

## DIAGNOSTICO DE AGENTES VIRALES

Lucio Galaviz Silva y Zinnia J. Molina Garza  
Facultad de Ciencias Biológicas

### Procedimiento general para cultivos celulares:

#### A) Control de calidad:

- 1.- Se deben usar las células susceptibles de aparición normal que se dividen rápidamente para todos los ensayos de virus.
- 2.- En trabajos de cultivo celulares de rutina se agrega penicilina (100 UI/ml) estreptomycin (100 mg/ml) ó gentamicina (100 mg/ml) y agentes antimicóticos (Micotrofin R. 25 mg/ml).

#### B) Controles

- 1.- El control positivo debe demostrar que las células son sensitivas a todos los virus de peces ensayados. La sensibilidad se define como la capacidad de las células para mostrar efecto citopático típico (ECP) cuando se exponen a la suspensión o cultivo del virus a niveles de  $10^2$  TCID<sub>50</sub>/ml ó su equivalente.
- 2.- Los controles no inoculados deben incubarse con cada ensayo. Estos deben permanecer libres de ECP durante el período de incubación.

#### C) Toma y manejo de muestras.

- 1.- En epizootias se requiere de al menos de 5 peces por estanque, para examinarse. Los peces deben estar recién muertos ó moribundos y exhibir los signos clínicos típicos
- 2.- El muestreo en peces asintomáticos debe hacerse de acuerdo a la siguiente tabla (basada en un nivel de confianza del 95%)

Tabla 1.- Según la prevalencia del patógeno el tamaño de la muestra se seleccionará de la siguiente manera: (a nivel de confianza de 95%)

Población	Prevalencia		
	2%	5%	10%
50	50	35	20
100	75	45	23
250	110	50	23
500	130	55	26
1000	140	55	27
1500	140	55	27
2000	145	60	27
4000	145	60	27
10000	145	60	27
100000	150	60	30
O MAS			

Tejidos que deberán procesarse de acuerdo al tipo de virus.-

Necrosis Hematopoyética Infecciosa (NHI)--Fluido ovario, riñón y bazo

Necrosis Pancreática Infecciosa (NPI) --Riñón y bazo

Septicemia Hemarugica Viral (SHV)--Riñón y bazo

*Herpes virus salmonis*--Riñón y bazo

3.- Examinar los tejidos con la siguiente metodología:

A) Alevines y saco vitelino: Procesar al alevin entero. Remueva el saco vitelino.

B) Peces de 4-6 cm de talla: procesar todas las vísceras

C) Mayores de 6 cm. Procesar bazo y riñón

D) Sementales: Procesa fluido ovario y una muestra de bazo y riñón

4.- No utilizar más de 5 peces para una prueba

5.- El fluido ovárico debe colectarse por separado de cada hembra.

6.- Inocular las muestras en las células antes de 48 horas, transportarlas sin congelar en un refrigerador o hielo

7.- A criterio del patólogo, a las muestras de tejido le puede agregar antibióticos o agentes antifungales a un pH de 7.0-7.8, pero no en el fluido ovarico.

8.- Mantener las muestras abajo de los 15°C mientras se procesan y al homogenizarlas no emplear sonificadores.

9.- Suspender las muestras en medio de cultivo tisulares con antibióticos (pH 7.0-7.8) y centrifugar a 2,000 x g por 10 min. Tratarlas para retardar los contaminantes microbianos. Otra alternativa, filtrar es sobrenadante con filtro-membrana de 0.45 um.

10.- La dilución no debe de exceder 1:100 antes de inocular la muestra de tejido en el cultivo (v/v). La dilución de muestra de fluido ovarico no debe exceder de 1:5 (v/v).

11.- Los cultivos celulares deben incubarse por un minimo de 14 dias, pero se recomienda hasta el día 21. La temperatura de incubación para NHI, NPI o SHV es de 15°C y para *Herpes virus* de 10-15 °C. El pH durante la incubación será de 7.0-7.8, para el virus de la SHV de 7.4-7.8.

El virus de NPI se debe cultivar en un sistema de cultivo celular de embrion de salmón Chinook (CHSE-214), o alevin de agallas azules (BF-2) ó gonadas de trucha arco iris (RTG-2), (cultivos citados de mayor a menor sensibilidad). El virus de la NHI en epitelioma de ciprinidos (EPC), fathead minnow (FHM) ó CHSE-214. El virus de la SHV en EPC, FHM, CHSE-214 ó RTG-2, El de *Herpes virus* en RTG-2 ó CHSE-214.

