



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL

“GENERACIÓN DE UNA PRUEBA PARA DETECTAR ANTICUERPOS CONTRA
EL VIRUS DE LA NECROSIS PANCREÁTICA INFECCIOSA EN TRUCHAS
ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*)”

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:
EPHRAIM VERDE ROJO

TUTORA PRINCIPAL. Dra. EDITH ROJAS ANAYA – INIFAP – PMDCPSA

COMITÉ TUTORAL: Dra. ELIZABETH LOZA RUBIO – INIFAP – PMDCPSA
Dr. JOSÉ JUAN MARTÍNEZ MAYA – FMVZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MEXICO.

JUNIO 2018



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.

AGRADECIMIENTOS

Mi eterna gratitud para las instituciones que hicieron posible la realización de este trabajo de investigación, gracias por su labor y las herramientas que nos permiten formular proyectos en beneficio de nuestro país.

- **Universidad Nacional Autónoma de México**
- **Facultad de Medicina veterinaria y Zootecnia**
- **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**
- **Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias**

Agradezco infinitamente a los tres doctores que dirigieron este proyecto con sumo compromiso y que sin su guía hubiera sido complicado concluir.

- **Dra. Edith Rojas Anaya**
- **Dra. Elizabeth Loza Rubio**
- **Dr. José Juan Martínez Maya**

Por último, pero no por eso menos importante agradezco a todas y cada una de las personas que han sido y son parte de mi vida: familiares, amigos, profesores, compañeros o simples conocidos no quiero olvidar a nadie por ello no coloco nombres ya que sin importar lo efímero o perenne que es su presencia en mi vida el simple hecho de su ausencia no me habría permitido llegar hasta aquí el día de hoy.

El presente trabajo de investigación fue realizado en las instalaciones del laboratorio de Biotecnología en Salud Animal, del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal (CENID-MA), perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en la Carretera Federal México-Toluca, Km 15.5, colonia Palo Alto, delegación Cuajimalpa, Ciudad de México.

Este trabajo fue desarrollado con apoyo del proyecto CONACYT No. 134099 “Clonación y expresión de la proteína VP2 de un aislado del virus de la necrosis pancreática infecciosa en un sistema de baculovirus y su evaluación *in vivo* con fines de prevención”, siendo responsable del proyecto la Dra. Elizabeth Loza Rubio.

RESUMEN

El virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI) afecta las etapas tempranas del desarrollo de diferentes especies de la familia *Salmonidae*, entre ellas la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). En la actualidad, no se cuenta con pruebas para la detección de anticuerpos. El objetivo de este trabajo fue desarrollar una prueba de ELISA para detectar anticuerpos contra el VNPI en truchas arcoíris. Para ello, cuatro truchas adultas de 450 g promedio se inmunizaron con una vacuna experimental inactivada con adyuvante incompleto de Freund a una proporción 1:1 por vía intraperitoneal, durante un periodo de 60 días con la finalidad de producir un suero hiperinmune de referencia (SHIR). Por otra parte, se obtuvo un lote del VNPI purificado en un gradiente de sacarosa para sensibilizar placas de ELISA. Como primer anticuerpo se utilizó el SHIR en tres diluciones (1:50, 1:75 y 1:100), como segundo anticuerpo un monoclonal anti-IgM de trucha. Finalmente, se utilizó un conjugado anti-IgM de ratón marcado con peroxidasa. Los resultados mostraron que con el antígeno purificado a una concentración de 0.625 µg/µl, fue posible detectar anticuerpos de truchas inmunizadas con una vacuna contra VNPI, además fue sensible a la detección de anticuerpos en suero de animales desafiados después de 17 días post-infección. El estudio demostró que la prueba de ELISA es una alternativa eficaz para la detección de anticuerpos contra el VNPI en muestras de animales expuestos al virus experimentalmente.

ABSTRACT

Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) affects the early stages of the development of different species of the *Salmonidae* family including rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). There is currently no test to detect antibodies. The objective of this work was to develop an ELISA test to detect antibodies against IPNV in rainbow trout. Four trout were immunized intramuscularly with eight immunizations of an experimental vaccine inactivated with Freund's incomplete adjuvant at a ratio of 1: 1 over a period of 60 days in order to produce a hyperimmune reference serum (HIRS). On the other hand, it was obtained a batch of the IPNV, purified on a sucrose gradient, to sensitize ELISA plates. As the first antibody, HIRS was used at three dilutions (1:50, 1, 75 and 1: 100); as a second antibody it was used a trout anti-IgM monoclonal. Finally, it was used an anti-mouse IgM peroxidase-labeled conjugate. The results showed that with the purified antigen at a concentration of 0.625 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$, it was possible to detect antibodies of trout that were immunized with a vaccine against IPNV; in addition the detection of antibodies in serum of exposed animals after 17 days post infection was sensitive. The study demonstrated that the ELISA test is an effective alternative for detecting antibodies against IPNV in animals experimentally inoculated.

ÍNDICE

1) Introducción	1
1.1 Antecedentes	1
2) El Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (VNPI)	2
2.1 Características del virus	2
2.2 Clasificación	3
2.3 Estructura.....	3
2.4 Proteínas.....	4
2.5 Ciclo de replicación viral	5
2.6 Patogenia	6
2.7 Transmisión.....	8
2.8 Tratamiento, prevención y control	8
2.9 Diagnóstico	9
2.10 Prueba de ELISA	10
3) Inmunidad en peces	11
3.1 Generalidades.....	11
3.2 Inmunidad humoral no específica	11
3.3 Inmunidad celular no específica.....	12
3.4 Inmunidad humoral específica	14
3.5 Inmunidad celular específica.....	15
4) Justificación	17
5) Objetivos	18
5.1 Objetivo general.....	18
5.2 Objetivos específicos	18
6) Hipótesis	19

7) Material y Métodos	20
7.1 Área de estudio	20
7.2 Muestras biológicas	20
7.3 Producción de suero hiperinmune (SHI) en trucha arcoíris.....	20
7.3.1 <i>Animales</i>	20
7.3.2 <i>Inmunización de animales</i>	22
7.3.3 <i>Toma de muestra de sangre</i>	23
7.4 Producción de antígeno del virus de la necrosis pancreática infecciosa.....	24
7.4.1 <i>Replicación del VNPI</i>	24
7.4.2 <i>Purificación del VNPI</i>	25
7.5 Western blot (WB).....	26
7.6 Dot blot (Db).....	27
7.7 Estandarización de la prueba de ELISA.....	28
7.8 ELISA.....	28
7.9 Análisis estadístico.....	29
8) Resultados	30
8.1 Producción del antígeno del VNPI	30
8.2 Cuantificación del VNPI purificado	31
8.3 Producción del suero hiperinmune.....	31
8.4 Cinética del suero hiperinmune.....	31
8.5 Western blot.....	32
8.6 Dot blot.....	33
8.7 ELISA.....	34
9) Discusión de los resultados	38
10) Conclusiones	42

11) Anexos	43
12) Lista de abreviaturas	47
BIBLIOGRAFÍA	48

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Micrografía del virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa y mapa genético con las proteínas estructurales.....	4
Figura 2. Estructura del genoma y segmentos.....	5
Figura 3. Alevines de 21 días sanos e infectados con el Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa.....	6
Figura 4. Signos y mortalidad causadas por el Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa.....	7
Figura 5. Comparación del tejido pancreático sano y afectado por el Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa.....	8
Figura 6. Peceras utilizadas para el alojamiento y almacenamiento de agua.....	21
Figura 7. Truchas con el efecto del anestésico MS – 222.....	22
Figura 8. Inmunización de las truchas por vía intraperitoneal.....	23
Figura 9. Obtención de sangre a través de la vena caudal.....	24
Figura 10. Efecto citopático del Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa en un monoestrato infectado a las 36 horas.....	25
Figura 11. Bandas de peso molecular del antígeno purificado en un gel PAGE al 10%.....	30
Figura 12. Cinética de producción de anticuerpos en truchas arcoíris durante ocho semanas.....	32
Figura 13. Ensayo de western blot al utilizar el suero hiperinmune de trabajo con el antígeno de trabajo producidos en el laboratorio.....	33
Figura 14. Ensayo de dot blot para determinar la cantidad de µg del antígeno a utilizar y determinar la dilución del suero para su evaluación.....	34

Figura 15. Resultados de la evaluación a través del ELISA de los animales inmunizados.....35

Figura 16. Comparación entre los grupos vacunados y sin vacunar indicando la presencia de animales verdaderos positivos y verdaderos negativos.....36

INDICE DE CUADROS

Cuadro1. Grupos de animales utilizados clasificados de acuerdo a si fueron o no vacunados así como el número de animales por grupo.....20

Cuadro 2. Resultados de la prueba de ELISA para la detección de anticuerpos contra el VNPI en truchas arcoíris de los grupos vacunados y no vacunados utilizados durante el experimento.....34

Cuadro 3. Tabla de contingencia que señala el total de animales utilizados los cuales fueron 112 y de estos 35 son considerados animales verdaderos positivos, 8 animales se consideran como falsos negativos, 3 animales se consideran falsos positivos y 66 animales son considerados como verdaderos negativos; indicando una sensibilidad del 81% de la prueba ($35/43=81$) y una especificidad del 95% ($66/69=95$).....36

1) Introducción

1.1 Antecedentes

La acuicultura constituye una fuente importante de alimentos, no solo a nivel nacional, sino también a nivel mundial. Diversas especies son producidas y después capturadas para abastecer el consumo humano (SAGARPA-CONAPESCA, 2014).

La trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), es una especie que pertenece a la familia *Salmonidae*. Su origen se remonta a la costa del Pacífico desde Alaska hasta la península de Baja California en México. Debido a su fácil adaptación al cautiverio, su crianza ha sido ampliamente difundida casi en todo el mundo. En México, se formalizó su reproducción en 1937 y a partir de 1970 la actividad comenzó a diversificarse para su comercialización (SAGARPA, 2012).

La truticultura representa una actividad de crecimiento, debido a su rentabilidad con un crecimiento anual en los últimos 10 años del 3.98%. Su volumen de producción se encuentra posicionada en el lugar 17 de la producción pesquera en México. Sin embargo, de acuerdo a su valor económico y sociocultural, se posiciona en el séptimo lugar. La producción de trucha puede obtenerse por acuicultura o por captura; la primera aporta más del 80% de la producción total que hasta el 2014 fue de 1,650 miles de toneladas de peso vivo, siendo el Estado de México el mayor productor (SAGARPA-CONAPESCA, 2014).

El volumen de producción de huevo oculado de trucha en México es muy bajo, por lo que no alcanza para abastecer los requerimientos del mercado local y se requiere importar. En el 2010, se importaron 11, 570, 000 huevos oculados de trucha procedentes de los Estados Unidos de América (SAGARPA, 2012). Sin embargo, esto es un riesgo, ya que el huevo oculado y crías de truchas son fuente importante en la diseminación de enfermedades (Torres, 2009).

Aunque la truiticultura es considerada una fuente rentable de alimento, es afectada por diferentes enfermedades que merman su producción; entre estos padecimientos, las patologías causadas por agentes virales son consideradas las de mayor importancia, debido a las dificultades asociadas tanto al diagnóstico, como al control, además de la inexistencia de tratamiento terapéutico para dichas infecciones (Fernández-Carriel, 2005). Dentro de las enfermedades virales reportadas en esta especie están la necrosis pancreática infecciosa (NPI), necrosis hematopoyética infecciosas (NHI), necrosis eritrocítica viral (NEV), septicemia hemorrágica viral (SHV) y enfermedad viral por herpes (EVH). Siendo la NPI la de mayor importancia debido al impacto que provoca por su alta mortalidad en peces de primera alimentación (OIE, 2006; SAGARPA, 2012).

2) El Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (VNPI)

2.1 Características del virus

La NPI es una enfermedad aguda altamente contagiosa que puede presentarse en diferentes organismos acuáticos de agua dulce y marina. Es causada por un agente viral miembro de la familia *Birnaviridae* del género *Aquabirnavirus* (Rodríguez S y colaboradores, 2003). La enfermedad asociada a la trucha cultivada fue reconocida en 1940, pero no fue nombrada como NPI hasta mediados de 1950, cuando fue aislado el virus por primera vez en teleósteos por Wolf y colaboradores (Crane y Hyatt, 2011).

Se considera de distribución mundial y aunque no es una zoonosis, su importancia radica en la alta mortalidad, fácil diseminación y falta de tratamiento, considerándose una enfermedad de alto impacto económico. Es por ello, que cuando ocurre un brote este, debe ser notificado a través de los Comités de Sanidad Acuícola Estatales, los cuales son agentes auxiliares del Sistema Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) para

determinar el posible sacrificio del lote infectado así como evitar la movilización de los mismos (OIE, 2006; SAGARPA, 2012).

