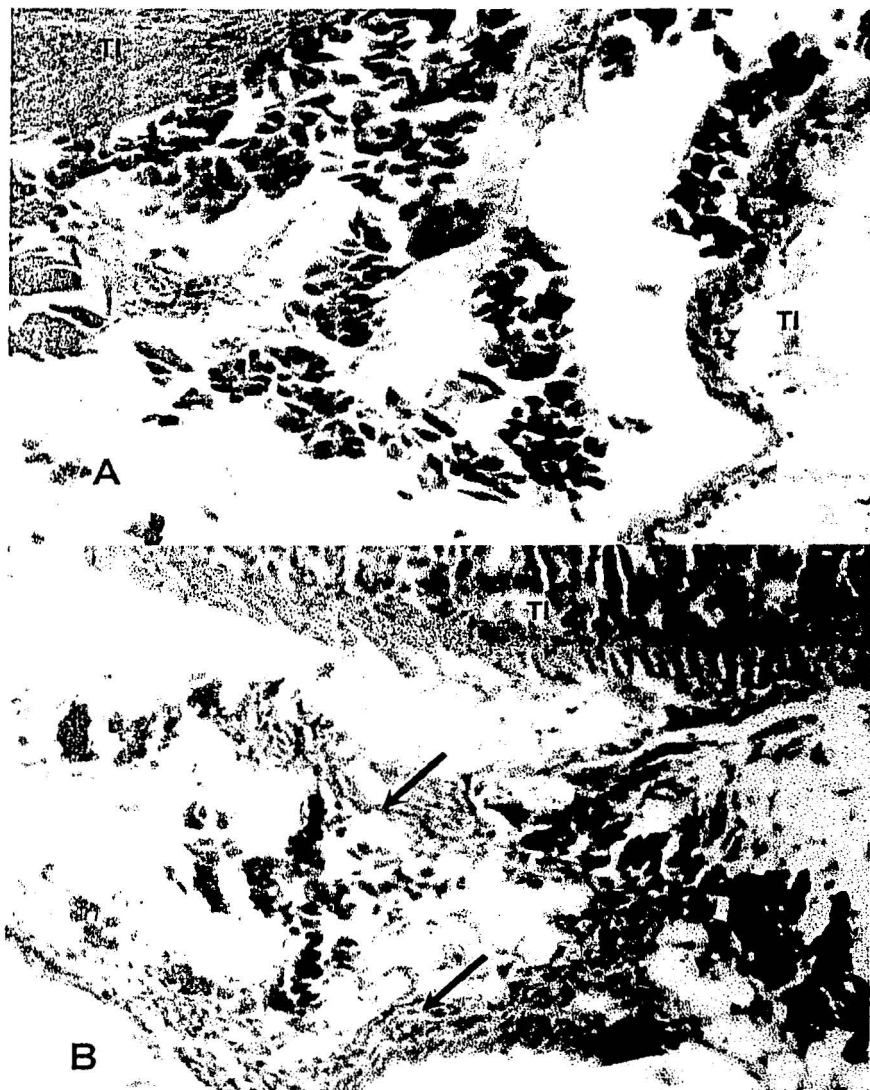


Figura 5. fotomicrografía de una sección de ciegos pilóricos de un organismo no portador, en (A) el tejido pancreático adyacente al tubo intestinal (TI), con desarreglo celular, los acinos se han perdido y las células tienen cambios de forma. Note el ciego pilórico con necrosis severa. (B) tejido pancreático con una marcada fibrosis (flecha) y una pequeña área de necrosis, note la perdida del arreglo de los acinos. Tinción H-E, 400X.

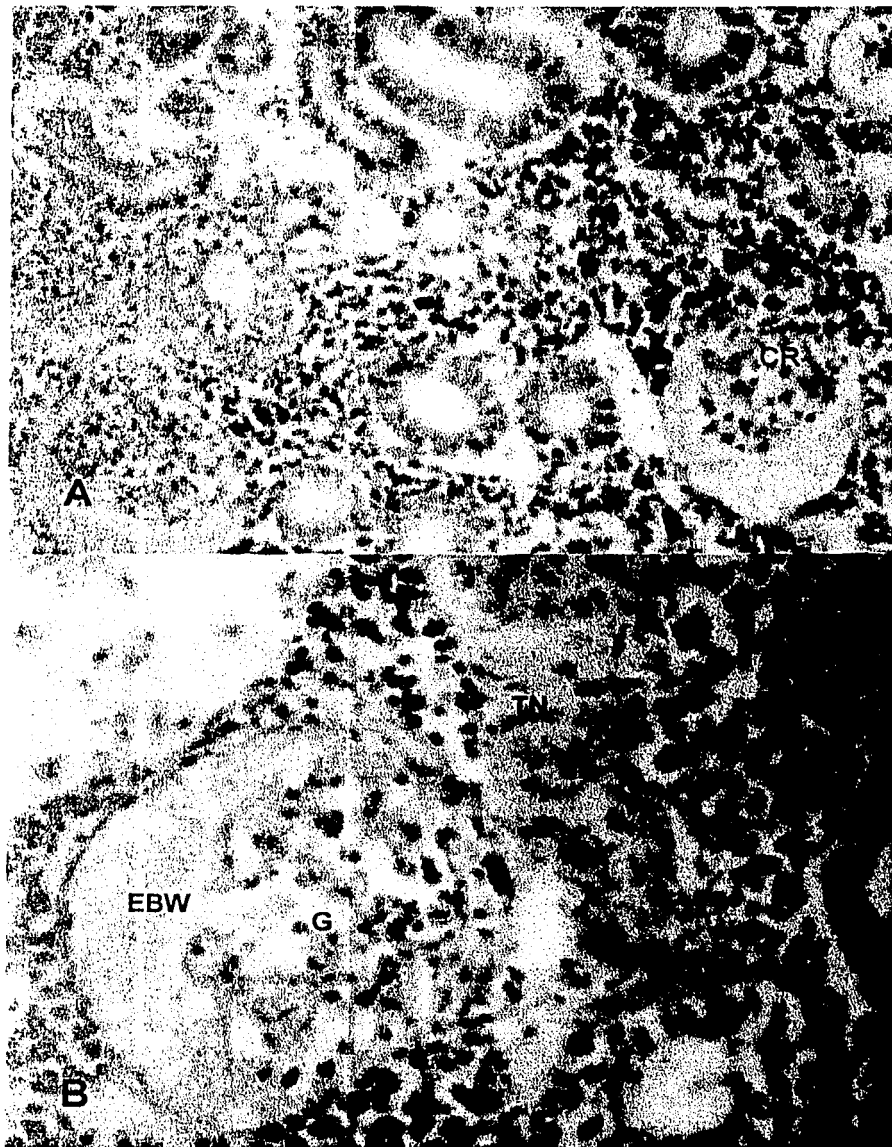
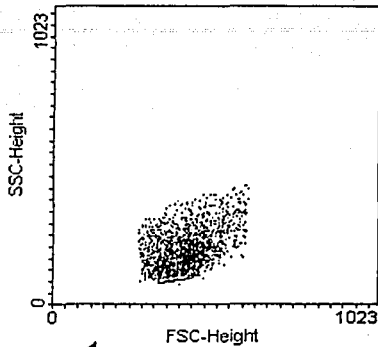
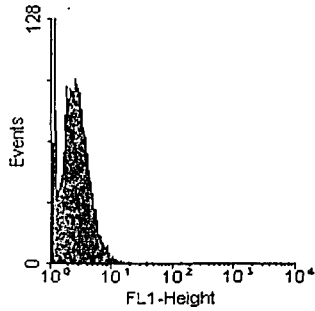


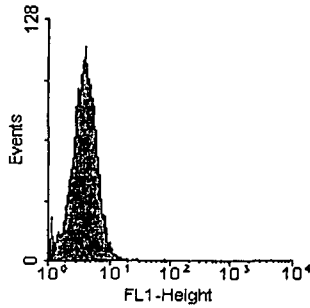
Figura 7. Fotomicrografía de sección de riñón de un organismo no portador. A. Sección donde se pueden apreciar los corpúsculos renales (CR) con depósitos eosinofílicos en el espacio de Bowman. B. Detalle de un corpúsculo renal con depósitos eosinofílicos en el espacio de Bowman (EBW), glomérulo (G) y túbulo necrótico (TN). Tinción H-E, A: 400X. B: 800X.



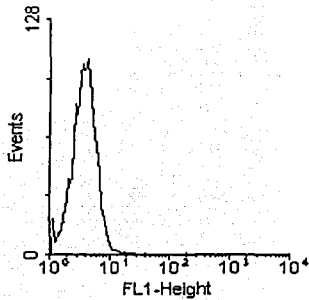
1



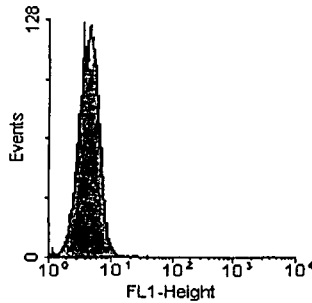
A



B



C



D

Figura 21 . Histogramas de células de bazo de un agregado (pool) del lote no portador. 1. Se muestra la población de células de bazo seleccionada por tamaño y granularidad. (A) células sin teñir, (B) control de FITC, (C) control de isotipo, (D) anticuerpo anti-VNPI. Observándose la ausencia de VNPI en la muestra.

SSC-Height = Granularidad
 FSH-Height = Tamaño
 Events = Número de células
 FL1-Height = VNPI

EVALUACIÓN DE ORGANISMOS PORTADORES

Valoración Anatómica

En la evaluación general del lote se observó comportamiento normal de los organismos como: buena respuesta a estímulos externos, coloración homogénea entre los individuos e ingesta normal de alimento. Las condiciones del estanque y agua estuvieron dentro de los parámetros normales.

Se colectó una muestra de 30 organismos de talla entre 20 a 30 cm, con buena pigmentación en piel, cantidad de moco normal, aletas completas y sin cambios patológicos aparentes; ojos, opérculo y branquias también sin cambios patológicos aparentes,

A la disección se observó la cavidad abdominal y el tracto digestivo sin cambios o hemorragias aparentes. Grasa abundante en el área de los ciegos pilóricos en los organismos más grandes; el bazo, corazón, vejiga gaseosa y riñón sin cambios patológicos aparentes. El hígado presentó una coloración ligeramente pálida con pequeñas hemorragias.