12.- La aparición de EPC (Efecto citopático) en el sistema necesita identificarse por neutralización sérica ó evaluación por subcultivos. Esta dilución no debe ser menor de 1:10 v/v ó más grande de 1:1000 v/v.

D.- Identificación del virus por sero-neutralización.

1.- Los cultivos celulares que presenten ECP se seleccionan y se diluye el fluido de estos a 1:1000 y 1:100,000.

2.- Diluir el suero control (no contiene anticuerpos contra el virus) y el antisuero específico (contiene anticuerpos contra ciertos patógenos) adecuadamente en buffer salino a pH 7.0-7.8.

3.- Mezclar proporciones iguales del fluido del cultivo celular diluido (en el paso 1) y diluya también el antisuero del paso 2.

4.- Mezcle proporciones iguales del fluido del cultivo celular (Paso 1 y 2).

5.- Repita el paso 3 y 4, pero use el virus de referencia (suspensión con 500TCID<sub>50</sub> por ml) en lugar del fluido diluido del virus del cultivo sospechoso del paso 1.

6.- Incube por 60 min, agite cada tubo a intervalos de 15 min.

7.- Inocule una cantidad apropiada en el cultivo celular seleccionado por duplicado. Se debe usar la misma linea celular del aislamiento primario en la prueba de neutralización.

8.- Incube por 2-12 dias a la misma temperatura usada en el aislamiento primario.

9.- La aparición del ECP en el cultivo inoculado con la mezcla suero-antivirus control, pero no en el cultivo inoculado con la mezcla antisuero-virus, identifica al agente relacionado con el virus usado para la producción del antisuero.

10.- Si el antisuero no neutraliza o disminuye la infectividad, la prueba debe repetirse con antisueros contra otro virus. Sin ningún antisuero neutraliza la infectividad, debe sospecharse de una mezcla de infección viral o toxicidad severa de la muestra ó bien, la presencia de un nuevo agente.

### Necrosis pancreática infecciosa

Agente etiológico: Virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI).<sup>1</sup>

Distribución geográfica: Norteamérica, Europa, Japón, Corea, Taiwan y Chile.

Hospederos: *Salvelinus fontinalis*, trucha café (*Salmo trutta*), trucha arcoiris (*S. gairdneri*), *S. clarkii*, *Salvelinus namaycush*, *S. salar*, *Oncorhynchus tshawytscha*, *O. kisutch* y *Salvelinus alpinus*.

Signos clínicos de significancia diagnóstica: La necrosis pancreática infecciosa es una enfermedad aguda que causa mortalidad de alevines, y ocasionalmente en adultos de truchay salmon., primero son afectados los alevines. Las victimas nadan alrededor de su axis longitudinal. La conducta agonizante se manifiesta por inmovilidad, durante la cual las victimas se sumergen al fondo y respiran débilmente. Como último síntoma se enroscan y mueren en una o dos horas. Los signos incluyen obscurecimiento, exoftalmia, distensión abdominal y algunas veces hemorragias en el vientre y base de las aletas. En el área pilórica, el estómago aparece en forma blanquecina con mucus lechoso que abarca el anterior del intestino.

Diagnóstico: La presencia del CPE típico en células de cultivo es el diagnóstico presuntivo, pero este debe apoyarse con un exámen histológico donde se evidencie necrosis pancreática pronunciada de tejido, junto a la necrosis del tejido adiposo. La confirmación requiere del

aislamiento e identificación del VNPI por medio de seroneutralización. El Birnavirus del salmón presenta tres distintos tipos serológicos (VR299, Ab y Sp), por lo cual se requiere del antisuero con el serotipo específico para confirmar la prueba de seroneutralización. El diagnóstico se considera satisfactorio si se examinan 10 peces como mínimo que presenten los signos de la enfermedad.

#### Septicemia hemorrágica viral;

**Agente etiológico:** Virus Egtved. La septicemia hemorrágica viral (SHV) es una infección sistémica de truchas, causada por un rhabdovirus. También se conoce como infección e inflamación del riñón y degeneración hepática (INuL).

**Distribución geográfica y hospederos:** Trucha arcoiris, trucha café, salmón del atlántico e híbridos del género *Onchorhynchus*.