2.2 Clasificación

La clasificación del virus puede realizarse mediante la prueba de seroneutralización, en la que la mayoría de los *Birnavirus* acuáticos se encuentran antigénicamente relacionados y pertenecen a un serogrupo A; el cual contiene 10 serotipos: A1 (West Buxton, WB, o VR-299), A2 (Spjarup, Sp), A3 (Abild, Ab), A4 (Hecht, He), A5 (Telliana, Te), A6 (Canadá 1, C1), A7 (Canadá 2, C2), A8 (Canadá 3, C3) y A9 (Jasper, Ja) y A10 (N1). Sin embargo, algunos aislados presentan variabilidad antigénica respecto del serogrupo anterior por lo que han sido clasificados como pertenecientes al serogrupo B, que contiene un serotipo TV-1 (Fernández-Carriel, 2005).

En México el VNPI fue identificado por primera vez en el año 2000, a partir de crías procedentes de Estados Unidos, y se logró aislar en granjas reproductoras de truchas arco iris (Ortega C, 2002). En el 2011, Barrera y colaboradores realizaron la genotipificación de los aislamientos e identificaron que ambos se encontraban clasificados en el grupo perteneciente a cepas norteamericanas, de acuerdo a este análisis se reporta diversidad genética entre las regiones productoras del Estado de México. En 2014 Salgado-Miranda y colaboradores, realizaron un análisis filogenético para caracterizar molecularmente los virus aislados de las principales regiones trutícolas del país, los aislamientos obtenidos entre el 2005 y 2007 confirman su relación con cepas norteamericanas. Por otra parte, el análisis de aminoácidos de la VP2 reveló que todos los aislamientos son de baja virulencia.

2.3 Estructura

El virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI) es un virus de forma icosaédrica, sin envoltura y mide entre 60 y 74 nm de diámetro. Su genoma está conformado por ARN de doble cadena el cual se encuentra en dos segmentos A y

B, que codifican para las cinco proteínas que lo conforman: VP1, VP2, VP3, VP4 y VP5 (Dobos, 1995; Salgado C., 2006) (Figura 1).

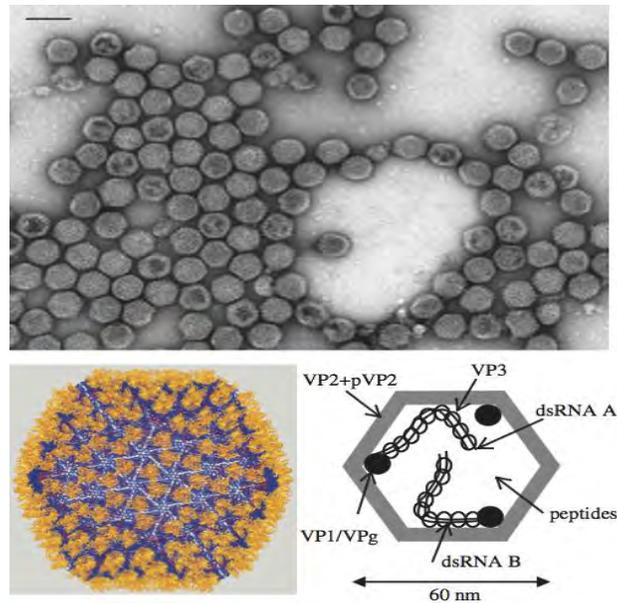


Figura 1. Micrografía del Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa y mapa genético con las proteínas estructurales.
Fuente: Blackburn K, Brown D (2001)

2.4 Proteínas

El segmento A tiene aproximadamente 2962-3104 pb y presenta dos marcos de lectura abiertos (ORF, por sus siglas en inglés *Open Reading Frame*). El ORF-1 codifica para la poliproteína precursora (PP) formada por pVP2-VP4-VP3- y tiene una masa de alrededor de 106 kDa. Esta poliproteína es fragmentada para generar tres polipéptidos: pVP2 (precursor de la proteína principal de la cápside); VP3 (proteína menor de la cápside) y NS (proteína no estructural). La proteína pVP2, escinde a VP2 durante la maduración del virus (Rodríguez y colaboradores, 2003).

El ORF-2 codifica para un polipéptido pequeño de 17-kDa que corresponde a la proteína VP5, es sintetizada en la fase inicial de la replicación viral y se sugiere

viriones en el citoplasma (Dobos, 1995; Maclachlan NJ y Dubovi EJ, 2011). En cultivos *in vitro*, se puede observar efecto citopático (ECP) entre 16 a 20 horas post-infección (pi) a 22 °C (Ortega, 2007).

2.6 Patogenia

Clínicamente la infección causada por el VNPI, varía dependiendo del serotipo, etapa de cultivo, condición fisiológica de los peces; así como condiciones ambientales de las zonas de cultivo, temperatura, contenido de oxígeno del agua y densidad de cultivo (Fernández-Carriel, 2005; Rodríguez S y colaboradores, 2003).

La enfermedad se caracteriza por cambios de comportamiento que incluyen anorexia y movimientos natatorios circulares intercalados con ataxia, además se observa distensión abdominal, pigmentación oscura de la piel (hiperpigmentación), exoftalmia leve o moderada, branquias pálidas; se pueden presentar hemorragias en la zona ventral, incluidas las aletas y presencia de pseudofecas de color blanquecino (Rodríguez S y colaboradores, 2003). Sin embargo, en algunos casos pueden no manifestar signos aparentes (Figura 3 y 4).



Figura 3. *Izquierda* alevines de 21 días de edad sanos. *Centro* alevines de 21 días infectados con el VNPI con signos de distensión abdominal. *Derecha* alevines de 21 días de edad infectados con el VNPI con retraso de crecimiento.

Fuente: <http://www.gbcbiotech.com/genomicaypesca/especies/peces/trucha.html>
(Consulta 25-05-2016)



Figura 4. **4A.** Trucha con hiperpigmentación; **4B.** Mortalidad causada por la infección con el VNPI.
Fuente. <http://www.gbcbiotech.com/genomicaypesca/especies/peces/trucha.html>
(Consulta 25-05-2016)

Al realizar la necropsia se observa que el lumen gástrico e intestinal carece de alimentos y contiene un moco de color blanco (enteritis catarral) considerado patognomónico (Rodríguez, 2003), lo que indica presencia del virus y su patogenicidad. En algunos peces infectados se observan petequias en el ciego pilórico y tejido adiposo, y ascitis en la cavidad. A menudo se observan aumentados de tamaño y pálidos, órganos como: bazo, corazón, hígado y riñones, además de petequias y hemorragias en toda la masa visceral. Los hallazgos histopatológicos incluyen focos de necrosis coagulativa en páncreas, riñón e intestino, así como enteritis catarral aguda (Ortega, 2007) (Figura 5).

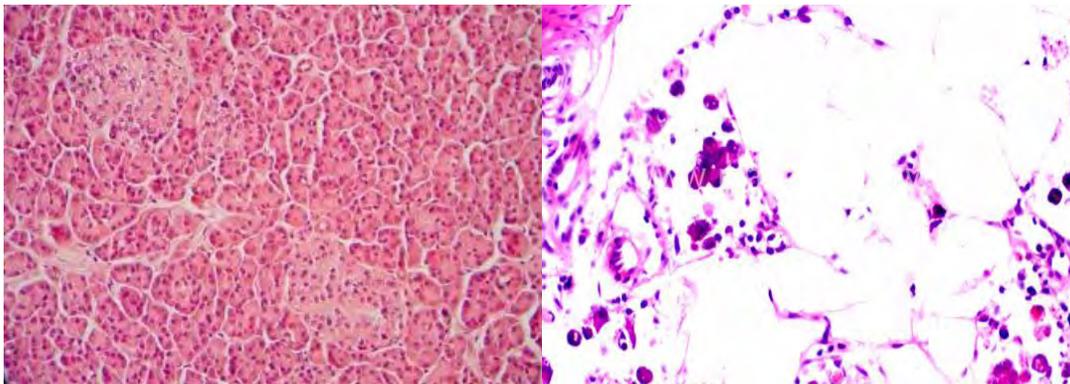


Figura 5. *Izquierda* tejido pancreático sano. *Derecha* focos de necrosis de tejido pancreático afectado por el VNPI.
Fuente. <http://www.gbcbiotech.com/genomicaypesca/especies/peces/trucha.html>
(Consulta 10-03-2016)

La enfermedad tiene un impacto considerable en la salmicultura y truticultura debido a que causa una elevada mortalidad en alevines y crías, ya que puede afectar al 90% de la población infectada; al término de la enfermedad los

organismos sobrevivientes se convierten en portadores y diseminadores del virus por largos periodos de tiempo (Ortega, 2007).

2.7 Transmisión

La transmisión es tanto por vía vertical como horizontal. La transmisión horizontal ocurre por contacto directo con agua contaminada con las heces y orina de peces infectados, por lo que es el principal mecanismo de propagación entre alevines. Se ha descrito que un mililitro de descarga intestinal de un pez enfermo con VNPI contiene aproximadamente un millón de partículas víricas (Ortega, 2005). La transmisión vertical es por medio de células utilizadas para las técnicas reproductivas, en donde ocurre una adsorción viral a la superficie del espermatozoide y en los gametos femeninos a través del líquido folicular (Rodríguez S y colaboradores, 2003). Bebak y McAllister en 2009 reportaron que el virus se transmite a partir de crías infectadas en un periodo mínimo de dos días con un 75% de infección de la población total expuesta.

El VNPI ha sido aislado a partir de fluido ovárico y ovas lavadas (Rodríguez, *et al.*, 2003), también ha sido aislado a partir de alimento comprimido húmedo y sedimento marino y en heces de aves silvestres piscívoras que se consideran vectores (Cutrin y colaboradores, 2000).

2.8 Tratamiento, prevención y control

Actualmente no existe ningún tratamiento terapéutico efectivo para el control de la enfermedad, por ello la aplicación de medidas de bioseguridad, desinfección de ovas, sistemas de incubación individual, aplicación de vacunas y realización de pruebas de detección del virus en reproductores, son primordialmente los más adecuados para la prevención (Fernandez-Carriel, 2005).

Las buenas prácticas de control y prevención inmediatas recomiendan evitar la introducción de huevos oculados que provengan (o se tenga la sospecha) de

reproductores que pudieran ser portadores del VNPI, así como, evitar la movilización en zonas donde la enfermedad es endémica.

Desde el año 2010 el Instituto Nacional de Pesca (INAPESCA) lleva a cabo un programa de producción de huevo de trucha arcoíris con fotoperiodo, que permite contar con más de un desove al año, reduciendo así el volumen de importación y con ello el riesgo de introducción de enfermedades (INAPESCA, 2010). Además, se han desarrollado programas de inspección sanitaria piscícola para identificar a las poblaciones infectadas; sin embargo, el éxito de tales programas depende de la detección e identificación rápida de patógenos específicos.

2.9 Diagnóstico

El manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos, publicado por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), indica que las técnicas para la identificación de virus de peces sin signos se fundamentan en el aislamiento viral en líneas celulares de peces como fibroblasto de alevín *Lepomis Macrochirus* (BF-2) y células embrionarias de *Salmón Chinook* (CHSE-214), seguido de pruebas inmunológicas. El diagnóstico a partir de peces enfermos inicia con la histología en los tejidos infectados, confirmado posteriormente por el aislamiento viral y la identificación inmunológica en cultivo celular (OIE, 2006). Sin embargo, el aislamiento es una técnica relativamente cara y el tiempo requerido para su identificación es alrededor de tres semanas, lo que retrasa el diagnóstico.

La necesidad de ofrecer resultados más rápidos han dirigido a los laboratorios de diagnóstico a llevar a cabo procedimientos como fluorescencia indirecta de anticuerpos (IFAT, por sus siglas en inglés), técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa convencional (PCR, por sus siglas en inglés) y el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA por sus siglas en inglés) entre otras (Tapia y colaboradores, 2015).

2.10 Prueba de ELISA

La introducción de los procedimientos basados en las reacciones inmunológicas ha representado un importante avance en el análisis de sustancias de interés en biología animal y vegetal, difíciles de medir empleando los métodos bioquímicos habituales. Dentro de los procedimientos inmunológicos, los más útiles y prácticos son aquellos que se basan en la especificidad de la unión antígeno – anticuerpo (Ag-Ac). La propiedad que tienen los anticuerpos de unirse a un antígeno, la especificidad de esta unión y el hecho de que pueda visualizarse por los fenómenos de precipitación, aglutinación y otros mecanismos indirectos (marcaje con fluoresceína, con radioisótopos o con enzimas) hacen que estos métodos se empleen ampliamente. Dado que los antígenos y anticuerpos se definen por sus interacciones mutuas, uno de ellos puede utilizarse para cuantificar al otro. Si disponemos de una solución de un anticuerpo monoclonal, podemos definir su afinidad y especificidad con considerable confiabilidad (Kumagai, 2010). Los sueros pueden compararse de acuerdo con su contenido de anticuerpos, ya sea por la determinación de cuantos anticuerpos se unen al antígeno en una dilución fija del suero o por la comprobación de una dilución seriada del suero para comprobar a que nivel una cantidad estándar de antígeno es suficiente para dar un resultado positivo de la unión. Esto es denominado título de anticuerpos. La identificación de los complejos Ag-Ac, se hace mediante el empleo de enzimas bien unidas al antígeno o bien unidas al anticuerpo (Kumagai, 2010).