Valoración histológica

En los ciegos pilóricos se observaron cambios histopatológicos difusos generalizados y en diferente grado, así también se encontraron regiones con un arreglo normal (Figura 8). Se identificaron áreas de necrosis leve multifocal de la capa mucosa, la submucosa, muscular y serosa (Figura 9).

Se observó con mayor frecuencia zonas de necrosis de moderada a severa multifocal afectando la capa mucosa y submucosa (Figura 10). Algunas de estas zonas presentaron moco abundante en el lumen y acompañadas en algunos casos con infiltrado inflamatorio y abundantes células granulares eosinofílicas (Figura 9).

Páncreas: Aunque en todas las muestras se observaron secciones de tejido pancreático normal, pudiendo incluso apreciar los islotes de Langerhans (Figura 11) y células acinares con abundante contenido de gránulos de zimógeno, fue consistente en el 80% de la muestra la presencia de áreas con cambios en la morfología de las células del tejido pancreático, (Figura 12), donde las células pierden su forma característica ocasionando un desarreglo de los acinos. En algunas partes los cambios de forma y pigmentación de las células resaltan un núcleo grande y pálido traslucido (Figura 12). El 40% de estos cambios se acompañaron de focos de necrosis moderada donde se observan células en proceso degenerativo adyacentes de restos celulares dispersos (Figura 13) y necrosis severa (Figura 14).

Riñón: El tejido del riñón posterior presentó 6 cambios importantes que se observaron de manera consistente en el 90% de las muestras (Tabla 2): Necrosis de los túbulos moderada a severa (Figura 15) multifocal o difusa. Las células del epitelio tubular con picnosis y citoplasma licuefactivo (Figura 16), picnosis y citoplasma reducido (Figura 17 y 18). Glomerulonefritis mesangio proliferativa leve; depósitos eosinofílicos en el lumen de los tubulos, epitelio tubular y espacio de Bowman; y cambios en intersticio como necrosis leve focal y edema.

| Organismo | Cambio observado | | | | | |
|-----------|------------------|------|-------|-------|--------|-----|
| | NT | GNMP | DE/LT | DE/ET | DE/EBW | CI |
| 1. | --- | --- | + | + | --- | --- |
| 2. | ++ | + | + | + | --- | --- |
| 3. | + | + | + | + | --- | --- |
| 4. | --- | --- | + | + | --- | --- |
| 5. | --- | --- | + | + | --- | --- |
| 6. | ++ | ++ | + | + | --- | + |
| 7. | + | + | --- | --- | --- | --- |
| 8. | --- | + | + | + | + | --- |
| 9. | + | --- | + | + | --- | --- |
| 10. | ++ | --- | + | + | --- | + |
| 11. | + | + | --- | --- | --- | --- |
| 12. | + | + | --- | --- | --- | --- |
| 13. | + | + | + | + | + | --- |
| 14. | + | + | + | + | + | --- |
| 15. | --- | + | + | + | --- | --- |
| 16. | + | + | --- | + | --- | --- |
| 17. | + | + | --- | --- | + | --- |
| 18. | ++ | + | + | + | --- | --- |
| 19. | + | --- | + | + | --- | --- |
| 20. | + | + | + | + | --- | --- |
| 21. | + | + | + | + | --- | --- |
| 22. | + | + | + | + | --- | --- |
| 23. | + | + | + | + | + | --- |
| 24. | + | ++ | + | + | + | --- |
| 25. | + | + | + | + | --- | --- |
| 26. | --- | ++ | + | + | --- | --- |
| 27. | + | + | --- | --- | --- | --- |

Tabla 2 . Lesiones encontradas en riñón de las muestras de organismos portadores. NT necrosis tubular, GNMP glomerulonefritis mesangioproliferativa, DE depósitos eosinofílicos en, LT lumen tubular, ET epitelio tubular, EBW espacio de Bowman, CI cambios en intersticio.

--- no presente

+ leve

++ moderada

Microscopia Electrónica.

El 20% de los organismos de la muestra presentó necrosis tubular moderada difusa acompañada de glomerulonefritis mesangioproliferativa leve focal. El 6% de los organismos de la muestra presentó necrosis leve focal en el intersticio renal, solo en un organismo se encontró la presencia de VNPI, detectado por M.E. El VNPI fue encontrado en células del intersticio adyacentes a zonas de lesión; no se encontró VNPI en células epiteliales de túbulos necróticos y normales (Figura 19). Los viriones se observaron distribuidos generalmente dentro del citoplasma en forma dispersa, asociados con figuras de mielina (Figura 20), algunos agregados de viriones fueron encontrados con baja frecuencia y bajas cantidades (Figura 21). Fueron evidentes las lesiones en organelos celulares como las mitocondrias, donde se observó hinchamiento, pérdida de las crestas y rompimiento de la membrana externa. También se pudieron percibir desprendimiento de polisomas y fragmentación del RER formando vesículas en el citoplasma (Figura 21).

Prueba de ELISA.

Los resultados de esta prueba para la detección del VNPI en organismos portadores fueron negativos.

| POOL | CONTROL DE ESTREPTOAVIDINA | CONTROL DE ISOTIPO | PROBLEMA |
|------|----------------------------|--------------------|-----------------|
| 6. | <i>Negativo</i> | <i>Negativo</i> | <i>Negativo</i> |
| 7. | <i>Negativo</i> | <i>Negativo</i> | <i>Negativo</i> |
| 8. | <i>Negativo</i> | <i>Negativo</i> | <i>Negativo</i> |
| 9. | <i>Negativo</i> | <i>Negativo</i> | <i>Negativo</i> |
| 10. | <i>Negativo</i> | <i>Negativo</i> | <i>Negativo</i> |

Valoración por citometría de flujo.

Las células de cada bazo de los organismos portadores, fueron mezclados para formar 6 pool, cada uno con 5 organismos, se analizaron 10,000 células por pool. Los resultados de los histogramas (Figura 22) corresponden a la intensidad de fluorescencia en la población celular seleccionada. Tomando de referencia los histogramas de los controles A, B y C, la ubicación del histograma D sobre el eje X nos indica una ausencia de células fluorescentes infectadas con el VNPI teñido por el anticuerpo.

Todas las muestras del lote de la granja "B" fueron negativas de fluorescencia específica del VNPI.



Figura 8. Fotomicrografía de sección de biopsia gástrica de un portador con invasión de células granulares eosinofílicas (CGE) en submucosa. Células calciformes (flecha). Tinción H-E. 800X.

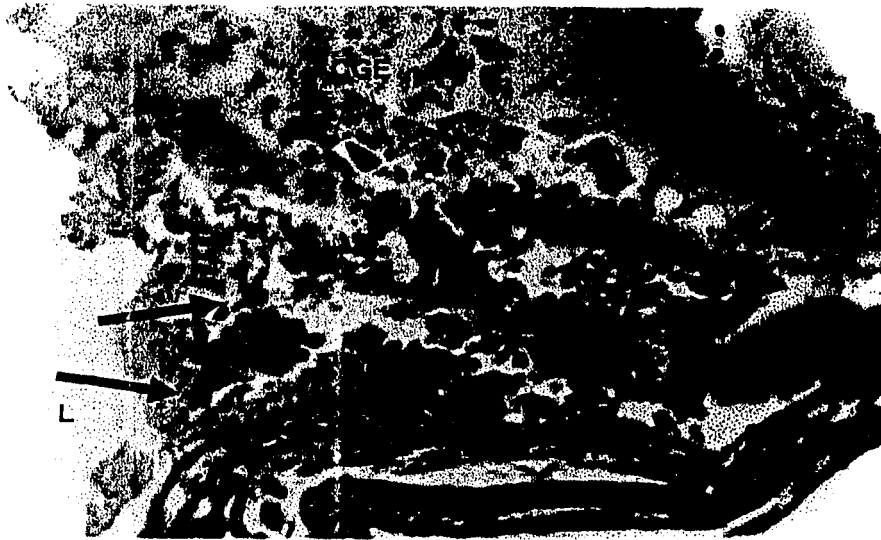


Figura 9. Fotomicrografía de sección de ciego de un portador con necrosis severa focal, la lesión penetra hasta la lamina propia donde se observa lisis en células del conectivo, presencia de células granulares eosinofílicas (CGE). Se aprecian restos de tejido de la mucosa (flechas). Lumen (L). Tinción H-E. 800X.

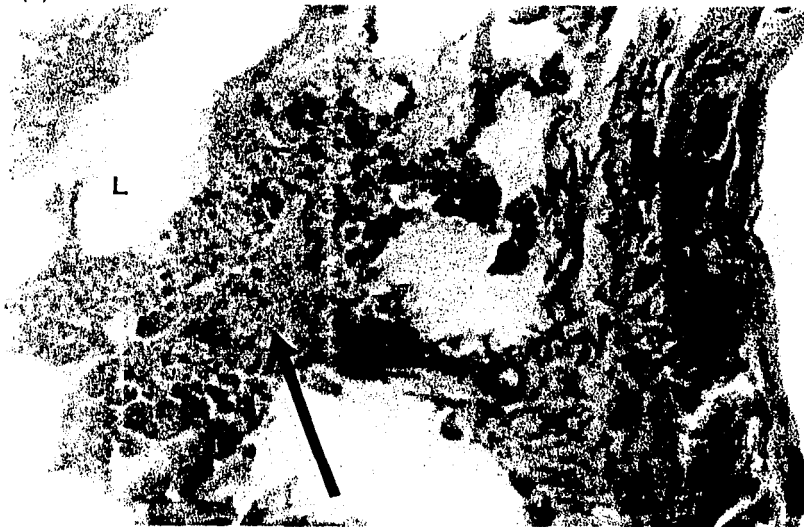


Figura 10. Fotomicrografía de una sección de ciego pilórico de un portador con una enteritis necrótica severa de la mucosa y lamina propia. Los restos de tejido de lo que fue la mucosa (flecha) se desprenden hacia el lumen (L), muscular (M). Tinción H-E. 800X.