**Signos clínicos e histopatológicos:** Algunos peces muestran sintomatología severa y otros parecen normales. Ningún signo clínico o histopatológico puede utilizarse para distinguir esta enfermedad de otras. La SHV puede presentarse en todas las edades, pero los sobrevivientes de la infección se comportan como portadores del virus. Externamente, el pez presenta exoftalmia, distensión abdominal, pigmentación oscura, anemia y hemorragias en los ojos, pies, agallas y en la base de las aletas. El mesenterio presenta hemorragia difusa mientras que el riñón e hígado aparecen hiperémicos, hinchados, decolorados y con hemorragias en el músculo esquelético. El tejido hematopoyético son el foco inicial.

**Diagnóstico de infecciones asintomáticas:** La regulación de los Estados Unidos (Code of Federal Regulations, Title 50) requiere que los salmonidos y los huevos de salmonidos importados se certifiquen libres del virus debido a que no pueden utilizarse los signos clínicos o histopatológicos. Se requiere el examen virológico para certificar que los salmonidos están libres de virus por sero neutralización. Si el pez va a exportarse a los E.U.A. el ensayo se debe realizar 6 semanas antes de la importación. El tamaño de muestra acepta una incidencia mínima de infección del 2% a un nivel de confianza del 95%. El manejo y el proceso de los especímenes debe realizarse en un medio de cultivo tisular buferado a pH de 7.4-7.8.

**Examen Virológico:** Para este se emplea un cultivo celular monocapa CHSE-214, EPC, FHM ó RTG-2. El cultivo celular debe estar del 80-90% confluyente y con no más de 72 horas de edad después de cultivarse. El inóculo se calcula a razón de 0.1ml de la muestra diluida por 10cm<sup>2</sup> de campo celular. Por cada muestra se recomienda inocular 10cm<sup>2</sup> como mínimo e incubarse a 15°C por 60 minutos para permitir la absorción de virus. Las observaciones deben prolongarse durante 14 días o hasta que el efecto citopático sea evidente.

#### Necrosis hematopoyética infecciosa:

**Agente etiológico:** Virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (VNHI). La enfermedad se conoce también como enfermedad del salmón del río Sacramento.

**Distribución geográfica y hospederos:** Costa del pacífico de Norteamérica, desde California hasta Alaska e Idaho. Los focos de epizootias se han detectado en Minnesota, Idaho, Virginia, Colorado y Montana.

**Hospederos:** Trucha Arcoiris, *Oncorhynchus nerka*, *S. clarkii* y Salmón del atlántico.

**Signos clínicos:** Típicamente los peces enfermos muestran exoftalmia, anemia, hemorragia en los músculos del cuerpo, mandíbula inferior y base de las agallas. También hinchazón abdominal con ascitis y lordosis en los sobrevivientes. En el tejido adiposo se presentan hemorragias petequiales de la cavidad visceral músculos y mesenterio, el riñón y el hígado aparece hematoso y pálido. Es común observar hemorragias subdermicas posteriores al craneo.

**Diagnóstico:** Para identificación presuntiva se usa el aislamiento del virus en cultivo celulares con desarrollo de citopatología típica. Los medios EPC, CHSE-214 o FHM son los que se recomiendan por su mayor sensibilidad. Estos se incuban entre 15-18°C durante 14 días. Se recomienda hacer un pasaje ciego cuando no se encuentran muestras positivas en un lote donde se sospeche la presencia del virus.

La necrosis típica del tejido hematopoyético en riñón y bazo y la necrosis de células granulares en la lámina propia deben utilizarse como métodos de identificación presuntiva así como los signos clínicos mencionados. El examen de frotis sanguíneos e improntas del riñón muestran comúnmente cambios hematopatológicos. El diagnóstico confirmatorio se realiza aislando el virus por neutralización con un antisuero NHI-específico y asociándolo con la histopatología típica.

#### Enfermedad de Herpes Virus de Salmonidos:

**Agente etiológico:** Herpesvirus salmonis (VHP).

**Distribución geográfica y hospederos:** E.U.A y Japón. Se ha reportado en la trucha arcoiris *Onchorhynchus nerka*, *Salmo salar*, *Salvelinus fontinalis*, *Salmo trutta*.

**Signos Clínicos:** La mayoría de los alevines infectados presentan letargia, pero en el estado terminal de la enfermedad, muestran nado errático e hiperactividad. Los signos incluyen oscurecimiento anormal y exoftalmia extrema. Hemorragia en la órbita de los ojos, distensión abdominal y agallas pálidas. El fluido ascítico es abundante y también el hígado, bazo y tracto digestivo presentan flacidez, mientras que el riñón se observa de aspecto pálido.