Actualmente la prueba de ELISA es una técnica ampliamente utilizada en diagnóstico, debido a que su aplicación es simple y ofrece resultados más rápidos en comparación con otras técnicas de diagnóstico (Tapia y colaboradores, 2015).

En algunas investigaciones se ha utilizado esta técnica serológica para la detección de anticuerpos contra el VNPI (Rodak L. 1998).

3) Inmunidad en peces

3.1 Generalidades

Los peces poseen sistemas inmunitarios capaces de llevar a cabo respuestas humorales y celulares tanto innatas como específicas. Esencialmente, los sistemas defensivos de los peces tienen los mismos componentes que los de los mamíferos a quienes anteceden evolutivamente. Conocer la inmunología de los peces es relevante para comprender que a pesar de que hay algunas vacunas comerciales para proteger especies acuáticas de interés comercial contra algunas bacterias y virus, ampliar el conocimiento del sistema inmunitario de estos organismos permitiría incrementar la productividad e inocuidad de la acuicultura, mediante el desarrollo de nuevos métodos de estimulación inmunitaria y vacunación eficaces (Rubio–Godoy, 2010).

3.2 Inmunidad humoral no específica

La piel de los peces constituye la primera línea defensiva contra los patógenos, así como las membranas mucosas que recubren las branquias y el tracto gastrointestinal. Aparte de las escamas, espinas y la secreción de sustancias tóxicas que pueden ocurrir en la superficie del pez, el moco que recubre la piel es un importante mecanismo defensivo, pues contiene una variedad de compuestos antimicrobianos y probablemente antiparasitarios: lisozima y proteasas, factores del complemento, proteína C reactiva, lectinas, interferones, eicosanoides, transferrina, péptidos (piscidinas, somatostatina ACTH) y diversos carbohidratos (Magnadottir, 2016).

Probablemente el factor defensivo innato de los peces mejor estudiado es el complemento, que está compuesto por una serie de proteínas séricas que tienen tres funciones defensivas primordiales: a) recubrir patógenos y partículas ajenas al cuerpo para facilitar su reconocimiento y destrucción por parte de las células

fagocíticas (opsonización); b) iniciar las respuestas inflamatorias estimulando la contracción del músculo liso, la vasodilatación y la quimioatracción de leucocitos y c) lisar patógenos mediante la perforación de sus membranas (Yano, 2006).

Los interferones (IFN) constituyen una familia heteróloga de proteínas que confieren protección contra las infecciones virales. Se categorizan en tres grupos: IFN α e IFN β son producidas por las células infectadas por virus y se piensa que cualquier tipo celular puede producirlos; mientras que IFN γ es una citocina producida por los linfocitos T. La estructura genética y proteínica y las propiedades funcionales de los interferones de los peces son similares a las de los interferones de los mamíferos (Secombes, 2006). La importancia para los peces de la inmunidad mediada por complemento y otros componentes de la inmunidad innata se evidencia con dos ejemplos. El primero es que al ser organismos poiquilotermos, cuando los peces se encuentran a temperaturas muy bajas no son capaces de activar adecuadamente algunas funciones inmunitarias adaptativas, como la producción de anticuerpos y dependen sobre todo de las defensas innatas (Bly JE y colaboradores, 2007). El segundo ejemplo es que cuando la inmunidad adquirida no funciona adecuadamente, se incrementa la actividad del complemento y los factores de coagulación, como se demostró en peces zebra *D. rerio* los cuales son incapaces de producir anticuerpos normalmente (Jima y colaboradores, 2009).

3.3 Inmunidad celular no específica

El componente celular de las defensas inmunitarias no específicas de los peces incluye a las células fagocíticas móviles (macrófagos y granulocitos) que son reclutadas de la sangre y de los tejidos linfoides; a las células eosinófilas granulares (CEG), que son menos móviles y están presentes en sitios mucosales como el intestino o las branquias y son consideradas análogas a las células cebadas de los mamíferos; por otro lado las células citotóxicas no específicas (CCN) son consideradas el equivalente funcional en los peces de las células

asesinas naturales de los mamíferos (Secombes, 2006). Para reconocer los desafíos antigénicos e iniciar una respuesta inmunitaria, cuentan con diversos receptores. Los receptores tipo-Toll son proteínas transmembranales presentes en las células encargadas de la inmunidad innata (Bautista- Garfias y Mosqueda-Gualito, 2005).

Los peces carecen de médula ósea y la producción de células sanguíneas (hematopoyesis) se da principalmente en el riñón (Zapata y colaboradores, 2006), órgano en el que se localizan las células madre hematopoyéticas (Hanington y colaboradores, 2009). Otra diferencia notable entre los mamíferos y los peces radica en los linfonodos, los peces tienen una extensa red para atrapar partículas acarreadas en la sangre, principalmente en el riñón y el bazo, órganos donde se localizan poblaciones de macrófagos y linfocitos capaces de iniciar una respuesta inmune (Hanington y colaboradores, 2009). La inmunidad celular no específica comprende tres mecanismos defensivos: la inflamación, la fagocitosis y la citotoxicidad no específica. La inflamación es una respuesta que involucra a granulocitos, monocitos/macrófagos y linfocitos, y sigue a la exposición a un desafío antigénico. Posteriormente al contacto con el antígeno que puede ser de origen químico, bacteriano, micótico o parasitario, el área afectada recibe mayor irrigación sanguínea seguida de un aumento en la permeabilidad capilar y la migración de los leucocitos de la sangre hacia el tejido. Esta migración es estimulada por una variedad de factores derivados tanto del hospedero como de los patógenos (Castillo y colaboradores, 2009). El proceso de la fagocitosis en los peces es muy similar al observado en los vertebrados superiores: incluye las etapas de reconocimiento, unión, incorporación, destrucción y digestión del antígeno. Las células efectoras son los neutrófilos y los macrófagos; estos además colaboran con los linfocitos por medio de la presentación de antígenos y la secreción de citocinas. Los fagocitos poseen una variedad de mecanismos destructores, tanto oxidativos como no oxidativos; el más importante es el incremento del estallido respiratorio dependiente de oxígeno, que resulta en la formación de especies reactivas de oxígeno, como el anión superóxido, el

peróxido de hidrógeno y el ácido hipocloroso. La fagocitosis se estimula mediante la opsonización; por ello, las lectinas, la proteína C reactiva, el complemento y los anticuerpos facilitan la fagocitosis. La capacidad destructiva de los fagocitos es modulada por factores producidos por el huésped como el IFN- γ y el factor activador de macrófagos, que incrementan la respuesta respiratoria de las células y su habilidad de matar microorganismos (Sakai, 2002). Se han detectado células citotóxicas no específicas en la sangre periférica, el fluido peritoneal, el timo, el bazo y el riñón de los peces; y se ha demostrado que son citotóxicas contra células infectadas por virus y protozoarios (Utke y colaboradores, 2007).

3.4 Inmunidad humoral específica

Los linfocitos B de los peces primordialmente presentan inmunoglobulinas (Ig) de la clase IgM, con una cadena pesada parecida a la de los mamíferos. Sin embargo, recientemente se describieron dos isotipos más en peces óseos, IgD e IgT, que no han sido completamente caracterizados funcionalmente (Hansen y colaboradores, 2005). La capacidad multivalente de unión de la Ig le permite aglutinar y precipitar antígenos solubles. Los anticuerpos también actúan como opsoninas, recubriendo antígenos y promoviendo su fagocitosis. Adicionalmente, la unión al antígeno resulta en cambios conformacionales de la región Fc, que permiten la activación del sistema del complemento por medio de la vía clásica (Manning, 1998). Al igual que muchos otros procesos fisiológicos en los organismos poiquilotermos, la cinética de la producción de anticuerpos en los peces es altamente dependiente de la temperatura; a temperaturas fuera del rango óptimo, puede cesar por completo la producción de inmunoglobulinas (Bly JE y colaboradores, 2007). En general, la primera aparición de células B con Ig en la superficie es más tardía en peces marinos que en peces de agua dulce. La trucha arcoíris y el bagre presentan linfocitos B positivos a la IgM más o menos una semana después de eclosionar, mientras que en especies marinas como el pez lobo y el bacalao, la primera aparición de IgM en la superficie de las células se da de 1-10 semanas después de la eclosión. Se ha demostrado la transferencia

materna de anticuerpos a huevos, embriones y alevines en varias especies de peces (Magnadottir y colaboradores, 2005).

Las mucosas son extensas en los peces: las superficies externas y varias internas están recubiertas de moco. Por esta razón, es relevante la relación entre los componentes mucosos y sistémicos del sistema inmunitario. Es evidente que ambos están relacionados, pues los peces desarrollan niveles detectables de anticuerpos después de ser sumergidos en soluciones de antígenos solubles o en suspensiones de antígenos particulados; y estos anticuerpos pueden ser detectados en el intestino, la bilis, el moco de las branquias y la piel (Nakanishi y Ototake, 1997). A pesar de que hay evidencia que sugiere que la estructura de los anticuerpos presentes en el moco es ligeramente diferente a la de los anticuerpos séricos, no se ha detectado en peces una clase de Ig secretoria análoga al isotipo IgA de los mamíferos (Moore y colaboradores, 1998).

3.5 Inmunidad celular específica

La inmunidad celular específica depende de células portadoras de receptores MHC clase I (MHC-I) que sean capaces de presentar antígenos a los linfocitos T CD8 positivos. Considerando que las respuestas mediadas por células están restringidas al reconocimiento de las moléculas del MHC-I, es probable que participen en el reconocimiento de los antígenos virales presentados por las células infectadas (Nakanishi y Ototake, 2009). Se demostró que mediante la vacunación con ADN viral, se pueden inducir respuestas citotóxicas contra células con marcadores MHC-I infectadas por virus (Utke y colaboradores, 2007). Las interacciones entre las células inmunitarias no sólo están mediadas por contacto célula a célula, sino también a través de la secreción de proteínas solubles (citocinas). En general, las citocinas de tipo Th1 interleucina 2 (IL- 2), IFN- γ y los factores de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y beta (TNF- β) inducen defensas en contra de patógenos intracelulares al activar a los macrófagos, aumentando la presentación de antígenos e induciendo la diferenciación de células T. En

contraste, las citocinas de tipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) activan a las células B y de esta manera coordinan la inmunidad en contra de patógenos extracelulares mediante la producción de anticuerpos (Rubio–Godoy y colaboradores, 2003).

4) Justificación

Debido a que el virus de la necrosis pancreática infecciosa es considerado como uno de los de mayor incidencia en la acuicultura mundial y por las pérdidas económicas que esto implica, es necesario implementar pruebas de diagnóstico eficientes y rápidas para apoyar los programas de control sanitario y vigilancia epidemiológica acuícola. Actualmente, no existe en el país una técnica de diagnóstico serológico que sea rápida y específica, por lo que el presente estudio busca estandarizar una prueba de ELISA para la detección de anticuerpos contra el VNPI, debido a que esta prueba ha demostrado ser rápida, barata y sensible, además de ser de fácil reproducción en laboratorios donde se lleve a cabo la detección del virus como parte de los programas de vigilancia epidemiológica de la infección en las explotaciones acuícolas del país (Sundh y colaboradores, 2009).

5) Objetivos

5.1 Objetivo general

Obtener un ensayo de ELISA capaz de detectar anticuerpos contra el virus de la necrosis pancreática infecciosa en sueros de animales experimentalmente vacunados con un inmunogeno inactivado y en muestras de campo.

5.2 Objetivos específicos

- Producir antígeno del Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa purificado a partir de gradientes de sacarosa por centrifugación.
- Obtener suero hiperinmune de truchas arcoíris mediante la inmunización con un antígeno inactivado del VNPI.
- Establecer las condiciones de antígeno y suero necesarias en un ensayo de dot-blot.
- Estandarizar el ELISA realizando la evaluación del suero de los animales experimentalmente inoculados y vacunados.

6) Hipótesis

El ELISA es una prueba rápida, sensible y específica para la detección de anticuerpos, por lo que detectará anticuerpos contra virus de la necrosis pancreática infecciosa en animales expuestos a dicho antígeno.

7) Material y Métodos

7.1 Área de estudio

El presente proyecto fue desarrollado en el Laboratorio de Biotecnología en Salud Animal del Centro Nacional para Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Animal (CENID-MA) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, ubicado en carretera México Toluca Km 15.5, colonia Palo Alto, delegación Cuajimalpa, Ciudad de México, CP 05010.

7.2 Muestras biológicas

Para llevar a cabo el establecimiento de la prueba de ELISA, se tomaron sueros de truchas utilizadas en el laboratorio para diferentes fines experimentales. En el cuadro siguiente se describe el tipo de muestra y la cantidad de cada grupo:

Cuadro1. Grupos de animales utilizados clasificados de acuerdo a si fueron o no vacunados así como el número de animales por grupo.