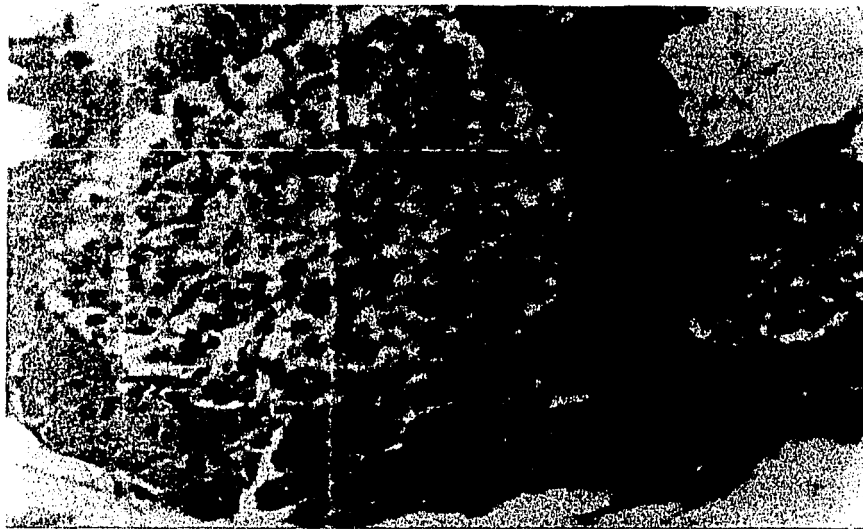


Figura 11 . Fotomicrografía de sección de tejido pancreático funcional de un portador donde se aprecian los islotes de Langerhans (L) y acinos normales. Tinción H-E. 800X.

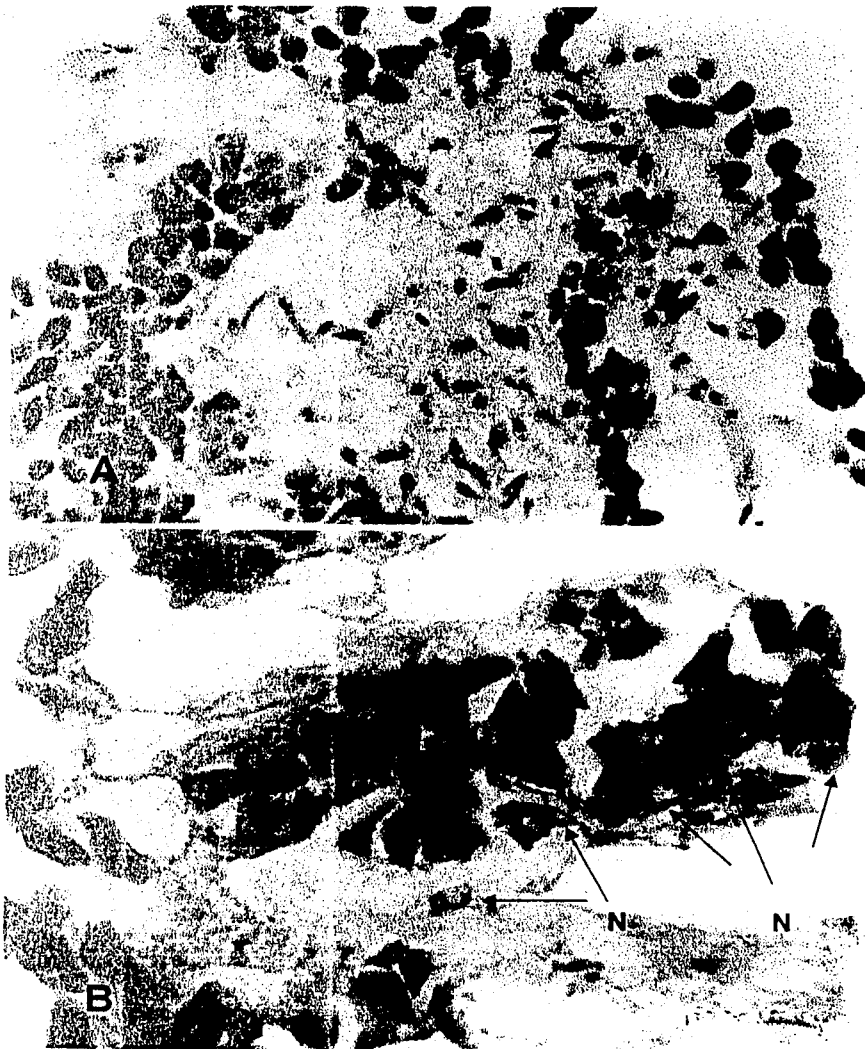


Figura 12. Fotomicrografía de una sección de tejido pancreático de un portador, A. Tejido con cambios severos en las células acinares, estas pierden su forma y tamaño además se observan con una coloración basófila acentuada. 800X. B. Detalle del tejido pancreático donde los núcleos (N) se aprecian muy claros. Tinción H-E. 1600 X.

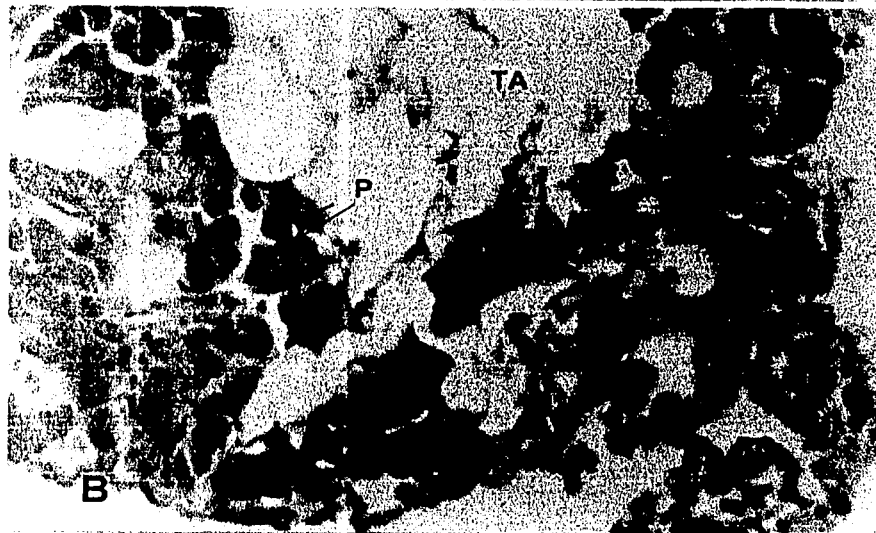


Figura 13. Fotomicrografía de una sección de páncreas con una necrosis severa difusa. En un mismo organismo se pueden observar diferentes manifestaciones de la necrosis, A. Se observan áreas de células con núcleo picnótico (P) y áreas necróticas con restos celulares (RC). B. En este caso las pocas células que se pueden apreciar muestran núcleos picnóticos (P) y hay áreas con restos celulares (RC), tejido adiposo adyacente (TA). Tinción H-E. A: 1600X, B: 800X.

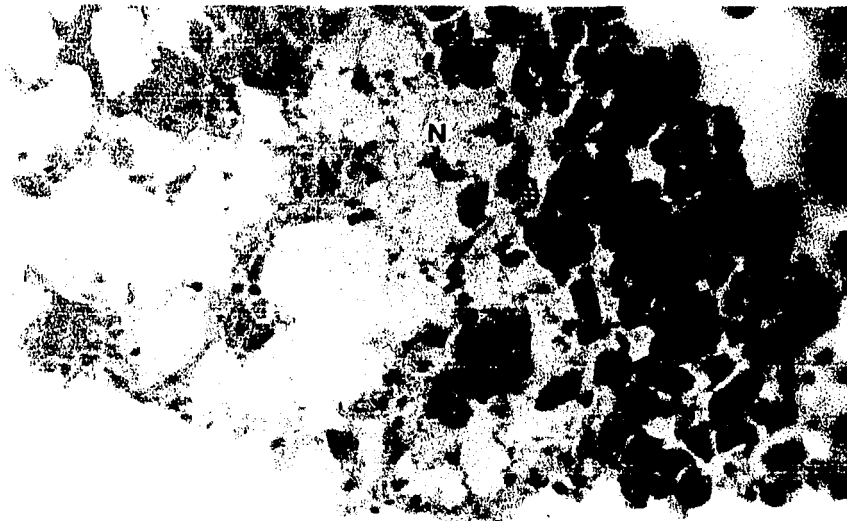


Figura 14. Fotomicrografía de una sección de tejido pancreático de un portador con necrosis severa (N), las células adyacentes presentan cambios degenerativos y picnosis y además carecen de gránulos de zimógeno. Tinción H-E. 800X



Figura 15 . Fotomicrografía de sección de riñón posterior de un portador con diferentes focos de necrosis del epitelio tubular (N), el intersticio renal se observa sin cambios patológicos aparentes. Tinción H-E.400X.

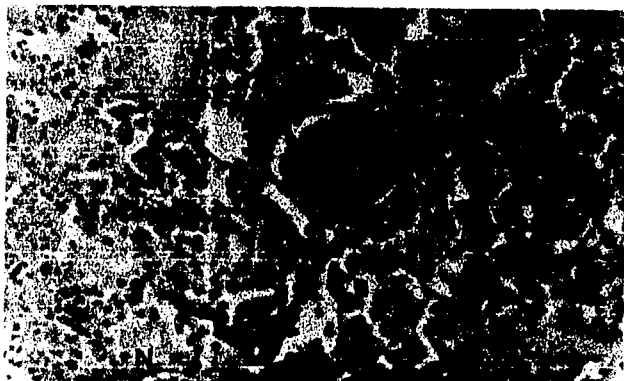


Figura 16. Fotomicrografía de sección de riñón posterior de un portador donde se aprecia túbulos necróticos (N). Hay picnosis y pérdida de la integridad citoplásmica. Algunos corpúsculos renales (CR) presentan proliferación de células mesangiales, este estado puede ir acompañado en casos severos con glomerulonefritis. Tinción H-E. 800X.



Figura 17. Fotomicrografía de una sección de riñón posterior de un portador. A. se ven túbulos con necrosis severa del epitelio (N). 400X. B. las células epiteliales presentan picnosis y citoplasma muy reducido, en su interior se concentran gránulos de pigmento. Glomérulo (G). Tinción H-E. 800X.