**Diagnóstico:** Debe presentarse efecto citopático en los cultivos RTG-2 y CHSE-214 a 10-12°C. El EPC consiste en picnosis y fusión celular (sincitial). También se forman células gigantes multinucleadas e inclusiones atípicas Cowdry tipo A la sangre de especímenes infectados contiene gran número de eritrocitos y leucocitos inmaduros. El tejido hematopoyético renal se hipertrofia mientras que los túbulos renales se llenan de material seroso. El tejido hepático muestra área de necrosis, pero la necrosis pancreática nunca es tan severa como extensiva en comparación de ésta.

#### NOTA:

Actualmente existen en el mercado estuches para la detección del VNPI, (bio-perox NPI), VNI (Bio-Fluo-NHI) y para el VSHV (Bio-perox SHV), los cuales incluyen soluciones de lavado y fijación; anticuerpos monoclonales específicos para cada virus, conjugado anti-inmunoglobulina de ratón con la peroxidasa, cromógeno y buffer con sustrato de peroxidasa, los cuales se utilizan para el diagnóstico *in vitro*, y se producen por la compañía BIOX (Dirección: 30 Hoogveldiaan, 1700 Dilbeek, Bélgica, Fax: (32-2) 4102886.

## Referencias

- Amos, K.H. 1985. Procedures for the detection and identification of certain fish pathogens. Fish Health Section American Fisheries Society. 3º edi. pp. 5-31.
- Amend, D. & T. McDowell. 1984. Comparison of various procedures to detect neutralizing antibody to the channel catfish virus in California brood channelk catfish. The Progressive Fish-Culturist. 1: 6-12.
- Plumb, J. A. 1971. Tissue distribution of channel catfish virus. Journal of Wildlife Disease. 7: 213-216.
- Small, D.A. 1982. Viral erythrocytic necrosis in fish: a review. Proceeding of the Royal Society of Edinburg. 81B: 169-176.
- Wolf, K. T. 1975. Salmonids viruses: effects of Herpesvirus salmonis in rainbow trout. Fish Health News. 4: 8.

## ENFERMEDADES CAUSADAS POR BACTERIAS

Ma. Hilda Garza Fernández, Fernando Jiménez Guzman y  
Lucrecia González Carranza  
Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L.

Las bacterias son organismos microscópicos que atacan a los peces cuando éstos se encuentran bajo condiciones de "stress". Las lesiones generalmente son provocadas por bacilos Gram negativos, Gram positivos o por ácido alcohol resistentes y éstas pueden ocurrir en órganos internos, músculos, piel, branquias o aletas.

Las bacterias presentes en los peces crecen en medios de cultivo con un rango de pH entre 6 y 9, en ocasiones es necesario agregar al medio de cultivo cloruro de sodio. Son aerobias o anaerobias facultativas y pueden crecer entre 20 y 30°C.

Para lograr el diagnóstico de una enfermedad es necesario primeramente aislar el agente causal, para posteriormente identificarlo mediante su morfología, afinidad a los colorantes y pruebas bioquímicas. Así mismo, una vez que por inoculaciones experimentales se demuestre la patogenicidad de las bacterias, es recomendable determinar su susceptibilidad a los antimicrobianos para lograr una terapéutica adecuada.

### VIBRIOSIS

#### Agente Causal

Una de las enfermedades más comunes en trucha es la vibriosis, cuyo agente causal es el *Vibrio anguillarum* o *V. ordalii*, han sido asociados con ellos el *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus*.

#### Signos Clínicos

Las truchas presentan lesiones hemorrágicas y necróticas en la musculatura abdominal, exoftalmia y eritema en la base de las aletas. Internamente presentan zonas hemorrágicas en la cavidad peritoneal. En las formas agudas de la enfermedad, el pez muere sin presentar síntomas externos.

*Vibrio anguillarum* ha sido aislado de riñón, bazo, branquias, tejido muscular, tracto gastrointestinal y sangre y *V. ordalii* tiende a formar microcolonias en corazón, branquias y en músculos. Los peces moribundos presentan anemia y hay una leucopenia marcada y pérdida de electrolitos. Si se realizan cortes histológicos es evidente la destrucción del tejido.

#### Diagnóstico

El diagnóstico de vibriosis se logra por sintomatología, observación de las lesiones, así como con el aislamiento e identificación del agente causal. El aislamiento de la bacteria se obtiene mediante siembra de muestras colectadas de las lesiones en placas Petri con agar soya tripticosa y agar infusión cerebro corazón adicionado de cloruro de sodio e incubados aeróbicamente a 20-25°C durante 72 horas. Los vibrios aislados de especies marinas son