Animales sin vacunar	69
Animales vacunados	43
Numero de muestras Totales	112

7.3 Producción de suero hiperinmune (SHI) en trucha arcoíris

7.3.1 Animales

Se obtuvieron ocho truchas arcoíris (*O. mykiss*) de una talla promedio de 450 g. Los organismos acuáticos fueron obtenidos de una granja ubicada en La Marquesa en el municipio de Ocoyoacac en el Estado de México.

Los especímenes fueron transportados dentro de bolsas con agua y oxígeno que se colocaron dentro de contenedores con hielo para mantener una temperatura constante durante su movilización. Los organismos fueron mantenidos en una cámara fría adaptada en el Laboratorio de Biotecnología en Salud Animal del CENID-MA del INIFAP. El lugar fue acondicionado para proporcionar una temperatura de 14 – 16 °C, requerida por los organismos acuáticos, además de un fotoperiodo de 12 horas de luz/oscuridad. Los animales se mantuvieron en peceras de polietileno con una capacidad de 85 L, teniendo cuatro peceras con dos ejemplares por pecera (Figura 6). El agua utilizada para el alojamiento y manejo de los organismos acuáticos fue desclorada 24 horas antes de ser utilizada y almacenada en peceras de vidrio con capacidad de 90 L cada una. En cuanto a la alimentación se les proporcionó el 3% de su biomasa de forma diaria en 2 tomas al día.



Figura 6. Peceras utilizadas para el alojamiento de truchas arcoíris (plástico) y recambio de agua (cristal).

Foto: Proyecto CONACYT CB 134099

Los organismos se mantuvieron en lotes separados con sistema de recirculación cerrado independientes por 14 días, previo a realizar la vacunación con la finalidad

de mantenerlos en observación y permitir que se adaptaran a sus nuevas condiciones de vida.

7.3.2 Inmunización de animales

Para la producción del SHI de referencia, los organismos mantenidos en el laboratorio fueron inmunizados con una vacuna experimental contra el VNPI de un aislamiento nacional siguiendo el siguiente protocolo.

Los animales fueron anestesiados con tricainemethanesulfonate (MS – 222, Sigma, USA) (Müller 2001; Mansilla 2002; Cristi 2003) a una concentración de 50 µg/ml en una tina con 20 L de agua previo a la inmunización (Figura 7).



Figura 7. Truchas bajo el efecto anestésico del MS – 222.

Foto: Proyecto CONACYT CB 134099

Los organismos fueron inmunizados con una vacuna inactivada con β -propiolactona (Sigma,USA) experimental generada en el laboratorio por vía intraperitoneal. Se utilizó una dosis de $1 \times 10^{7.9}$ DICC_{50%}/0,04 ml; adicionada con adyuvante incompleto de Freund (Sigma, USA,) a una proporción 1:1 respecto a la vacuna (Figura 8). Previo a la inmunización se tomó una muestra de sangre de los peces para separar y utilizar el suero como muestra negativa en la prueba.



Figura 8. Inmunización por vía intraperitoneal

Foto: Proyecto CONACYT CB 134099

Al final de cada inmunización los animales fueron colocados en una tina con agua y oxígeno abundante para su recuperación aproximadamente durante 10 minutos previo a regresarlas a sus tinas de origen (Christie, 2004).

La inmunización de las truchas se llevó a cabo bajo el siguiente esquema, el cual además muestra los días en los cuales se tomaron muestras de sangre para la obtención de suero que sería utilizado para evaluar la producción de anticuerpos.

	Días								
Inmunización	7	14	21	28	35	42	49	56	-----
Sangrado	7	14	21	28	35	42	49	56	70

7.3.3 Toma de muestra de sangre

Los sangrados se realizaron por punción de la vena caudal en los peces previamente anestesiados. Para la obtención del suero total en las truchas al final del periodo (día 70) (Figura 9). Se obtuvieron 2 ml de sangre por animal y aproximadamente entre 150–200 µl de suero por cada muestra de sangre esto en los primeros ocho sangrados y en el sangrado en blanco se obtuvieron

aproximadamente 10 ml de sangre por animal y aproximadamente 1 ml de suero por muestra.



Figura 9. Punción de la vena caudal para la obtención de muestras

Foto: Proyecto CONACYT CB 134099

7.4 Producción de antígeno del virus de la necrosis pancreática infecciosa

7.4.1 *Replicación del VNIP*

Para la producción de antígeno que sería utilizado en el ELISA se usó la línea celular *BF-2*, multiplicando las células en botellas de cultivo celular de 75 cm² (Nunc, USA). Para dicho procedimiento se infectó el monoestrato utilizando 5 ml de virus VNPI y 7 ml de medio L-15 (Leibovitz con L – glutamina (In Vitro, México) con 2% de SFB (Vitrocell, Alemania) como medio de mantenimiento. Se dejó incubar por una hora a una temperatura de 20 °C, homogenizando las botellas cada 10 minutos, posteriormente se hizo un lavado usando el mismo medio pero sin SFB para retirar los restos del medio de infección. Posteriormente se agregaron 58 ml de medio de mantenimiento y se dejó incubar por 72 horas a una temperatura de 15 °C. Las células infectadas se revisaron cada 24 horas para observar la presencia y/o ausencia de efecto citopático en el monoestrato infectado y determinar la infección como positiva (Figura 10).

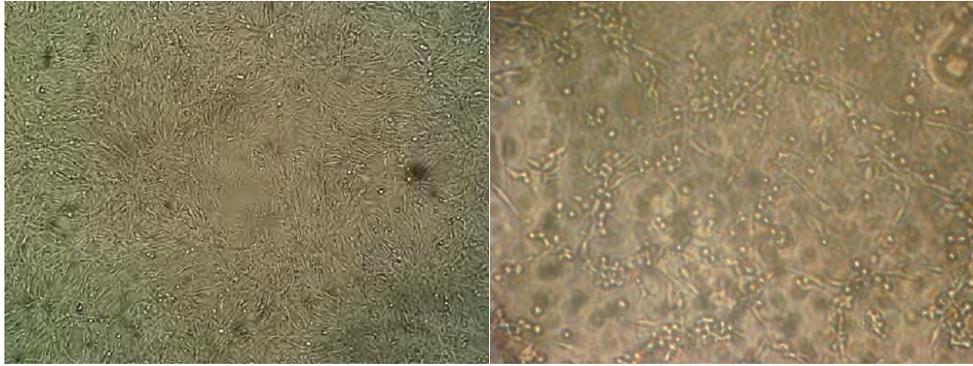


Figura 10. Infección de células Bf-2. Las células fueron observadas con un objetivo 10X. *Izquierda.* Monoestrato de células BF-2 no infectadas. *Derecha.* Células BF-2 a las 36 horas postinfección en las cuales se observa una confluencia del 50% del monoestrato.

Foto: Proyecto CONACYT CB 134099

7.4.2 Purificación del VNIP

A partir de las células infectadas, se colectó el sobrenadante con el que se llevó a cabo el procedimiento que se describe a continuación para obtener un antígeno purificado que fue utilizado en el ELISA. Después de que las células fueron infectadas, las botellas fueron congeladas por 24 horas, posteriormente se descongelaron y fueron congeladas nuevamente, esto se repitió 3 veces. El contenido de las botellas fue colocado en tubos cónicos de 50 ml y centrifugados a 1,233 xg durante 20 minutos, se recuperó el sobrenadante y se obtuvieron aproximadamente 380 ml.

A este sobrenadante se le adicionó un volumen igual de una solución de polietilenglicol (PEG) (Sigma, EUA) al 14% y con NaCl (Sigma, USA) al 4.4% y la mezcla se mantuvo en agitación constante durante 8 horas a una temperatura de 4 °C. Al final la solución fue centrifugada a 7,826 xg durante 75 minutos, el sobrenadante fue eliminado teniendo cuidado de no desechar el botón que se obtuvo, mismo que se resuspendió en 5 ml de buffer TNE (Tris 0.1M (Thermo Fisher Scientific, USA), NaCl 0.1 M (Sigma, USA) y EDTA 1mM (Thermo Fisher Scientific, USA) con un pH de 7.3 y se mantuvo en congelación (a -70 °C) hasta su uso.

Finalmente se realizó una purificación a través de un gradiente de sacarosa al 20%, se descongeló el antígeno y se le agregaron 5 ml de sacarosa al 20% y se ultracentrifugo a 40,000 xg durante 4 horas, se eliminó el sobrenadante por decantación y el precipitado se resuspendió en una solución de polietilenglicol (PEG, J. T. Baker, Estados Unidos), que se colocó en viales de 2 ml y se mantuvo congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

7.5 Western blot (WB)

La técnica de inmunoelectrotransferencia o Western blot, (WB) es un sistema rápido y sensible para la detección y caracterización de proteínas o anticuerpos que se basa en la especificidad del reconocimiento entre antígeno y anticuerpo (Taksdal y colaboradores, 1997).

La prueba de WB fue utilizada para determinar la presencia de anticuerpos presentes en el SHI producido en las truchas realizando el siguiente procedimiento: se utilizó un gel de poliacrilamida (PAGE) al 12% en donde se separó una muestra del VNPI, y posterior a la electroforesis el gel fue utilizado para transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa. La transferencia se llevó a cabo en el equipo Trans-Blot® Semi Dry Transfer Cell (Bio-Rad, USA) a 22 V durante 60 minutos. Posterior a la transferencia, la membrana se bloqueó con el buffer de bloqueo (Anexo 3) durante toda la noche a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. La membrana se lavó cuatro veces con buffer de lavado (Anexo 3) a temperatura ambiente. Se aplicó el suero de las truchas inmunizadas y se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 horas. Se lavó la membrana nuevamente cuatro veces con buffer de lavado a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionó un anticuerpo monoclonal anti-IgM de trucha (Aquatic Diagnostics Ltd, Australia) diluido a una concentración de 1:33, y se incubó durante 2 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y al finalizar la incubación se realizaron 4 lavados a temperatura ambiente. Se agregó el conjugado anti-IgM de ratón (Bio-Rad, USA) diluido a una concentración de 1:3000 y se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora y se repitieron los lavados descritos previamente. Se preparó la solución de

revelado (Anexo 3) justo antes de usarla y se adicionó a la membrana, después de 20 minutos se observó la aparición de bandas.

7.6 Dot blot (Db)

La excelente capacidad de la nitrocelulosa para adsorber proteína sentó las bases para el desarrollo del ensayo tipo dot, un ensayo inmunoenzimático simple, rápido y económico. La fijación de las proteínas a la membrana se lleva a cabo a partir de soluciones proteicas complejas: método de manchas o DOT-ELISA. Permite la fijación de gran cantidad de proteínas y, por tanto, la detección de componentes que se encuentran en pequeña cantidad en una mezcla compleja (Santi, 2005)

Se cortaron círculos de la membrana de nitrocelulosa de 0.45 micras para ser colocados en los pozos de una placa de ELISA; a la membrana se le colocó el antígeno del VPNI purificado a distintas concentraciones (50µg, 10µg y 5µg), lo anterior por duplicado por cada cantidad de antígeno y se dejó incubar a 4 °C toda la noche. La placa se lavó cuatro veces con buffer de lavado durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente la membrana se bloqueó con buffer de bloqueo incubando a 37 °C durante 30 minutos, se lavó nuevamente la membrana cuatro veces con buffer de lavado durante 5 minutos a temperatura ambiente. Con el SHI de trucha se hicieron tres diluciones (1:50, 1:75 y 1:100) para colocarlos en tres columnas de la placa y se incubó durante 2 horas a 37 °C, se realizaron cuatro lavados utilizando el buffer de lavado durante 5 minutos por lavado a temperatura ambiente. Como segundo anticuerpo se colocó un anticuerpo monoclonal anti-IgM de trucha (Aquatic Diagnostics Ltd, Australia) diluido en buffer de dilución a una concentración de 1:33 incubando a 37 °C durante 1 hora. Se repitió el proceso de lavado cuatro veces durante 5 minutos cada lavado a temperatura ambiente. Después se colocó el conjugado anti-IgM de ratón (Bio-Rad, USA) diluido a una concentración de 1:3000 y se incubó por 1 hora a 37 °C. Se lavó cuatro veces como se describió previamente. Finalmente, el revelado se

realizó con una solución de diaminobencidina (Sigma, Estados Unidos) y se incubo durante 30 minutos y se detuvo la reacción con agua.

El procedimiento descrito sentó las bases de la concentración adecuada del antígeno a utilizar para sensibilizar las placas de ELISA, así como las diluciones adecuadas a utilizar en los sueros problemas.

7.7 Estandarización de la prueba de ELISA

Según el método recomendado por Cardona y colaboradores (2005) para determinar el punto de corte, se calculó el promedio de los negativos más tres desviaciones estándar, los valores sobre este punto fueron clasificados como positivos y bajo este valor como negativos. Las variables a considerar para la estandarización de la prueba fueron: preparación del antígeno, titulación del antígeno, sensibilización de las placas, muestras utilizadas, dilución del suero y dilución del conjugado (Brunell y colaboradores 1983).