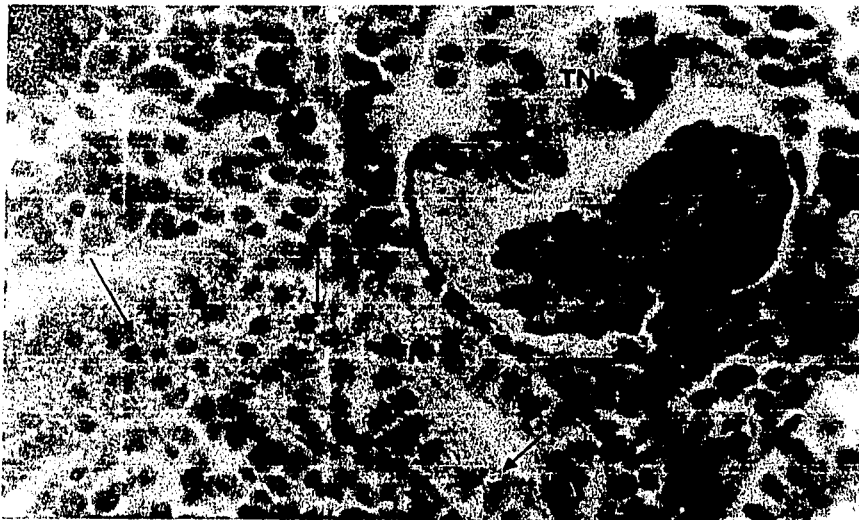


Figura 18 . Fotomicrografía de detalle de un túbulo contorneado con necrosis (TN), donde se nota la picnosis del epitelio y la concentración de pigmento en el citoplasma celular (flechas). Glomérulo (G), note la deformación de la cápsula de Bowman por la necrosis de un túbulo (TN) adyacente. Tinción H-E. 1600X.

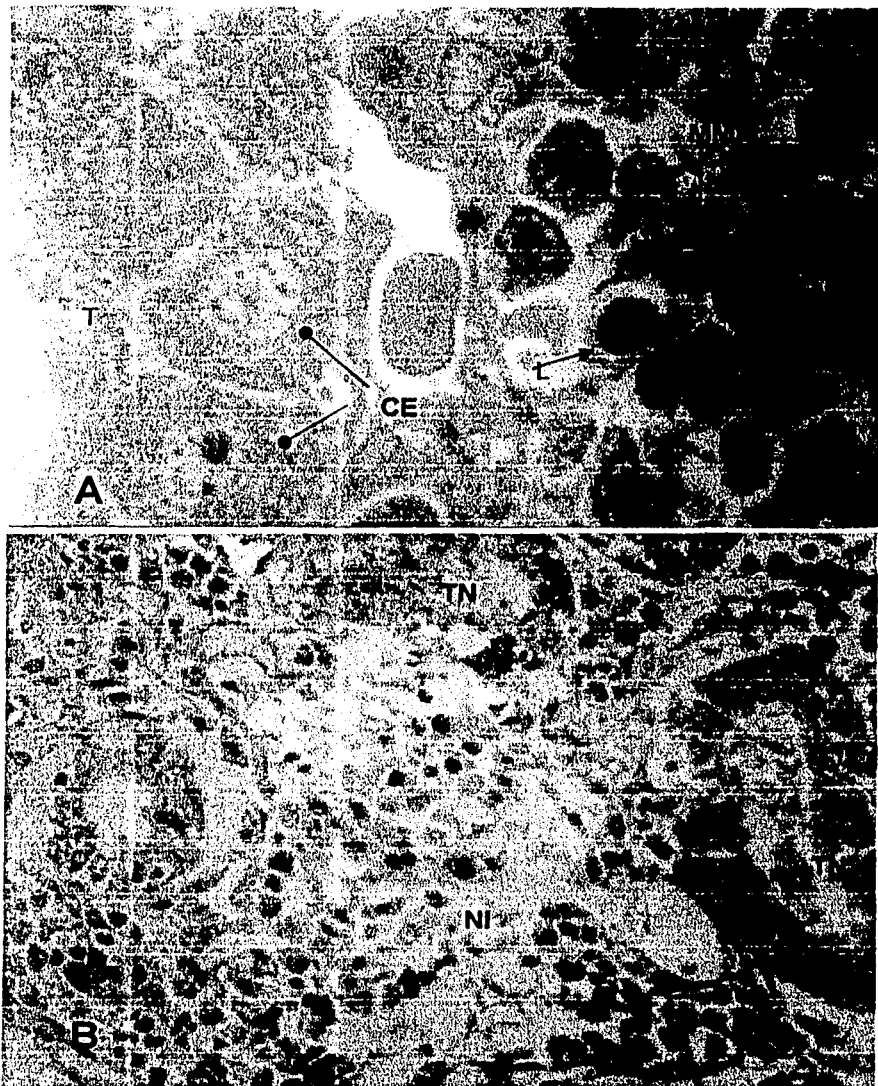


Figura 19 . Fotomicrografía de un corte semifino de riñón de organismo portador. A. Sección de tejido normal donde se muestra los leucocitos del tejido intersticial, melano macrófagos (MM) con vesículas de melanina, y linfocitos (L). En un túbulo (T) se aprecian las células epiteliales (CE) de forma característica con sus microvellosidades. Tinción azul tripano, 4000X. B. Sección de tejido con necrosis moderada del intersticio (NI) y túbulos necróticos (TN). Tinción azul tripano 800X.

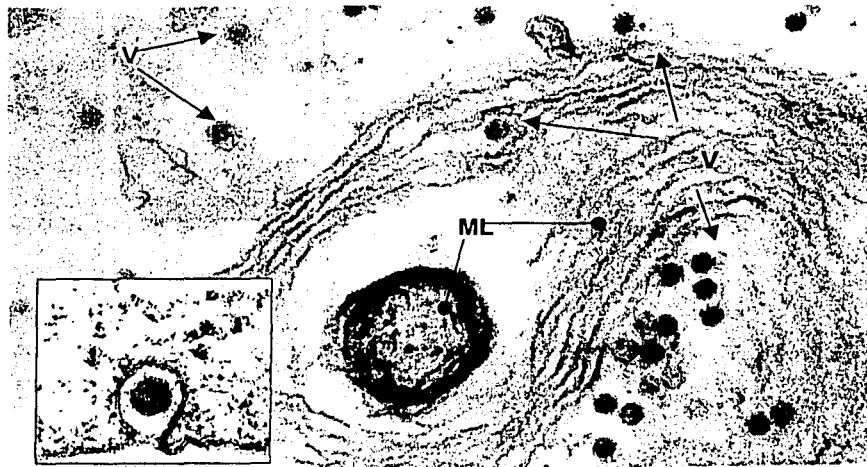


Figura 20 . Fotomicrografía de ultraestructura de un leucocito del intersticio renal de un organismo portador, en el citoplasma se aprecian partículas virales (V) de 60nm correspondientes a VNPI. Están asociadas con figuras de mielina (ML). Tinción plomo-uranilo, 30,000X.

La forma de los viriones se puede comparar con la figura del recuadro (tomado de GRANZOW, 1997) de un virion de NPI en células RTG-2.

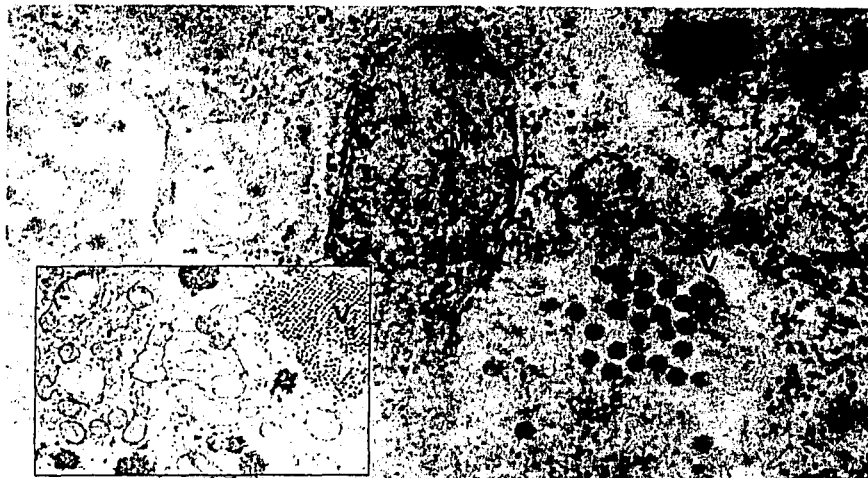


Figura 20 . Fotomicrografía de ultraestructura de un leucocito de intersticio renal de un organismo portador, donde se aprecia una mitocondria (M) y un agregado de viriones (V) de NPI en el citoplasma. Tinción plomo-uranilo, 30,000X.

Los agregados que se encontraron fueron pocos y pequeños a comparación de los agregados visto en infecciones plenas en células RTG-2 (recuadro tomado de Granzow 1997). Granzow describe lesiones en el RER, donde su fragmentación produce vesículas observables en el citoplasma acompañadas con desprendimiento de ribosomas.

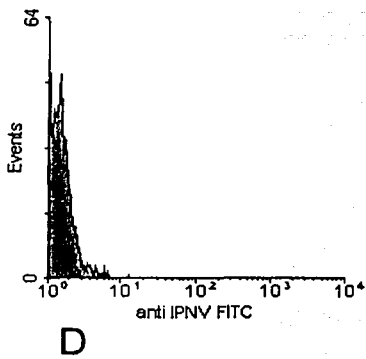
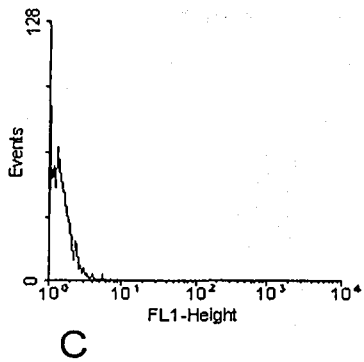
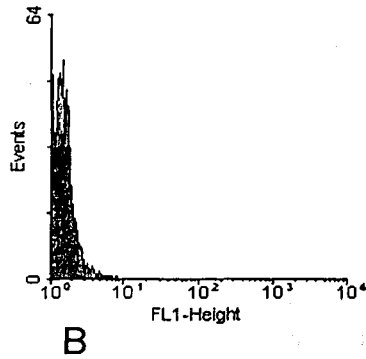
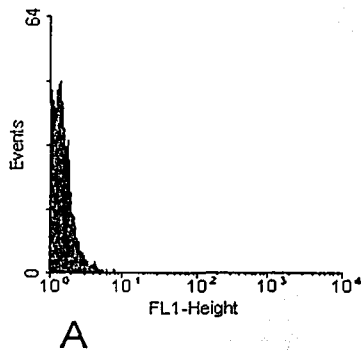
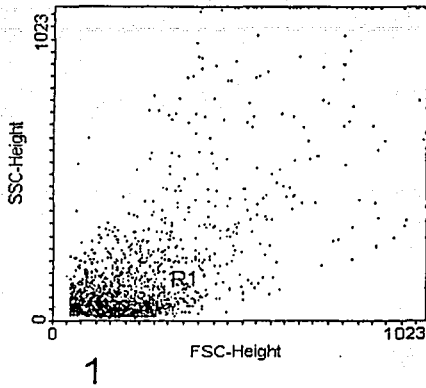


Figura 22 . Histogramas de células de bazo de un pool del lote portador. 1. Se muestra la población de células de bazo seleccionada por tamaño y granularidad, correspondiente a células mononucleares. (A) células sin teñir, (B) control de FITC, (C) control de isotipo, (D) anticuerpo anti-VNPI, observándose la ausencia de VNPI en la muestra.

SSC-Height = Granularidad
FSH-Height = Tamaño

Events = Número de células
FL1-Height = VNPI

DISCUSION

Los resultados de la valoración externa de los lotes de las granjas "A" y "B", no presentaron diferencias que nos puedan indicar la presencia de portadores, tomando en cuenta que la enfermedad en organismos portadores es subclínica, la valoración externa no puede ser considerada como una forma de orientación para diagnosticar o descartar un lote portador.

El primer antecedente o sospecha que nos puede acercar al diagnóstico de un lote portador es la presencia de mortalidades importantes y anormales que hayan ocurrido durante la etapa de cría, por eso es necesario que en la historia clínica se integre la revisión de todos los registros de mortalidades que se tengan, y si es posible las fechas, el lugar de procedencia y cualquier diagnóstico que se haya realizado anteriormente. A este respecto se consideraron 2 puntos de la historia clínica del lote de la granja "B" que nos acerca al diagnóstico del lote portador, la presencia de mortalidad durante la etapa de cría que fue del 90% (lo que también nos puede referir la virulencia del patógeno Roberts, 1986; Wolf, 1988) y el diagnóstico previo realizado por un especialista.

Los antecedentes obtenidos en la historia clínica nos pueden permitir definir la técnica de diagnóstico y el tamaño de la muestra.

Histopatología

La histopatología de intestino y páncreas no se debe considerar como una forma de diagnóstico de portadores del VNPI sino de apoyo únicamente, ya que las lesiones o cambios que puedan ser vistos pueden ser causados por otros patógenos, factores ambientales y de manejo.

Ferguson (1989) menciona que algunos cambios como la atrofia en el tracto digestivo están asociados normalmente a escasez de alimento. En el intestino se pueden encontrar enteritis catarral e incremento de células eosinofílicas degeneradas en el epitelio que pueden ser células necróticas o apoptóticas; estas lesiones también son vistas en la NPI, pero también la necrosis de las células granulares eosinofílicas de la submucosa se ve en la NHI. La inflamación gastrointestinal también puede ser ocasionada por el ambiente por toxicidad con metales pesados o toxicidad del alimento. Las lesiones como necrosis del epitelio son asociadas a protozoarios como *Hexamita salmonis* y *Espironucleus sp.* Con respecto al páncreas la necrosis de células acinares puede sugerir infecciones virales como la NPI, SHV e NHI. En la NPI la necrosis puede acompañarse de infiltrado inflamatorio (Ferguson, 1989; Roberts, 1983; Wolf, 1988), característica vista en organismos del lote portador (granja "B"). Sin embargo el diagnóstico de cualquiera de estas enfermedades se debe correlacionar con la presencia del patógeno, pero no fue así, ya que por el contrario, la Microscopia Electrónica (M.E) y tinción gramm realizadas a las muestras de ambos lotes confirmó la ausencia de dichos patógenos en ciegos pilóricos y páncreas, Descartándose así que dichas lesiones puedan deberse a agentes biológicos, por tanto se podrían relacionar a factores ambientales.

Un estudio realizado en 52 granjas del municipio de Amanalco de Becerra, Estado de México, durante el mes de marzo del 2001, a cargo de la Dirección de Sanidad Acuicola, por medio de la Universidad Nacional Autónoma de Nuevo León; con el objetivo de determinar la presencia de la NPI, mediante histopatología, arrojó evidencias de que existen lesiones y cambios histológicos en intestino (como la enteritis y necrosis focal), páncreas (necrosis focal y desorganización celular) e hígado (necrosis focal y esteatosis) que son típicas de peces de esta especie en condiciones de cultivo intensivo.

En la mayoría de estas granjas las lesiones se asocian a factores de tipo alimenticio y de estrés derivado del manejo. Aunque la persistencia de dichas condiciones a la larga propicien la infección por algún patógeno. Estas lesiones coinciden con las encontradas en este estudio tanto en los organismos no portadores (granja "A") como portadores (granja "B"). En ambos estudios la ultraestructura del tracto digestivo no establece relación alguna de las lesiones con la presencia de algún patógeno, incluyendo el VNPI.

El estado de salud de los organismos esta establecido por diversos factores como la alimentación, calidad del agua (pH e índices de amonio) y temperatura, por eso es de esperarse que en un sistema de cultivo intensivo los organismos de uno o diferentes lotes de una granja, presenten lesiones morfológicas y en ocasiones funcionales en diferentes órganos. Aunque dichas lesiones permitan el desarrollo aparentemente normal de los organismos (Kinkelin, 1991, Roberts, 1986).

Los cambios en el páncreas observados en organismos del lote no portador y portador, diagnosticados como atrofia y fibrosis semejan las lesiones observadas en un síndrome que se ha visto en el salmón del Atlántico (Ferguson, 1989) que se relaciona con bajos niveles de vitamina E, pero en realidad se conoce muy poco del origen real de dicha enfermedad. Se requeriría realizar un estudio complementario para su confirmación.

Histopatología del riñón.

Las branquias y el riñón son los órganos eje en el mantenimiento del equilibrio entre el ambiente y el medio interno del pez, cualquier cambio que ocurra en la composición fisicoquímica del agua, provocará una respuesta directa en el epitelio branquial ocasionando cambios morfofuncionales y que mediante el torrente circulatorio y los procesos de regulación hormonal pueden afectar también al riñón, evidenciándose estos en la histología.

Las alteraciones que se pueden encontrar en el riñón pueden deberse, aparte de las enfermedades ocasionadas por agentes biológicos, a adaptaciones del órgano a diferentes ambientes a los que son sometidos principalmente los organismos en cultivo. Los cambios en la temperatura, niveles de amonio, pH, presencia de metales pesados en el agua y hasta toxicidad por alimento, pueden provocar cambios observables en todos los elementos de la nefrona y en el intersticio renal. (Kinkelin, 1991; Ferguson, 1989; Weyts, 1999).

Las lesiones y cambios renales de los organismos de la granja "A" como proliferación de células mesangiales y presencia de depósitos eosinofílicos dentro de la cápsula de Bowman en el corpúsculo renal, y necrosis leve y depósitos eosinofílicos en células epiteliales de los túbulos, fueron vistas con poca frecuencia en crías a partir de 6 cm de longitud. Estas lesiones son más abundantes en organismos sanos de mayor talla (15 a 25 cm). Estas muestras de no portadores se tomaron de lotes de diferentes tallas y ubicados en diferentes estanques con diferente abastecimiento de agua dentro de la misma granja, estos organismos son cambiados durante su desarrollo, por lo menos 3 veces de diferentes abastecimientos, de manantial y río, donde los parámetros fisicoquímicos son variables entre si desde su origen. Además los niveles de O₂, amonio y pH también tienen diferentes variaciones a debido a: la ubicación del estanque o sea el lugar que ocupa en el uso del agua desde el origen del afluente hasta la salida de la granja; la densidad de carga que contenga el estanque; la cantidad y periodicidad con que se suministre el alimento, ya que un exceso de este provocará aumentos en los niveles de CO₂ y compuestos nitrogenados en el agua; y la temperatura del agua, ya que en las granjas estudiadas los abastecimientos de agua difieren hasta en 5°C. Los cambios y lesiones observados en los organismos del lote no portador son debido a la interacción de todos estos factores y no a patógenos ya que no se evidenciaron por histopatología y microscopía electrónica.

Este tipo de lesiones también fueron encontradas en las muestras de los organismos del lote portador (granja "B"), que son similares a las presentes en organismos no portadores (granja "A") de talla entre 20 y 25 cm, solo que en el 20% de la muestra del los organismos presumiblemente portadores las lesiones fueron mas difundidas y de moderadas a severas principalmente a nivel de túbulos. Solo el 2% de la muestra del lote portador presentó lesiones correspondientes a edema focal en intersticio, por M.E. se observó la presencia de partículas virales en el citoplasma de los leucocitos solamente de un organismo. La presencia del virus en estas células coincide con el reporte de Swanson (1981), durante una infección experimental quien observó una leve fluorescencia en focos del tejido intersticial renal de organismos solo en etapa tardía de la enfermedad.

Aunque se hace referencia a organismos enfermos, la infección del virus en etapa clínica de la enfermedad continua de las células acinares pancreáticas por torrente sanguíneo hacia el riñón causando las lesiones antes mencionadas. Swanson (1982) sugiere que el virus también es llevado por células fagocíticas desde el páncreas al riñón previo al estado de portador por la presencia de antígenos virales en tejido hematopoyético. ya en el estadio de portador los leucocitos presentarían partículas virales por largo tiempo, 2 años o más, con una carga viral en el tejido menor o casi constante. (Yamamoto, 1974).

Microscopía Electrónica (M.E)

La presencia de partículas virales citoplasmáticas, detectadas por M.E solo en el tejido intersticial renal y no en tejido pancreático e intestinal de las muestras del lote portador (granja "B"), se debe a que los organismos muestreados fueron portadores asintomáticos, y en el caso de la NPI el aislamiento del virus en estos organismos es mayor en tejido hematopoyético, mayoritariamente en riñón. El título viral del tejido pancreático, intestinal, y heces va disminuyendo conforme pasa el tiempo en el estadio de portador y en riñón y bazo el título puede mantenerse o intensificarse (Yamamoto, 1974). El hecho de que estos órganos riñón y bazo son hematopoyéticos sugiere que el sitio más importante de replicación en portadores son los leucocitos (Yu, 1982).

Yu (1982) reporta que en portadores se puede aislar el VNPI de sangre únicamente de leucocitos y no de eritrocitos ni plasma, debido a la posible existencia de anticuerpos neutralizantes y otros componentes antivirales que inhiben la replicación del virus en este medio. Por ende la importancia de los leucocitos para la replicación en el estadio de transición a portador y su papel en la diseminación de viriones por torrente sanguíneo a otros órganos principalmente el riñón. La ausencia de viriones en tejidos pancreático, intestinal y hepático por M.E queda explicada con este hecho.