7.8 ELISA

Se utilizaron placas para ELISA en tiras (Nunc, USA) las cuales fueron sensibilizadas con el antígeno purificado a una concentración de 0.625 µg/µl para la dilución se utilizó buffer de carbonatos (Anexo 4). Se colocaron 100 µl del antígeno diluido en el buffer de carbonatos a las columnas A, C, E y G de la placa de ELISA y con la finalidad de eliminar el fondo inespecífico a las columnas B, D, F y H de la placa se les agregaron 100 µl de PEG; la placa se incubo toda la noche a 4°C. Posteriormente se retiró el sobrenadante y la placa se lavó 4 veces con 200 µl de buffer de lavado por pozo (Anexo 4). La placa se bloqueó con buffer de bloqueo (Anexo 4) agregando 100 µl a cada pozo y se incubó 1 hora a 37 °C. El sobrenadante se retiró y se lavó de la forma descrita previamente. El suero de los animales experimentalmente inoculados se adiciono por duplicado (dos pozos con antígeno y dos sin antígeno por suero) utilizando una dilución de 1:75 y se agregaron 100 µl por pozo, se incubo durante 2 horas a 37 °C. Al final de la

incubación se decantó el sobrenadante y se realizaron los lavados ya mencionados. Como segundo anticuerpo se utilizó la un anticuerpo monoclonal anti-IgM de trucha (Aquatic Diagnostics Ltd, Australia) diluido en buffer de dilución (Anexo 4) a una concentración de 1:33 colocando 100 µl por pozo y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Se decantó el sobrenadante y se lavó la placa. Después se colocó el conjugado anti-IgM de ratón (Bio-Rad, USA) diluida a una concentración de 1:3000 y se incubó por 1 hora a 37 °C. Para revelar la placa se prepara al momento una solución de citratos con 5 µg de OPD y 5 µl de peróxido de hidrógeno. Se agregaron 100 µl a cada pozo y se cubrió la placa de la luz para incubarla 15 min. a 37 °C, se agregaron a cada pozo 50 µl de ácido sulfúrico 2 N para detener la reacción. La lectura de la placa se realizó a 450 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro lector de placas Microplate Reader 550 (Bio-Rad, USA).

7.9 Análisis estadístico

El ELISA se repitió cuatro veces con cada uno de los sueros problemas y los resultados fueron capturados en una hoja de Excel para determinar las medidas de tendencia central y medidas de dispersión, para comparar las medias de los grupos no vacunados *versus* vacunados y los grupos verdaderos negativos *versus* verdaderos positivos se utilizó la prueba de T que nos permitió analizar las muestras independientes entre estos grupos (Cardona y colaboradores, 2005).

8) Resultados

8.1 Producción del antígeno del VNPI

Se obtuvo un lote del VNPI usando la línea celular BF-2, las cuales se multiplicaron en botellas de cultivo celular de 75 cm² como se describió previamente, obteniendo un total de 380 ml del virus a las 48 horas post-infección, y posteriormente purificar el antígeno como se describió en la parte de materiales y métodos.

Después de realizar el proceso de purificación se obtuvieron 15 ml del antígeno purificado a través de un colchón de sacarosa al 20%, el cual fue visualizado en un gel PAGE (Figura 10) para verificar su integridad.

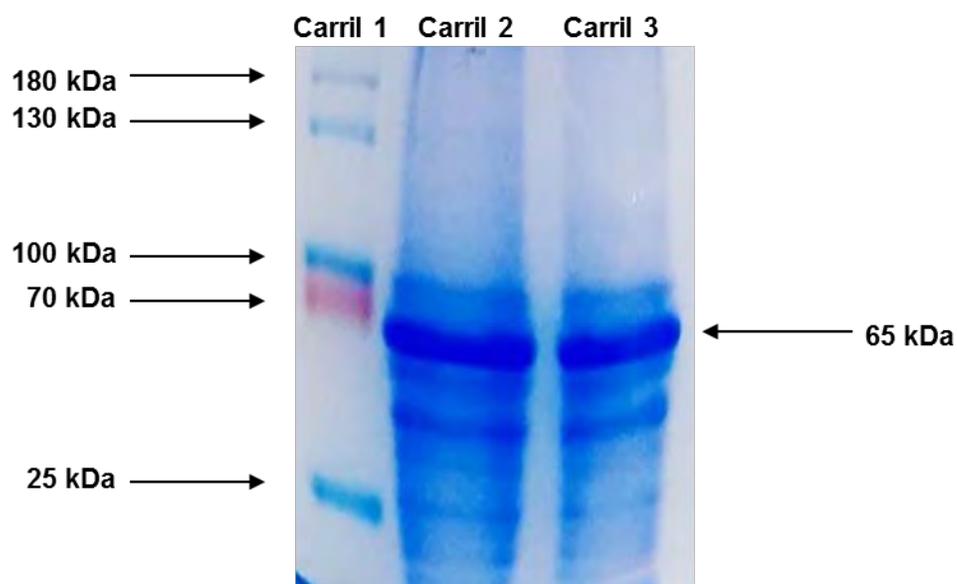


Figura 11. Antígeno de VNPI purificado. Gel PAGE al 10% en condiciones desnaturalizantes para visualizar el antígeno purificado en un gradiente de sacarosa. Carril 1: Page Ruler™ Prestained Protein Ladder 10 to 180 kDa (Thermo Fisher Scientific, USA), carriles 2 y 3: antígeno purificado, observando las bandas con un peso molecular de 65 kDa que corresponden a la proteína de cápside del VNPI.

8.2 Cuantificación del VNPI purificado

La cuantificación del virus purificado se llevó a cabo mediante la técnica de Bradford utilizando una curva estándar de albúmina sérica bovina, obteniendo una concentración de 0.625 µg/µl con una R² de 0.9837.

8.3 Producción del suero hiperinmune

Al concluir el calendario de 70 días en los que se realizó la inmunización de los organismos acuáticos, de forma periódica cada 7 días, los animales fueron sangrados en blanco de la forma ya descrita. Se obtuvieron aproximadamente 15 ml de sangre completa por trucha y un aproximado de 120 ml del total de las truchas. Después de realizar la separación del suero se recuperaron aproximadamente 40 ml de SHI.

8.4 Cinética del suero hiperinmune

Durante la producción del suero hiperinmune se obtuvieron muestras de suero de cada una de las ocho inmunizaciones con el objetivo de determinar en qué momento se iniciaba la aparición de anticuerpos y observar si existe alguna diferencia entre las primeras semanas de inmunización y la última.

Se observó que aproximadamente a partir de la semana 4 de inmunización se detectaron títulos de anticuerpos que pudieron ser identificados a través de la prueba de ELISA en al menos dos de los cinco animales que fueron parte del experimento, fue a partir de la quinta semana de inmunización que se identificaron títulos de anticuerpos a través de la prueba de ELISA en los cinco animales utilizados para el experimento.

Se observó también un aumento en los títulos de anticuerpos a partir de la semana cuatro hasta la semana ocho, periodo en que se realizó la última inmunización y una semana después los animales fueron sacrificados para la obtención del suero hiperinmune.

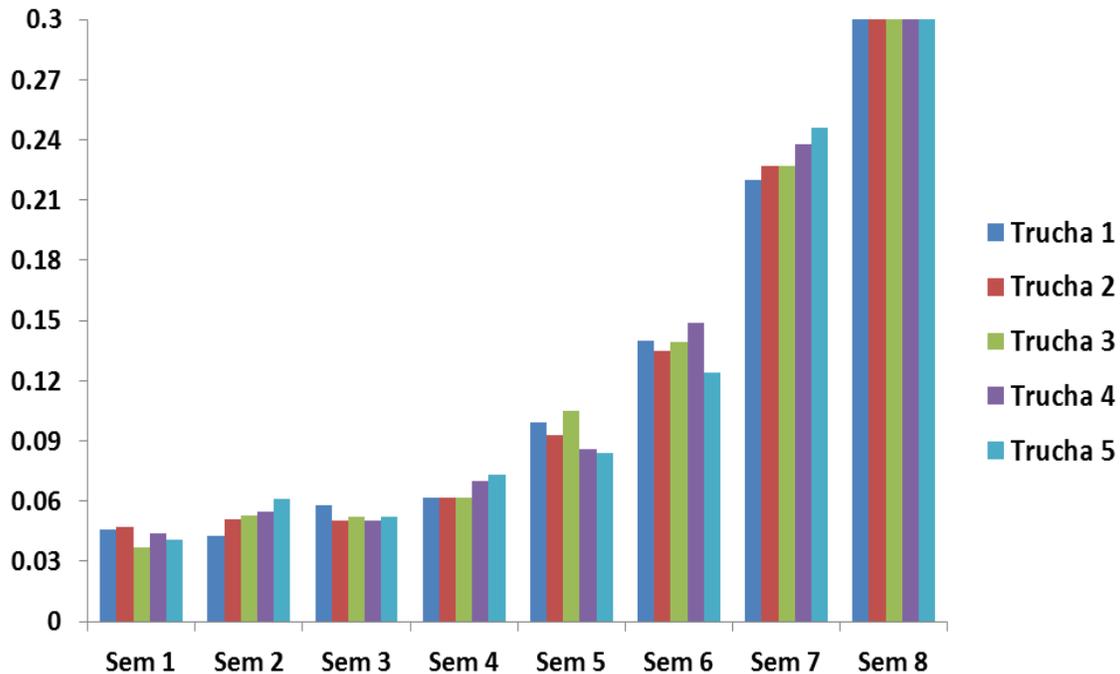


Figura 12. Cinética de producción de anticuerpos en truchas arcoíris, se observa el aumento de anticuerpos y la detección de anticuerpos a partir de las cuatro semanas de inmunización en dos de los cinco animales utilizados en el experimento y a partir de la semana cinco se detectan anticuerpos en todos los animales. Punto de corte (PC) = 0.0710 densidades ópticas (DO)

8.5 Western blot

La prueba de WB se realizó con la finalidad de determinar la presencia de anticuerpos específicos en el SHI, empleando el antígeno purificado del VNPI. Después de realizar dicha prueba se reveló la presencia de bandas en el peso esperado de 65 kDa, en la membrana de nitrocelulosa (Figura 12).

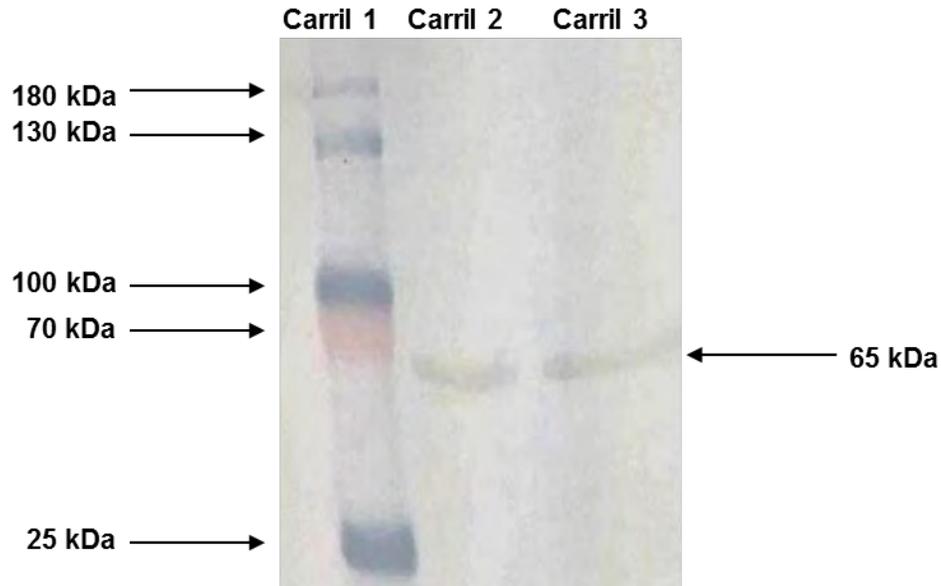


Figura 13. Ensayo de Western blot utilizando el SHI. *Carril 1:* Page Ruler™ Prestained Protein Ladder 10 to 180 kDa (Thermo Fisher Scientific, USA); *Carriles 2 y 3* antígeno de VNPI transferidos a la membrana y reconocidos por el suero hiperinmune.

8.6 Dot blot

El objetivo del dot blot fue determinar las condiciones tanto de antígeno como anticuerpos a ser utilizadas en las placas de ELISA. Dicha prueba permitió establecer los tiempos de incubación más eficientes para cada uno de los anticuerpos. Los resultados obtenidos permitieron establecer sensibilizaciones de las placas con una concentración de 50 µg del antígeno por pozo y utilizar las muestras a una dilución de 1:75, así como reducir los tiempos de incubación de 6 a 4 horas en comparación con el WB (Figura 13).