En las imágenes de M.E obtenidas del lote portador, además de que solo se observó el virus en un organismo, este se presentó en poca cantidad y casi no se encontró en forma de agregados envueltos en membranas, Yamamoto (1974) y Granzow (1997) en una descripción morfológica del virus en cultivo y en tejido, manifiestan la formación de vesículas o cuerpos de inclusión citoplásmicos rodeados por una membrana, posiblemente derivada del retículo endoplásmico o del aparato de Golgi, llenas de viriones, aunque se pueden observar también partículas dispersas en etapas plenas de la infección. Tanto la producción de partículas virales defectivas interferentes (partículas DI) y la inducción por el sistema inmune son mecanismos por los que se produce la conversión de una infección citolítica en infección persistente (Pérez, 1993) esto regula la cantidad de viriones en las células disminuyendo en gran medida la aparición de cuerpos de inclusión. Sin embargo se apreciaron figuras de mielina propias de la degeneración de las células por el virus como también lo menciona Yamamoto (1974). La poca cantidad de VNPI en riñón y con ese arreglo dentro de la célula puede ser debido a que estos organismos son portadores de 1 año de edad con una respuesta inmune ya mas desarrollada que puede disminuir la replicación viral.

La técnica de M.E como técnica de diagnóstico para portadores puede ser muy útil, solo que requiere un periodo mayor de tiempo (48 hrs) con respecto a técnicas como el PCR o la citometría de flujo. La M.E puede ser un a técnica sensible para el diagnóstico de portadores sobrevivientes a mortalidades del 90% como se dio en este caso, pero no sería muy recomendable para casos donde la mortalidad fue mucho menor ya que determinaría cantidades de virus aún mas bajas difíciles de observar en el tejido del portador.

Citometría de Flujo (CMF)

En estudios previos realizados por Rodríguez (1991) purificando leucocitos de muestras de sangre de portadores de trucha arcoiris sospechosos y analizados por CMF, se pudieron detectar niveles bajos de fluorescencia que fueron del 30 al 40% de la población leída de un pool directamente al FACS sin pasar previamente por cultivo celular. Así mismo Rodríguez (1993) detectó en células espermáticas de portadores sospechosos de trucha arcoiris un 8 a 18% de células fluorescentes que también fueron procesadas directamente para FACS. Esto nos puede indicar dos puntos importantes: nuevamente la importancia de los leucocitos para la

replicación del VNPI en portadores y la alta sensibilidad de la CMF para la detección del VNPI en portadores asintomáticos con bajas cantidades de partículas virales, aún realizando diluciones de la muestra en pool para su estudio.

Contradictoriamente los resultados obtenidos en el presente estudio en los organismos portadores, indicarían una baja sensibilidad de la CMF para detección de VNPI en leucocitos de bazo. Sin embargo es necesario considerar que se evidenció al VNPI sólo en un organismo y la probabilidad de que queden células infectadas en cada pool es aún más baja. Además de la poca frecuencia del VNPI en la muestra de portadores, la poca cantidad de viriones vistos en el tejido renal, disminuye más la posibilidad de detección del VNPI.

Una posible explicación a la baja presencia del VNPI en un lote, reportada por Pérez (1993), son los factores para el establecimiento del estadio de portador, que van desde la producción de partículas virales interferentes defectivas (partículas DI); la respuesta inmune de los organismos y el ambiente en el que estas se desarrollen. La interacción de estos factores determinará la presencia de portadores, esto es, no todos los organismos sobrevivientes de un brote serán portadores (Wolf, 1988).

Evidentemente el bazo es un órgano importante en el diagnóstico de estos organismos, y la técnica de CMF es tan sensible para detectar un 30% de células infectadas a las primeras 2 hrs. de inoculación de leucocitos aislados del organismo e inoculados a células CHSE-214 (co-cultivo). (Rodríguez, 1998). En el presente estudio no se realizó una amplificación del virus y los leucocitos aislados del bazo fueron leídos directamente al citómetro, teniendo así menor probabilidad de detección con respecto al co-cultivo. La CMF es una técnica muy sensible para la detección de portadores utilizando tejido renal, bazo sangre y espermatozoides aumentando la cantidad de virus por cultivo o co-cultivo e incubando poco tiempo.

El ensayo de ELISA, a pesar de ser tan sensible como la C.M.F., de tejido renal previamente fijado con formol al 10% puede presentar problemas de sensibilidad debido a las desventajas que se tienen con tejidos fijados con formol al 10%, ya que la molécula de formalina, fijador preferido en histopatología, propicia enlaces químicos cruzados en los antígenos influenciándolos significativamente lo cual hace una reacción menos eficiente (Shi, 1997). Sin embargo la CMF puede ser una técnica que una vez bien adaptada y complementada con co-cultivo, puede tener un menor costo, mejor sensibilidad y hacerse en menos de 4 hrs.

Al parecer la técnica más prometedora con respecto a mayor sensibilidad y menor porcentaje de falsos negativos es el PCR (Rodríguez, 1999). Este ensayo puede diagnosticar el virus en un espectro mayor de muestras con alta sensibilidad y especificidad con respecto a otros métodos convencionales como la neutralización o como los ya antes mencionados. Además se pueden diagnosticar infecciones múltiples de hasta 3 virus con la misma muestra en 3 hrs. (Williams, 1999).

Podríamos sugerir estas dos técnicas, PCR y citometría de flujo, para el diagnóstico de portadores en cualquiera de estos 2 casos: la detección de portadores que implique el sacrificio de los organismos, aplicable para la certificación de lotes de cualquier talla tomando órganos como riñón y bazo, o la detección de reproductores portadores tomando sangre, semen y/o huevos sin que esta implique el sacrificio, que se daría en el caso de certificación de reproductores tomando como muestra semen o huevo y/o sangre (Tabla 3). La evaluación por cualesquiera de estas 2 últimas técnicas para el diagnóstico permitirá finalmente una oportuna toma de decisiones.

| Método diagnóstico | Tiempo aproximado de realización | Aplicación |
|--------------------|----------------------------------|------------------|
| ELISA* | 2 hrs | Brote |
| IF* | 5 hrs | Brote |
| ME* | 24-48hrs | Brote |
| CMF* | 2 hrs | Brote/portadores |
| CMF/co-cultivo | 4 hrs | Brote/portadores |
| RT-PCR | 3 hrs | Brote/portadores |

Tabla 3. Métodos para el diagnóstico del VNPI sugeridos según Rodríguez (1993), Pérez (1993), OIE (1995), Rodríguez (1999) y Kinkelin (1991).

(*) Método utilizado en este estudio.

Implicaciones de la presencia de la NPI en México.

El aislar el VNPI de poblaciones asintomáticas de peces adultos es más difícil que en situaciones de enfermedad, ya que es necesario sacrificar un mayor número de peces para obtener un mayor porcentaje de probabilidad que un pez infectado sea incluido en las muestras de peces (Rodríguez, 1998). Además para el estudio de portadores se requiere el uso de técnicas de mayor sensibilidad que en el diagnóstico de brotes plenos, donde la histopatología en conjunto con el análisis inmunológico o de microscopía electrónica puede darnos un resultado acertado con alto grado de confiabilidad. Evidentemente la técnica de detección en cualquiera de estas dos situaciones, brote o portador, es solo una parte integrante de lo que debe considerarse en un programa de sanidad, que debe cubrir a nivel nacional las necesidades requeridas en caso de la detección de enfermedades importantes como lo es la NPI. Dentro de esta visión global se deben de contemplar diferentes aspectos que no solo implican a la granja involucrada en cuestión, sino a todo un sector productivo, es decir aspectos económicos, tanto de explotación como de mercado, aspectos sociales y normativos.

Implicaciones legislativas del primer diagnóstico de NPI en México.

La primera detección de un brote de NPI en México, fue un caso reportado por el M. En C. Cesar Ortega Santana del Centro de investigación en salud animal, Universidad Nacional Autónoma del Estado de México. institución perteneciente a la red nacional de diagnóstico del Programa Nacional de Sanidad Acuicola. Este diagnóstico determinó la necesidad de estructurar un plan de contingencia para la prevención y control de esta enfermedad para impedir la diseminación a otras granjas cuencas regiones o estados del país, dicho plan fue la antesala para la formación de una norma emergente que complementara las normas NOM-010-PESC-1993 sobre los requisitos sanitarios para la importación de organismos acuáticos vivos en cualesquiera de sus fases del desarrollo, destinados a la acuicultura u ornato; y la NOM-011-PESC-1994 sobre la regulación de la aplicación de cuarentenas, a efecto de prevenir la introducción y dispersión de enfermedades certificables y notificables. Esta norma emergente ya no contemplo solo a la NPI sino cualquier enfermedad certificable de la producción truiticola.

La norma emergente fue discutida en una serie de plenarios donde el gobierno federal a través de la dirección de acuicultura y la dirección de sanidad acuicola convoco a representantes del sector productivo e instituciones de investigación como la FES Iztacala, de la Universidad Nacional Autónoma de México y CIESA de la UAEM. En una consulta pública se abordaron puntos como: el aumento de la cuarentena a 60 días; el involucrar al sector de pesca deportiva; los requisitos para la importación de productos y subproductos refrigerados, la disposición de los lotes infectados, el cual tuvo más consideración junto con la capacidad diagnóstica instalada por parte de las instituciones de investigación. Sin embargo la publicación de la norma hasta ahora no se ha realizado ya que aún no han quedado claramente contempladas las implicaciones económicas que trae consigo la presencia del VNPI en México.

Implicaciones económicas de la presencia de la NPI en México.

Los estragos económicos propiciados por virus de este tipo, son importantes a considerar en la implementación de medidas sanitarias en zonas infectadas y de alto riesgo epidemiológico. La medida recomendada por la OIE para un lote o granja detectada como portador de VNPI, es el exterminio, seguida de una desinfección de las instalaciones para el posterior reemplazo de los lotes. Es evidente que el costo de dicha medida recae directamente en el productor lo cual es una gran desventaja, sobretodo tratándose de granjas sociales o ejidales. La implementación de medidas de este tipo debe estar respaldada por un paquete económico emergente para los productores de bajo poder adquisitivo que lleguen a ser afectados por un brote, además que en conjunto con el gobierno puedan sustentar para evitar la pérdida de instalaciones que a mediano o corto plazo pueden mermar al sector en general.