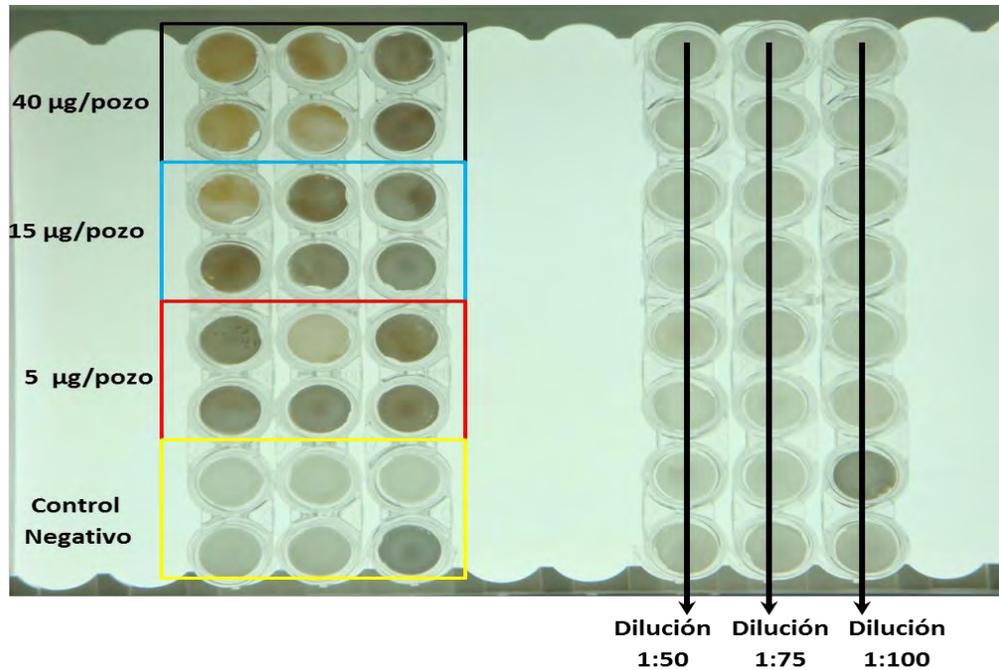


Figura 14. Prueba de Dot blot: del lado izquierdo se marcan las cantidades que se utilizaron del antígeno purificado para la detección de anticuerpos y del lado derecho se observan las diluciones del antígeno utilizadas.

8.7 ELISA

Se realizó la prueba de ELISA con las condiciones establecidas de tiempo, concentración de antígeno y las diluciones de las muestras obtenidas en el laboratorio realizando todas las muestras por duplicado, y los resultados se muestran en el Cuadro 1 y de forma gráfica en la figura 17.

Cuadro 2. Resultados de la prueba de ELISA para la detección de anticuerpos contra el VNPI en truchas arcoíris de los grupos vacunados y no vacunados utilizados durante el experimento

	No vacunados	Vacunados
Negativos	66	8
Positivos	3	35
Total	69	43

Todas las muestras del grupo de animales no vacunados fueron identificadas como negativas, ya que los títulos obtenidos se encontraron por debajo del punto de corte establecido; mientras que las muestras pertenecientes al grupo de animales vacunados sus valores de absorbancia estuvieron por encima del punto de corte (PC = 0.0750 DO) y en 38 muestras las cuales se identificaron como positivas al ELISA como se observa en la figura 14.

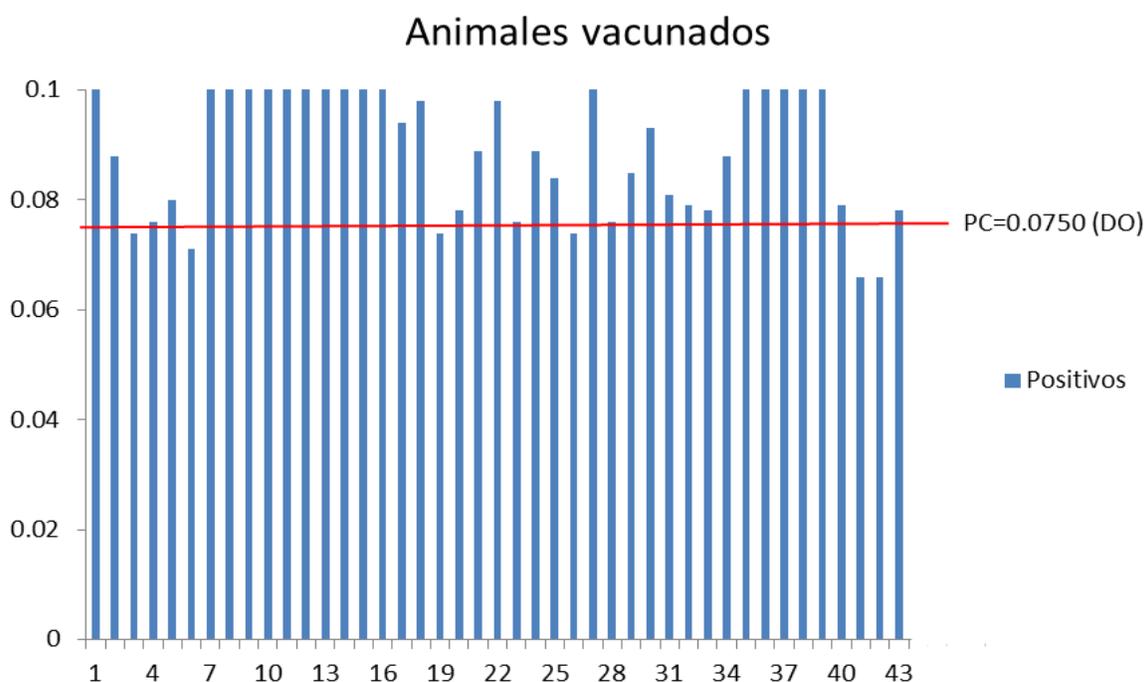


Figura 15. Resultados obtenidos de las muestras de suero de animales vacunados con el VNPI, el punto de corte se obtuvo en 0.0750 DO (densidades ópticas), de las 43 muestras de los animales vacunados 38 fueron positivas ya que sus valores se encontraron por encima del punto de corte establecido.

Se realizó el análisis estadístico de todas las muestras, para lo cual se agruparon en dos grupos: verdaderos negativos y verdaderos positivos los cuales fueron determinados por el punto de corte de la prueba de ELISA (PC = 0.0750 DO); el estudio se realizó sobre un total de 112 muestras y de las cuales 21 muestras fueron verdaderas negativas, y 38 muestras fueron consideradas como verdaderas positivas las cuales se pueden observar en la Tabla de contingencia señalada como cuadro 2.

Cuadro 2. Tabla de contingencia que señala el total de animales utilizados los cuales fueron 112 y de estos 35 son considerados animales verdaderos positivos, 8 animales se consideran como falsos negativos, 3 animales se consideran falsos positivos y 66 animales son considerados como verdaderos negativos; indicando una sensibilidad del 81% de la prueba ($35/43=81$) y una especificidad del 95% ($66/69=95$).

Prueba de ELISA	ESTADO DE LOS ANIMALES		Total
	Animales vacunados	Animales NO vacunados	
Positivos	35	3	38
Negativos	8	66	74
Total	43	69	112

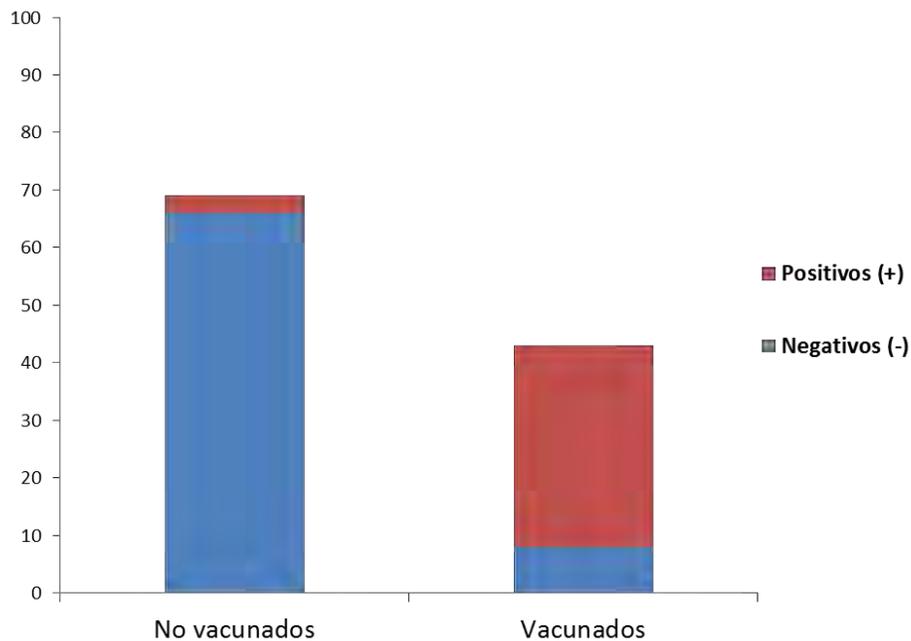


Figura 16. Resultados de los grupos no vacunados y vacunados utilizados en el experimento para determinar la presencia de anticuerpos en los peces inmunizados, de color azul se observan las muestras verdaderas negativas y en color rojo se encuentran las muestras identificadas como verdaderas positivas.

Los resultados de la desviación estándar de los dos grupos analizados nos indica que el grupo de verdaderos negativos presenta la menor variabilidad comparado con el grupo de verdaderos positivos que tiene una mayor variabilidad entre sus muestras. La prueba de T determino que existe una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) entre los grupos verdaderos positivos y verdaderos negativos.

9) Discusión de los resultados

La finalidad de la presente investigación fue dar a conocer una nueva alternativa para la detección de anticuerpos en truchas arcoíris inmunizadas experimentalmente con el VNPI, enfermedad vírica muy contagiosa de los peces jóvenes que puede afectar a una considerable parte de la producción acuícola, no sólo en un país, sino a nivel mundial. En 2014 un estudio realizado por el Laboratorio de Salud Animal Acuática de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) y la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM) estimó que esta enfermedad tiene una prevalencia general del 19.8% este resultado sugiere que la enfermedad de la NPI es un virus que actualmente está presente en el cultivo de peces en México, por lo que es necesario reforzar los métodos de detección y prevención tomando en cuenta la alta dependencia que existe en la importación de huevo oculado de trucha (Ortega y colaboradores, 2015).

Con el fin de implementar técnicas de prevención y control, y evitar la diseminación del virus, es necesario contar con métodos de diagnóstico que sean rápidos y sensibles. Los métodos rápidos son deseables en la fase aguda de la infección, mientras que métodos sensibles son necesarios para la detección de los virus durante la fase de portadores. Los métodos para el diagnóstico de enfermedades virales pueden ser catalogados en dos grupos, aquellos que miden o detectan la presencia del virus y aquellos que detectan respuesta inmune en el hospedero (anticuerpos). A pesar del desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico de las enfermedades virales mediante la demostración del agente o su material genético, actualmente es necesario contar con técnicas que indiquen la respuesta del hospedero ante los patógenos. Un elemento a considerar en los programas de prevención y control de la enfermedad de la NPI, así como, en el desarrollo de vacunas y estudios epidemiológicos, es el conocimiento de la dinámica que presentan los diferentes serotipos virales en las poblaciones de animales

afectados (Fernandez – Carriel, 2005). Lo anterior es más importante si se considera la amplia variación genética del VNPI, los cuales presentan diferencias de patogenicidad, especie a la cual afecta, entre otros. El tener un método de diagnóstico confiable y temprano, permitirá la detección de la enfermedad de manera oportuna para tomar las medidas necesarias para la contención de la enfermedad. La prueba de ELISA permite identificar moléculas como hormonas y proteínas; se basa en las interacciones químicas entre antígeno/anticuerpo y enzima/sustrato que dará como resultado una coloración específica, la cual se analiza por métodos de espectrofotometría para indicar la presencia de anticuerpos y una cuantificación aproximada (Milne y colaboradores, 2006).

Durante el periodo de aclimatación y previo a la vacunación los peces se observaron clínicamente sanos condición confirmada a través de un muestreo realizado a 30 peces tomados al azar tamaño de muestra utilizado en otros estudios de características similares (Mansilla, 2002; Cristi, 2003). El cambio de conducta presentado por los peces durante el periodo previo a la vacunación se explica por el estrés del traslado y cambio en las condiciones ambientales como describe Taksdal y colaboradores, 1998.

Después de la vacunación los peces se observaron letárgicos debido a la anestesia con MS – 222 recuperándose rápidamente. La triclaína principio activo del anestésico, posee la propiedad de recuperar a los individuos de forma rápida y no producir impacto sobre el consumo de alimento. La vía de inoculación intraperitoneal, asegura el ingreso y la cantidad deseada del inóculo y ha sido el método de elección en estudios previos (Müller, 2001; Mansilla, 2002; Cristi, 2003). Sin embargo esta vía provoca un quiebre artificial de las barreras naturales de defensa, condición que no se puede reproducir en la dinámica de la infección, ya que estimula solo la respuesta inmune activa de los peces.

En este estudio se implementó la metodología de un ELISA para la detección de anticuerpos contra el VNPI. Para evaluar la prueba se realizó un suero

hiperinmune y el antígeno de trabajo utilizado se obtuvo a partir de una cepa nativa de México, donada por la Dra. Celene Salgado del CIESA-UAMéx. Ambos fueron evaluados a través del Dot blot para determinar la concentración de antígeno y la dilución de los sueros con las que se realizó la prueba de ELISA, así como ajustar los tiempos y temperaturas requeridos durante las distintas incubaciones de la prueba, una metodología similar fue descrita por Olsen, 2008. Por otra parte, el riesgo de contaminación a lo largo de la prueba es muy bajo siempre y cuando se realicen buenas prácticas de laboratorio.

Los resultados que se obtuvieron de la prueba de ELISA revelaron que la prueba presento una sensibilidad del 81% y una especificidad del 95%, el grupo de los animales vacunados presento mayor varianza, debido a la presencia de animales que fueron identificados como negativos por la prueba aun y cuando fueron vacunados. Se esperaba que la prueba presentara una sensibilidad como mínimo del 90% o con resultados similares a los reportados por Milne y colaboradores en 2006.

La sensibilidad se encuentra por debajo de lo que se hubiese esperado para esta prueba, probablemente el resultado se ve afectado por utilizar una cantidad sub-óptima de muestras (Altman y colaboradores, 1994) o bien por alguna de las vacunas utilizadas durante la vacunación de los animales.

Los resultados son dependientes de los factores que interactúan durante el experimento y son exclusivos a los diferentes modelos utilizados. En estudios similares (Rodak, 1998; Milne, 2006 y Wilson, 2014) se han obtenido diferentes resultados con distintos productos y en diferentes ambientes, dificultando la comparación entre ellos. La estandarización de un método experimental que permita comparar diferentes resultados aparece como un desafío, dada la cantidad de factores relacionados.

Cabe mencionar que en comparación con otras técnicas, como la seroneutralización en cultivo celular que requiere de laboratorios y personal especializados, materiales costosos y de un periodo que va de las 72 a las 120

horas para su realización, la prueba de ELISA aquí estandarizada requiere en promedio 6 horas para llevarla a cabo (Rodríguez S y colaboradores, 2005).

La repetibilidad y reproducibilidad de los resultados aquí descritos, se confirmaron con la realización de cuatro ensayos independientes.

10) Conclusiones

Este estudio demostró que la ELISA puede ser una alternativa para la detección de anticuerpos en contra del VNPI en muestras de sueros de animales expuestos al antígeno viral de forma experimental, teniendo así un reconocimiento provisional, para poder llevar a cabo la validación de la prueba se recomienda complementar el estudio utilizando más muestras a medida que se dispongan de ellas y el uso de muestras de animales de campo que se sabe que son positivas y negativas.

El ensayo demostró ser sensible en la detección de anticuerpos en los animales utilizados para la producción del suero hiperinmune a partir de los 17 post infección.

En el caso de las muestras de los animales vacunados se recomienda evaluar la eficacia de las distintas vacunas utilizadas sobre todo si son experimentales con la finalidad de obtener la producción de anticuerpos esperada y que las muestras puedan ser evaluadas a través de esta prueba o bien utilizar una vacuna comercial. También se recomienda utilizar la prueba de seroneutralización para la evaluación de muestras que se consideren falsas negativas.

El ensayo establecido aquí, puede ser una alternativa para la vigilancia activa del virus en explotaciones trutícolas, en organismos de cualquier edad tomando en cuenta las observaciones ya mencionadas y teniendo en cuenta que esta prueba no reemplaza la prueba de oro para el diagnóstico de la enfermedad pero puede ser utilizada como una prueba rápida tomando en cuenta que es una prueba relativamente barata.

11) ANEXOS

ANEXO 1

Soluciones generales

- Buffer Salina Fosfatos (PBS) 1X pH 7.2
Diluir en 900 mL de agua destilada y desionizada: NaCl 8.0g, K₂HPO₄ 1.21g, KH₂PO₄ 0.34g. Ajustar el pH a 7.2 y aforar a 1000 ml.

ANEXO 2

Soluciones para los geles de poliacrilamida (PAGE)

- Solución stock de Acrilamida-Bisacrilamida
 - ✓ Acrilamida 146g
 - ✓ N'N'-metilen-bis acrilamida 4gDiluir en 500 mL de agua destilada y desionizada, filtrar y almacenar a 4°C en un frasco ámbar protegido de la luz.
- Buffer Tris-HCl 1.5 M pH 8.8
Disolver 54.45 g de Tris base en 150 mL de agua desionizada. Ajustar el pH a 8.8 con HCl y aforar a 300 mL. Almacenar a 4°C.
- Buffer Tris-HCl 0.5 M pH 6.8
Disolver 6.0 g de Trizma base en 60 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 6.8 con HCl y aforar a 100 mL. Almacenar a 4°C.
- SDS 10%
Disolver 10g de SDS en 60 mL de agua disolver completamente. Dejar que se disuelvan las burbujas generadas por el SDS y entonces aforar a 100 mL. Almacenar a temperatura ambiente.
- Persulfato de amonio 10%
Disolver el 100 mg de persulfato de amonio en 1 mL de agua destilada. Esta solución se prepara al momento de usarse, no almacenar.
- Buffer de muestra 2X
 - ✓ 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 20% glicerol, 2% SDS, 5% β-mercaptoetanol.
 - ✓ 0.4mL Azul de bromofenol 0.5%
 - ✓ 1.6mL Glicerol

- ✓ 3 mL Agua destilada
- ✓ 1 mL Tris-HCl pH 6.8
- ✓ 1.6 mL SDS 10%
- ✓ 0.4mL β-mercaptoetanol

- Buffer de corrida 5X
 - ✓ Buffer 1X= 25 mM Tris, 192 mM glicerol, 0.1% SDS, pH 8.3
 - ✓ 40g Tris base
 - ✓ 216g Glicina
 - ✓ 15g SDS

Disolver en 2 L de agua destilada y después ajustar a 3 L. No ajustar el pH con ácido o base. Si se precipita, calentar a 37°C antes de usarse. Para usar en la corrida preparar a 1X, para esto diluir 300 mL de este buffer stock en 1.2 L en agua destilada.

- Colorante Azul de Coomasie para PAGE
 - ✓ Agua bidestilada.....227mL
 - ✓ Metanol absoluto.....227mL
 - ✓ Ácido acético glacial.....45mL
 - ✓ Coomasie R250.....1.25g

Disolver el colorante con agitación y almacenar en frasco ámbar. El reactivo es estable y reciclable en estas condiciones.

- Solución decolorante para PAGE.
 - ✓ Agua bidestilada.....227mL
 - ✓ Metanol absoluto.....227mL
 - ✓ Ácido acético glacial.....45mL

El reactivo es reciclable filtrándolo en carbón activado, este se desecha cuando ya tiene una coloración azul. El gel se sumerge en el reactivo en agitación constante, tapando el recipiente para evitar que se evapore la solución. Hacer cambios constantes del mismo.

ANEXO 3

Soluciones para la prueba de Western blot

- Buffer de transferencia
Buffer de corrida para geles PAGE 1X y metanol 20%
- Buffer de bloqueo.
 - ✓ 3% Leche descremada.....3g

- ✓ 0.2% Tween 20.....200µL
 - ✓ PBS 1X.....100ml
- Buffer de lavado
 - ✓ 0.2% Tween 20.....2 mL
 - ✓ PBS.....1 L
- Buffer de dilución
 - ✓ 1% Leche descremada1g
 - ✓ Buffer de lavado.....100mL
- Revelador de peroxidasa.
 - ✓ 30 mg de 2,4 diaminobencidina
 - ✓ 60 mL de PBS
 - ✓ 30 µL H₂O₂
- Preparar al momento de usar.

ANEXO 4

Soluciones para la prueba de ELISA

- Buffer de carbonatos bicarbonatos (antígeno) pH 9.6
Diluir en 300 mL de agua destilada y desionizada: bicarbonato de sodio 22.6g, y carbonato de sodio anhidro 9.1g. Ajustar el pH a 9.6 y aforar a 500 mL. Almacenar en refrigeración.
- Buffer salino fosfatos (PBS) 1X pH 7.2
Diluir en 900 mL de agua destilada y desionizada: NaCl 8.0g, K₂HPO₄ 1.21g, KH₂PO₄ 0.34g. Ajustar el pH a 7.2 y aforar a 1000 ml.
- Buffer de lavado (PBS-TWEEN 20 al 0.2%)
Diluir en 1L de PBS 2 mL de Tween 20. Agitar vigorosamente y almacenar a temperatura ambiente.
- Buffer fosfato – citrato
NOTA: para 50ml, pH 5.0

Diluir 0.7296g de fosfato de sodio dibásico en 200 mL de agua y desionizada, una vez disuelto aforara a 25.7mL. Por otra parte, diluir 0.51069g de ácido cítrico y aforar a 24.3mL de H₂O. Mezclar ambas soluciones y almacenar en refrigeración. Verificar que el pH sea de 5.
- Solución de revelado
Preparar al momento de su uso.

Mezclar 12.5 mL de buffer de citratos, 1 tableta de 5 µg OPD (Sigma) y 5 µl de peróxido de hidrógeno.

- **Ácido sulfúrico 2N**

Para preparar 200 mL tomar 33 mL de H₂SO₄ (H₂SO₄ M, PM 98.08, pureza 97.6%) y agregarlos a un matraz con 167 mL de agua destilada. Transferir la solución a un frasco ámbar y almacenar a temperatura ambiente protegido de la oscuridad.

Nota: nunca poner primero el ácido y después el agua en el matraz ya que la reacción es altamente exotérmica. Esta solución es altamente corrosiva por lo que debe tenerse mucho cuidado con su manejo y además desechar el producto de la mezcla directamente a la basura, ya que puede corroer las tarjas del laboratorio.

12) Lista de abreviaturas

DO: Densidad óptica

CN: Control negativo

CP: Control positivo

INIFAP: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias

NPI: Necrosis Pancreática Infecciosa

PAGE: Gel de poliacrilamida para electroforesis

PC: Punto de corte

SFB: Suero fetal bovino

VNPI: Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa

BIBLIOGRAFÍA

Altman D, Bland J. Statistics Notes: Diagnostic Test 1: Sensitivity and Specificity. *BMJ* 1994. 308: 1552.

Barrera-Mejía M, Martínez S, Ortega C. Genotyping of infectious pancreatic necrosis virus isolates. *J Aquat Anim Health* 2011.23:200-206.

Branscum J. Estimation of diagnostic-test sensitivity and specificity through Bayesian modeling. *Prev Vet Med* 2005.68, 145–163.

Bautista-Garfias R, Mosqueda-Gualito J. Role of Toll-like receptors in innate immunity and their implication in veterinary medicine. *Vet Méx* 2005;36:453-468

Bayne CJ. Co-evolution of innate and adaptive immunity. *Integr Comp Biol* 2003; 43: 291-299

Bebak J, McAllister PE. Continuous exposure to infectious pancreatic necrosis virus during early life stages of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Fish Dis.* 2009; 32:173-81.

Bly JE, Quiniou SM, Clem LW. Environmental effects on fish immune mechanisms. *Dev Biol Stand* 2007;90:33-43

Bruce L. Nicholson., Prudence Caswell. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Identification of Infectious Pancreatic Necrosis Virus. *J Microbiol.* 1982.469-472

Brunell, P.A., Wingle, K., Murphy, M.D. Antibody response following measles-mumps-rubella vaccine under conditions of customary use. *JAMA.* 1983. 250:1409-1412.

Cardona N, Fabiana L, Gómez J. Estandarización del inmunoensayo ELISA para la detección de IgG anti-*Toxoplasma gondii* en ratón. Parasitol Latin 2005.60: 97-101

Castillo, A., C. Sánchez, J. Domínguez, S.L. Kaatari & A.J. Villena. Ontogeny of IgM and IgM-bearing cells in rainbow trout. Dev. Comp. Immunol. 2003. 17: 419-424.

Castillo-Briceño P, Sepulcre MP, Chaves-Pozo E, Meseguer J, García-Ayala A, Mulero V. Collagen regulates the activation of professional phagocytes of the teleost fish gilthead seabream. Mol Immunol 2009; 46:1409-1415

Christie, K.E. Immunization with viral antigens: infectious pancreatic necrosis, J Virol 2004. 78:13829-13838.

Clem, L.W., R.C. Sizemore, C.F. Ellsaesser & N.W. Miller. Monocytes as accessory cells in fish immune response. Dev. Comp. Immunol. 2005. 9:803-809

Coll, J.M. y A. Rocha. Investigación actual en vacunas para la acuicultura. Rev Acuatic, 2000.

Collet B. Innate immune responses of salmonid fish to viral infections. Dev. Comp. Immunol. 2013).