Las medidas sanitarias deberán ser más analizadas, pues en la práctica los productores que llegan a perder un porcentaje importante de un lote por mortalidades de NPI, no informan de manera oportuna o simplemente no se informa y se llevan los sobrevivientes a engorda para sacarlos posteriormente al mercado. De esta manera el productor rescata por lo menos una mínima parte del costo del lote en vez de perderlo todo aunque la norma lo obligue a lo contrario.

El problema es que no existe en la práctica en nuestro país una política sanitaria que se involucre en el monitoreo constante para localizar cualquier mortalidad presuntiva, y sin un sistema de diagnóstico preciso y rápido, el problema del NPI y otras viremias, que aun no se evidencian pero que pueden ya existir, puede ser un freno importante para el desarrollo del sector. Así también se debe contar con un sistema de diagnóstico rápido y eficiente llevado por instituciones de investigación que realicen un monitoreo periódico de la zona para detectar nuevos brotes y den capacitación para fomentar una cultura de prevención en el ámbito sanitario y de manejo. El problema de una falta de capacidad diagnóstica para la declaración y certificación de zonas libres y la falta de capacitación e información por parte de las autoridades, han traído ya como consecuencia, problemas en el mercado en algunos municipios del estado de México y en particular de Amanalco. La evidente presencia del VNPI en la zona ha provocado una baja en los precios del kilogramo de trucha a pie de granja lo cual repercute directamente en el mercado de la zona.

Sin embargo el costo de tener un sistema de este tipo para el respaldo económico en caso de contingencia y de asignación de recursos a instituciones de investigación es un costo que el gobierno en principio no ha querido solventar. El sector productivo de la trucha tendrá que adaptarse y encontrar las vías adecuadas para poder solventar de forma autosuficiente un servicio de diagnóstico y certificación por parte de los institutos designados por el gobierno federal. Esto no quita responsabilidades a este último para tener en operación, con recursos del estado, un sistema de monitoreo y capacitación para todas las productores del país, asimismo garantizar la importación de organismos en cualquiera de sus etapas del desarrollo libre de patógenos, exigiendo a las empresas importadoras la certificación con técnicas de diagnóstico sensibles y confiables respaldadas por profesionales del país.

Una perspectiva a futuro.

En realidad el VNPI en México esta poco estudiado, tanto en brotes plenos como en el estadio de portador. El hecho es que existen actualmente mortalidades importantes en diferentes estados del país, posiblemente debidas al VNPI que no han sido estudiadas y que con los movimientos de estos organismos dentro del mercado de crías, continuarán la diseminación de esta enfermedad. No se sabe en verdad desde cuando esta el VNPI en México, pero debido al primer diagnóstico se puede entender que esta enfermedad pudo entrar, por una parte, por lotes importados de huevo aún con certificado de origen o sin él. Esto nos lleva a la implementación de un sistema de diagnóstico de portadores mucho mas eficiente y con mayor capacidad instalada. El tener una fuerza en el diagnóstico y en la capacitación en materia de prevención y manejo al sector en general, nos permitirá, sino erradicar el VNPI en México, desarrollar la truiticultura con el virus controlado.

Es importante invertir en el estudio y detección del estadio de portador en México porque en esos organismos persiste el virus y por medio de estos se puede diseminar la infección o mantener la enfermedad en la granja debido a que pasa desapercibido.

Evidentemente los recursos destinados por el gobierno federal para el desarrollo de la acuicultura no serán aumentados de forma inmediata, y más considerando que solo representa el 1% del producto interno bruto del país, sin embargo es su responsabilidad la implementación adecuada y oportuna de normas preventivas, de control y diagnóstico; así como la información y capacitación hacia el sector sobre la sanidad y el manejo adecuado de los cultivos de trucha. Esto a su vez propiciará el incremento de la producción y de mayor capital para el sostén de esta.

El ejemplo claro de la ruta a seguir para la truiticultura, es el caso de la industria camaronesa. Con el advenimiento a nuestro país de enfermedades virales como el taura (TS), mancha blanca (WSB), cabeza amarilla (YH) y la necrosis hematopoyética e hipodérmica infecciosa (IHNN), tanto las autoridades como el sector productivo sufrieron una serie de transformaciones no solo en el ámbito técnico-productivo, sino en la normatividad, control y prevención sanitarias, además del desarrollo en nuestro país de laboratorios y técnicas más eficientes para el diagnóstico de epizootias de etiología viral.

CONCLUSIONES

- Las lesiones encontradas en páncreas e intestino en la histopatología, deben ser interpretadas con cuidado y respaldadas con un estudio complementario para la confirmación de su etiología. Los cambios morfológicos y degenerativos de las células, así como la necrosis fueron aparentemente debidas a factores ambientales propiciados por el manejo y que no se encontró agente etiológico.
- Las truchas en condiciones de cultivo presentan lesiones frecuentes en el páncreas, intestino y riñón propiciadas por el ambiente en el que se desarrollan.
- La histopatología es únicamente una herramienta de apoyo para el diagnóstico de portadores del VNPI. No puede ser utilizada como herramienta única para el diagnóstico de portadores asintomáticos.
- Las partículas virales encontradas en el tejido renal corresponden al virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI).
- La Microscopía Electrónica (M.E) demostró ser una técnica sensible para el diagnóstico de portadores de 10 meses de edad sobrevivientes a mortalidades del 90%.
- Los resultados negativos del lote portador obtenidos por CMF se debieron a la baja cantidad y frecuencia de antígenos virales incorporados en cada agregado (pool), lo cual disminuyó la posibilidad de detección por esta técnica.
- La detección de bajos títulos virales por medio de la CMF en células de bazo y riñón es posible amplificando el virus por cultivo celular o co-cultivo, previamente a la lectura con CMF, en un tiempo de 2 a 6 horas.
- El estudio del estadio de portador requiere de mayor atención ya que de este dependerá la diseminación de la NPI en México.
- El presente estudio reveló que el diagnóstico de portadores de VNPI, requiere técnicas sensibles como la M.E y el uso de anticuerpos específicos ya que los organismos en este estadio son asintomáticos, por lo tanto se debe hacer un estudio con estas técnicas y/o el PCR para localizar el VNPI en la región del Estado de México.
- Se debe aumentar la capacidad instalada para el diagnóstico de esta y otras enfermedades notificables de la trucha arcoiris y aumentar el número de instituciones que realicen dichos estudios con la finalidad de poder declarar zonas libres ya que existen mortalidades sospechosas que no han sido estudiadas por técnicas adecuadas.
- Se requiere de manera urgente una capacitación al sector productivo acerca del manejo de lotes enfermos o portadores de la NPI en México, así como la instrucción de las medidas de higiene y prevención a seguir para la posible presencia de otros patógenos incluyendo los virus de SHV y NHI.

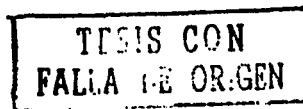
TEJIS CON
FALLA DE ORIGEN

BIBLIOGRAFIA

1. AGIUS C., Mangunwiryo H., Jonson R. H., Smail D. A., 1982, "A more sensitive technique for isolating infectious pancreatic necrosis virus from asymptomatic carrier rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson", *Journal of Fish Diseases*, 5:285-292.
2. ALONSO M., Rodríguez S., Perez P. S.I., 1999, "Nested PCR improves detection of infectious hematopoietic necrosis virus in cells coinfecting with infectious pancreatic necrosis virus", *Journal of Virological Methods*. 81:1-9.
3. AURO, D' O. A., 1996, "Importancia de los peces de ornato como reservorios de virus patógenos para peces de consumo", *Veterinaria de México*, 27(2): 159-163.
4. BARNABÉ G., 1991, "Acuicultura", ediciones Omega S.A., España.
5. BOOTLAND L. M., Dobos P. and Stevenson R. M. W., 1986, "Experimental induction of the carrier state in yearling brook trout: a model challenge protocol for IPNV immunization", *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 12:365-372.
6. CASWELL-RENO B y P., Reno P. W. And Nicholson B. L., 1986, "Monoclonal antibodies to infectious pancreatic necrosis virus: analysis of viral epitopes and comparison of different isolates", *Journal of General Virology*. 67:2193-2205.
7. CAMACHO B. E., Moreno R. M. A., Rodríguez G. M., Luna R. C. y Vázquez H. M., 2000, "Gula para el cultivo de trucha"; ed. Dirección General de Acuicultura, Secretaría de Pesca, SEMARNAP, México.
8. CONSTANTINO, C. F., 1997. " Principales enfermedades de la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*)", Memorias curso teórico práctico sobre el cultivo de trucha arcoiris, Amanalco de becerra, Acualine Purina, México.
9. CORMACK H. D., 1984, " Introduction to histology", Library of Congress Cataloging in Publication Data, U.S.A.
10. CRUZ R. A. J., 1998, " Las enfermedades certificables de camarón y su importancia en sanidad acuícola", *Boletín del Programa nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico*, SEMARNAP, México, 1(2):3-4.
11. DIXON and Hill, 1983, " Detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ", *Journal of General Virology*. 64:321-330.
12. DONALD P., Nicholson B. L. and Dunn J., 1973, "Immunofluorescent study of the replication of infectious necrosis virus in trout and Atlantic salmon cell cultures", *Infection and Immunity*, 8(2):249-254.
13. FAO., 2000, "El estado mundial de la pesca y la acuicultura", Grupo de Edición, Dirección de Información de la FAO, Italia.
14. FERGUSON, H. N., 1989, "Gastrointestinal tract, pancreas and swimbladder", *Systemic pathology of fish a text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleost*, Ferguson H.N. (ed), Iowa state university press, Canada.
15. GRANZOW H., Welland F., Fichtner D. and Enzmann P. J., 1997, "Studies of the ultrastructure and morphogenesis of fish pathogenic viruses grown in cell culture", *Journal of Fish Diseases*, 20:1-10.