Crane M., Hyatt A. Viruses of fish: An Overview of significant pathogens. Viruses. 2011; ISSN 1999-4915.

Cristi M. Evaluación de la eficacia de dos vacunas experimentales bivalentes para el control de la Septicemia Rickettsial del Salmon (SRS) y Necrosis Pancreatica Infecciosa (NPI). Memoria de título, M. V. 2003. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.

Cutrin JM, Oliveira JG, Barja JL, Dopazo CP. Diversity of infectious pancreatic necrosis virus strains isolated from fish, shellfish, and other reservoirs in Northwestern Spain. *Appl Environ Microbiol* 2000.66:839-843.

Dobos P. The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *J Fish Dis* 1995.5:25-54

Dorson M, Torchy C. The influence of fish age and water temperature on mortalities of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, caused by a European strain of infectious pancreatic necrosis virus. *J Fish Dis* 2001.4:213–221.

Dorson, M. Kinkelin C. Torchy. Interferon synthesis in rainbow trout fry following infection with infectious pancreatic necrosis virus. *Fish Shellfish Immunol*. 2012. 2:311-313.

Enoe C. Jhonson W. Estimation of sensitivity and specificity of diagnostic tests and disease prevalence when the true disease state is unknown. *Prev Vet Med*, 2000. 45: 61–81.

Fenner FJ. Gibbs FA. Murphy R. Rott MJ. *Veterinary Virology*. Second Edition, Academic Press, United Kingdom 1999 39 – 66.

Fernandez-Carriel, MB; Estudio epidemiológico del virus de la necrosis pancreática infecciosa en salmones. Tipificación molecular de los distintos serotipos existentes en Chile. (Tesis de licenciatura) Valdivia, (Chile). Universidad Austral de Chile, 2005.

Instituto Nacional de Pesca. Tecnología del INAPESCA, garantiza reproducción de trucha. Publicado: 18 de Septiembre de 2010. Consultado: Noviembre de 2015. Disponible en URL. <http://www.inapesca.gob.mx/portal/sala-de-prensa/comunicados/89-tecnologia-del-inapesca-garantiza-reproduccion-de-trucha>

Hanington PC, Tam J, Katzenback BA, Hitchen SJ, Barreda DR, Belosevic M. Development of macrophages of cyprinid fish. *Dev Comp Immunol* 2009;33:411-429

Hansen JD, Landis ED, Phillips RB. Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 2005; 102:6919-6924

Hornbeck P. Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevack EM, Strober W. Enzyme-linked immunosorbent assay. *Protoc Immunol* 1991. 2.1.2-2.1.22

Imajoh M, Hirayama T, Oshima S. Frequent occurrence of apoptosis is not associated with pathogenic infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) during persistent infection. *Fish Shellfish Immunol* 2005.18: 163-177.

Kumagai I, Tsumoto K. 2010. Antigen-Antibody Binding, *Encyclopedia of life sciences*, Macmillan Publishers Ltd. Nature Publishing Group. www.els.net

Kimbrell DA, Beutler B. The evolution and genetics of innate immunity. *Nature Rev Genet* 2001; 2: 256-267.

Köllner B, Blohm U, Kotterba G, Fischer U. A monoclonal antibody recognising a surface marker on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) monocytes. *Fish Shellfish Immunol* 2001; 11:127-142.

Jima DD, Shah RN, Orcutt TM, Joshi D, Law JM, Litman GW. Enhanced transcription of complement and coagulation genes in the absence of adaptive immunity. *Mol Immunol* 2009; 46:1505-1516

Maclachlan N. J. y Dubovi E. J. *Fenner's Veterinary Virology*. Fourth Edition, Academic Press, United Kingdom. 2011; 102-122 y 293-198

Magnadottir B. Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol* 2016;20:137-151.

Magnadottir B, Lange S, Gudmundsdottir S, Bogwald J, Dalmo RA. Ontogeny of humoral immune parameters in fish. *Fish Shellfish Immunol* 2005; 19:429-439.

Mansilla A. Estudio de seguridad y potencia de una vacuna inyectable para la prevención de la Necrosis Pancreática Infecciosa (NPI) en salmones del Atlántico. Tesis M. V. 2002. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.

Martín R. Correa, Ana E. Arango, Jorge E. Estandarización de un método de ELISA para citomegalovirus humano. *Act Med Col* 1990.15: 180 – 186.

Manning MJ. Immune defence systems. In: Black KD, Pickering AD editors. *Biology of farmed fish*. Sheffield: Sheffield Academic Press; 1998: 180-221

McAllister PE, Bebak J. Infectious pancreatic necrosis virus in the environment: relationship to effluent from aquaculture facilities. *J Fish Dis*, 1997.20:201-207.

McAllister PE, Owens WJ RT. Detection of infectious pancreatic necrosis virus in pelleted cell and particulate components from ovarian fluid of brook trout. *Dis Aquat Organism*. 1997.2:235-237.

Milne S, Gallacher P, Cash P, Porter AJ. A reliable RT-PCR–ELISA method for the detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in farmed rainbow trout. *Journal of Virological Methods*, 2006, 132, 1-2: 92-96.

Moon, C.H: Comparison of the immunogenicity of recombinant VP2 and Vp3 of infectious pancreatic necrosis virus and marine Birnavirus, *Arch Virol* 2004.149:2059-2068.

Moore JD, Ototake M, Nakanishi T. Particulate antigen uptake during immersion immunisation of fish: The effectiveness of prolonged exposure and the roles of skin and gill. *Fish Shellfish Immunol* 1998;8:393-407

Mourton, B. Romestand, P. De Kinkelin, J. Jeffroy, R. Le Gouvello. Highly Sensitive Immunoassay for Direct Diagnosis of Viral Hemorrhagic Septicemia Which Uses Antinucleocapsid Monoclonal Antibodies. *J Clin Microbiol*.1992. 2338-2345.

Mulcahy D, Pascho RJ. Adsorption to fish sperm of vertically transmitted fish virus. *Science*, 1984.225:333-335.

Müller M. Estudio de seguridad y desarrollo de anticuerpos anti IPN de una vacuna commercial en salmon del Atlántico. Tesis, M. V. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile. 2001.

Nakanishi T, Ototake M. Antigen uptake and immune responses after immersion vaccination. *Dev Biol Stand* 1997; 90:59-68

Nakanishi T, Aoyagi K, Xia C, Dijkstra JM, Ototake M. Specific cell-mediated immunity in fish. *Vet Immunol Immunopathol* 2009; 72:101-109

OIE (2006): Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos. http://web.oie.int/esp/normes/fmanual/pdf_es/2.1.08_Necrosis_pancreatica_infecciosa.pdf. (3 de Junio de 2012).

OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) Código Sanitario para los Animales Acuáticos. 11^a ed. Organisation Mondiale de la Santé Animale. France. 2008.

Olsen I. Diffusion blotting for rapid production of multiple identical imprints from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis on a solid support. *J Immunol Met.* 2008. 220 (1 – 2): 77 – 84.

Ortega C., Enríquez R. Factores asociados a la infección celular por el virus de la necrosis pancreática infecciosa. *Revista Medicina Veterinaria.* 2007; 39: No.1.

Ortega SC, Montes de Oca R, Groman D, Yason C, Nicholson B, Blaks S. Case report viral infectious pancreatic necrosis in farmed rainbow trout from Mexico. *J Aquat Anim Health.* 2002; 4: 305-310.

Park C, Reno W. Characteristics of inhibition of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) by normal rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* serum. *Dis Aquat Org* 2005; 63: 43-52.

Powell DS. Immune system. In Ostrander GK (ed.). *The laboratory fish.* Academic Press 2000; p. 441-449.

Reno PW. Woo PT, Bruno DW. Infectious pancreatic necrosis and associated aquatic birnaviruses. *J Fish Dis.* 1999. 3: 1–55.

Rodak L. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in culture fluids and tissue homogenates of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. J Gen Virol 1998;11:225-235.

Rodríguez GM, Cortéz GA. Reseña histórica de la truiticultura en México El Zarco 50 años. UAM-X-CONAPESCA. Boletín PRONALSA y la Red de Diagnóstico.2003. 21:2-5.

Rodriguez S, Borrego J, Perez S. Infectious pancreatic necrosis virus: Biology Pathogenesis and Diagnostic methods. Adv Vir Res 2003; 63: 113-165.

Rodríguez S, Vilas M, Perez S. Study of a viral dual infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by seroneutralization, western blot and polymerase chain reaction assays. Microbiología. 2005, 11 (4): 461-470.

Rubio-Godoy M. Inmunología de los peces óseos. Revisión. Rev. Mex. Cienc. Pecu. 2010; 1 (1): 47 – 57.

Rubio-Godoy M, Sigh J, Buchmann K, Tinsley RC. Immunization of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* against *Discocotyle sagittata* (Monogenea). Dis Aquat Org 2003; 55:23- 30

SAGARPA. Anuario estadístico de acuicultura y pesca 2014. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. CONAPESCA. México

SAGARPA. Acuerdo mediante el cual se aprueba la actualización de la Carta Nacional Acuícola. 2012. P.70-73.

Sakai DK. Repertoire of complement in immunological defense mechanisms of fish. Annu Rev Fish Dis 2002;2:223-247

Salgado-Miranda C., Rojas-Anaya E. Garcia-Espinoza G. Loza-Rubio E. Molecular characterization of the VP2 gene of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) isolates from Mexico. *Journal Aquatic Animal Health*. 2014; 26:1, 43-51.

Salgado-Miranda C. Necrosis pancreática infecciosa: enfermedad emergente en la truiticultura de México. *Vet Méx* 2006. 37:467-477.

Santi, N. Infectious Pancreatic Necrosis Virus Vp5 Is Dispensable For Virulence And Persistence. *J Virol*. 2005 Vol. 79 14: 9206-9216.

Secombes CJ. The nonspecific immune system: cellular defenses. In: Iwama G, Nakanishi T editors. *The fish immune system: organism, pathogen and environment*. London: Academic Press Ltd.; 2006:63-103

Song H, Santi N, Evensen Q, Vakharia VN. Molecular determinants of infectious pancreatic necrosis virus virulence and cell culture adaptation. *J Virol* 2005; 79:10289-10299.

Sundh H, Calabrese S, Jutfelt F, Niklasson L, Olsen RF, Sundell K. Translocation of infectious pancreatic necrosis virus across the intestinal epithelium of atlantic salmon. *Aquaculture*. 2009. 321:85-92.

Sorum U. Effects of anaesthetization and vaccination on feed intake and growth in rainbow trout. *Abstracts Book*. 11th International Conference of the EAAP, Saint Julians, Malta. 2003.

Tapia D., Eissler Y., Torres P., Jorquera E, Espinoza JC, Kuznar J. Detection and phylogenetic análisis of infectious pancreatic necrosis virus in Chile. *Dis. Aquat. Org.*; 2015; 116: 173-184

Taksdal T, Stangelandl K, Dannevig B. Induction of infectious pancreatic necrosis (IPN) in Atlantic salmon *Salmo salar* and brook trout *Salvelinus fontinalis* by bath challenge of fry with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) serotype Sp. *Dis Aquat Organism* 1997.28:39-44.

Torres R, Modak B, Cardenas J. Inhibitory effect of aromatic geranyl derivatives isolated from *Heliotropium filifolium* on infectious pancreatic necrosis virus replication. *Vet Microbiol.* 2009; 24:141 (1 – 2), 53 – 58.

Utke K, Bergmann S, Lorenzen N, Kollner B, Ototake M, Fischer U. Cell-mediated cytotoxicity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, infected with viral haemorrhagic septicaemia virus. *Fish Shellfish Immunol* 2007;22:182-196

Villanueva RA, Galaz JL, Valdés JA, Jashés MM, Sandino AM. Genome assembly and particle maturation of the Birnavirus infectious pancreatic necrosis virus. *J Virol.* 2004. 78:13829-13838.

Werling D, Jungi TW. Toll-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet Immunol Immunopathol* 2003; 91: 1-12.

Wilson A, Goldberg T, Marcquenski S, Olson W, Goetz F, Hershberger P, Hart L, Toohey-Kurtha K. Development and Evaluation of a Blocking Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Virus Neutralization Assay To Detect Antibodies to Viral Hemorrhagic Septicemia Virus. *Clinic Vac Immunol.* 2014. 21-3.

Xu L, Miao L, Feng J, Jiansheng Y. Bivalent DNA vaccine induces significant immune responses against infectious hematopoietic necrosis virus and infectious pancreatic necrosis virus in rainbow trout. *Sci Rep.* 2017; 7: 5700.

Yano T. The nonspecific immune system: humoral defense. In: Iwama G, Nakanishi T editors. *The fish immune system: organism, pathogen and environment.* London: Academic Press Ltd.; 2006:106-159.

Zapata AG, Chibá A, Varas A. Cells and tissues of the immune system of fish. In Iwama. G. and Nakanishi, T. (eds.). *The fish immune system. Organism, pathogen and environment.* Academic Press 2006; p. 1-62.