16. KUDO, S., Kurosawa, P., Kunimeni, I., Nobusawa, K. And Kobayashi, S., 1973, " Electron microscopic observations of the pancreas and liver in the fingerling rainbow trout with symptoms of IPN", Japanese Journal of Ichthyology. 20:163-177.
17. KINKELIN, P., 1991, " Tratado de las Enfermedades de los Peces", ed. ACRIBA S.A., España.
18. KNOTT R. M. and Munro A. L. S., 1986, "The persistence of infectious pancreatic necrosis virus in Atlantic salmon", Veterinary Immunology and Immunopathology. 12:359-364.
19. KUEN-CHING Tu, Spendlove R. X., Goede W. R., 1974, "Immunofluorescent cell assay of infectious pancreatic necrosis virus", Applied Microbiology 27(3):593-599.
20. LIGHTNER, D., and Post, G., 1969, "Morphological characteristics of infectious pancreatic necrosis virus in trout pancreatic tissue", Journal fish Research Board Canadian. 26(4):2247-2250.
21. LEONG, J. C. and Fryer, 1993, "Viral vaccines for aquaculture", Annual Rev. of Fish Diseases. p.p. 225-240.
22. McALLISTER P. E. and Schill W. B., 1986, "Immunoblot assay : A rapid and sensitive method for identification of salmonid fish viruses", Journal of Wildlife Diseases, 22(4): 468-474.
23. NICHOLSON, B. L. and Dexter, R., 1975, "Possible interference in the isolation of IPN virus from carrier Fish", Journal Fish Research Board. Canadian. 32: 1437-1439.
24. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 1995, "Diagnostic manual for aquatic animal diseases", OIE, Francia.
25. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 2001, "Diagnostic manual for aquatic animal diseases", OIE, Francia.
26. ORTEGA, S.C., 1988, " Algunos factores que influyen en la presentación de enfermedades en peces de cultivo", Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuicola de la Red de Diagnóstico, UAM-X,1(2):4-7. México.
27. PANIAGUA R. y Nistal M., 1983, "Introducción a la histología animal comparada. Atlas-libro de la estructura microscópica de los animales", ed. Labor S.A., Barcelona, España.
28. PEREZ, H. J. A., 1988, "Situación actual del cultivo de trucha en México y factores que afectan la producción", Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuicola de la Red de Diagnóstico, UAM-X, 1(2):2-4. México.
29. PEREZ S. I., Rodríguez S. y Villas P., 1993, "Estudio del estado de portador de virus IPN in vivo e in vitro", Actas IV Congreso Nac. Acuicult. :669-667. España.
30. PEREZ, S. I., 1997, "Major viral diseases affecting fish aquaculture in Spain", Microbiología SEM 13:149-160.
31. PORTILLA, D. B. J., 1997, "Producción intensiva de trucha arcoiris en Raceways", memorias curso teórico práctico sobre el cultivo de trucha arcoiris, Amanalco de Becerra, estado de México, Aqualine Purina, México.
32. POST, G., 1987, " Textbook of fish health", T.F.H. Publications, Canada.
33. REDDINGTON J. J., 2000, "Application of preventive to herd health management in aquaculture", Diagxotics Inc. publications. U.S.A

34. REDDINGTON J. J., 2000, "Potential applications of agricultural diagnostic techniques to aquaculture health management", Diagxotics Inc. publications. U.S.A
35. RENO P. W., Darley S. And Savan M., 1978, "Infectious pancreatic necrosis: experimental induction of a carrier state in trout", Journal Fish Reserche Board Canadian 35: 1451-1456.
36. ROBERTS, R. J., 1986, "Handbook of trout and salmon diseases", 2ª edittion, Fishing news Books Ltd, England.
37. RODRIGUEZ, G.M., 1988, "Enfermedades Certificables de peces y su importancia en la sanidad acuícola", Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuicola de la Red de Diagnóstico, UAM-X, 1(2):1-7. México.
38. RODRIGUEZ S., Villas P. y Pérez S. I.,1993, "Aplicación de la citometría de flujo al estudio de virus de salmónidos", Actas IV Congreso Nac. Acuicult. :675-680. España.
39. RODRIGUEZ S-J., S., Vilas M. M del P., Palacios A. M., Pérez P. S. I., 1991, "Detection of infectious pancreatic necrosis in a carrier population of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Richardson), by flow cytometry ", Journal of Fish Diseases, 14:545-553.
40. RODRIGUEZ S-J., S., Vilas M. M del P., Pérez P. S. I., 1994, "Prevalence of infectious pancreatic necrosis virus on salmonid fish farms in Spain", Journal of Aquatic Animal Health, 6:138-143.
41. RODRIGUEZ S-J., S., Gutierrez C., Vilas M. M del P., Pérez P. S. I., 1995, "In vitro Quantitative Kinetic study of infectious pancreatic necrosis viral antigen by flow cytometry", Fish Pathology, 30(1):1-5.
42. RODRIGUEZ S-J., S., Pérez P. S. I., 1999, "Nested PCR Improves detection of infectious hematopoietic necrosis virus in cells coinfected with infectious pancreatic necrosis virus", Journal of Virological Methods, 81:1-9.
43. SANO, T., 1971, "Studies on viral diseases of Japanese fishes-I. Infectious pancreatic necrosis of rainbow trout: first isolation from epizooties in Japan", Bulletin of Japanese. Society SCI. Fish. 37:495-498.
44. SECRETARIA DE PESCA, 1994, "Norma oficial mexicana NOM-011-PESC-1993", Diario Oficial de la Federación, Gobierno de la República, México.
45. SECRETARIA DE PESCA, 1994, "Norma oficial mexicana NOM-010-PESC-1993", Diario Oficial de la Federación, Gobierno de la República, México.
46. SECRETARIA DE PESCA, 1999, "anuario estadístico de pesca 1999", Subsecretaría de Pesca, SAGARPA, México.
47. SHEPHERD J. and Bromage N., 1998, " Intensive fish farming", Oxford Blackwell Scientific Publications, England.
48. SHI R-S., Cote R. J. and Taylor C. R., 1997, "Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future", Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 45:327-344.
49. SWANSON and Gillespie, 1982, "Isolation of infectious pancreatic necrosis virus from the blood and blood components of experimental infected trout", Canadian Journal Fish Aquat. SCI. 34: 225-228.
50. SWANSON and Gillespie, 1981, "An indirect fluorescent antibody test for the rapid detection of infectious pancreatic necrosis virus in tissues", Journal of Fish diseases. 4:309-315.



51. SWANSON, R. N. And Gillespie, J. H., 1979, "Pathogenesis of infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo solar*)", Journal of Fish Research Board Canadian, 36: 587-591.
52. SWANSON, R. N., Carlisle J. C. And Gillespie, J. H., 1982, "Pathogenesis of infectious pancreatic necrosis virus infection in brook trout *Salvelinus fontinalis* (Mitchill), following intraperitoneal injection", Journal of Fish Diseases. 5: 449-460.
53. VESTERGARD J. P. E., 1974, "Indirect fluorescent antibody techniques for demonstration of trout viruses and corresponding antibody", Acta Vet. Scand. 15:198-205.
54. WESTLUND L., 1999, "Consumo histórico aparente y demanda futura de pescado y productos pesqueros: cálculos exploratorios; declaración y plan de acción de Kyoto sobre la contribución sostenible de la pesca a la seguridad alimentaria ", Resultados de la Conferencia de Kyoto y Documentos Presentados, Conferencia Internacional Sobre la Contribución Sostenible de la Pesca a la Seguridad Alimentaria, Departamento de Pesca, FAO, Italia.
55. WEYTS F. A. A., Cohen N., Flik G. and Verburg-van Kemenade B. M. L., 1999, "Interactions between the immune system and the hypothalamo-pituitary-interrenal axis in fish", Fish and Shellfish immunology, 9:1-20.
56. WILLIAMS K., Blake S., Sweeney A., Singer J. T. and Nicholson B. L., 1999, "Multiplex reverse transcriptase PCR assay for simultaneous detection of three fish viruses", Journal of Clinical Microbiology, 37(12):4139-4141.
57. WOLF, K., 1988, "Fish Viruses and fish viral diseases", Cornell University Press, U.S.A.
58. WOLF, K. C. F., Siniesko, C. F., Dunbar, C. E. And Pyle, F., 1960, " virus nature of infectious pancreatic necrosis in trout", Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 104:105-108
59. YAMAMOTO, T., 1974, " Infectious pancreatic necrosis virus occurrence at a hatchery in Alberta", Journal of Fish Research Board Canadian. 31:397-402.
60. YU K. K-Y. and Macdonald R. D., 1982, "Replication of infectious pancreatic virus in trout leukocytes and detection of the carrier state", Journal of Fish Diseases, 5:401-410.

APENDICE

TINCION GRAM:

Desparafinar los cortes con 2 cambios de xilol de 15 min. cada uno. Incluir el control (tejido o frotis de infección por bacteria). Aplicar solución 1:1 cristal violeta/carbonato de calcio por 2 min. Lavar con agua corriente y aplicar lugol de Gram. por 2 min.

Se decoloran los cortes con solución v/v eter/alcohol acetona por 2 a 3 min, lavar con agua corriente y aplicar safranina por 15 min. o fucsina básica por 5 min. Lavar con agua corriente y dejar secar a temperatura ambiente.

Diferenciar con solución acetona-ácido pícrico hasta lograr coloración rosa amarillento, lavar con acetona, paso rápido y sumergir en solución xilol-acetona, paso rápido. Aclarar con xilol por 15min, hacer el montaje con resina y observar al microscopio.

TINCION HEMATOXILINA y EOSINA:

Los cortes se pasaron en el siguiente tren de tinción; desparafinar con 2 cambios de xilol de 15 minutos cada uno. Hidratar con cambios graduales de alcohol de absoluto a alcohol al 70% (cambios de 3 min. cada uno).

Sumergir los cortes en agua destilada durante 10 min. y teñir con Hematoxilina por 7 min. hacer un lavado rápido con agua destilada, eliminar el exceso de colorante con alcohol ácido, parar la reacción con un paso rápido en agua destilada, virar el colorante en agua amoniacal y lavar en agua destilada (pasos rápidos).

Teñir con Eosina durante 3 minutos; deshidratar con cambios graduales de 96% a absoluto (cambios de 3 minutos cada uno). Aclarar con 2 cambios de Xilol de 15 minutos cada uno y montar con resina. Se observa al microscopio óptico, se evalúa la histología de cada órgano y se toman fotos de los cambios importantes

SOLUCION BOUIN

Mezclar:

700 ml de ácido pícrico solución acuosa saturada
250ml de formol 37-40%
50ml de ácido acético glacial

SOLUCION SALINA ISOTÓNICA NaCl 0.9%

900mg de NaCl
Aforar a 100ml con agua bidestilada libre de prógenos

FORMOL AMORTIGUADO

96ml de solución amortiguadora de fosfatos PBS pH 7.2
4 ml de formol 37-40%