



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS DE LA NECROSIS
PANCREÁTICA INFECCIOSA POR MEDIO DE PCR
ANIDADA”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

DANIELA GÓMEZ SANTANA

ASESORA:

Dra. en C. CELENE SALGADO MIRANDA

CO-ASESORA:

Dra. en C. CARLA GARCÍA MORALES



TOLUCA, MÉXICO, JUNIO 2022.

FINANCIAMIENTO

La presente tesis forma parte del proyecto “Serotificación y virulencia de aislados mexicanos del virus de la necrosis pancreática infecciosa”, financiado por CONACYT, CB-257781, con registro interno 4226/2016C. Responsable técnico Dra. en C. Celene Salgado Miranda.

ÍNDICE

FINANCIAMIENTO	1
ÍNDICE	2
ÍNDICE DE CUADROS	4
ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE GRÁFICOS	6
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	9
MARCO TEÓRICO	12
1. Características del virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI)	12
1.1 Estructura viral	12
1.2 Genoma del virus	13
1.3 Proteínas virales	14
1.4 Replicación del VNPI	15
1.5 Caracterización de los aislamientos del VNPI	16
1.5.1 Clasificación serológica	17
1.5.2 Clasificación genotípica	18
2. Características de la necrosis pancreática infecciosa (NPI)	21
2.1 Vías de entrada, transmisión y vías de salida	21
2.2 Signos clínicos y órganos diana	22
2.3 Morbilidad y mortalidad	23
3. Producción de trucha arcoiris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) en México	23
4. Métodos de diagnóstico para el VNPI	26
4.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	27
4.1.1 PCR y RT-PCR Punto final	29
4.1.2 PCR en tiempo real (qPCR) y RT-qPCR	29
4.1.3 PCR anidada (PCRa) y RT-PCR anidada (RT-PCRa)	30
ANTECEDENTES	32
JUSTIFICACIÓN	34

HIPÓTESIS	35
OBJETIVOS	36
MATERIAL Y MÉTODO	37
1. Aislamientos virales	37
2. Cultivo celular y replicación viral	37
3. Determinación del título viral	37
4. Organismos de trucha arcoíris	38
5. Infección experimental de crías de trucha arcoíris con los aislamientos del VNPI	38
6. Eutanasia y necropsia de organismos experimentales	39
7. Extracción de ARN	39
8. ADNc	39
9. PCR anidada	40
10. Análisis de resultados	40
RESULTADOS	42
DISCUSIÓN	49
CONCLUSIONES	53
PERSPECTIVAS	54
REFERENCIAS	55
ANEXO 1	63
ANEXO 2	64
ANEXO 3	65
ANEXO 4	66

ÍNDICE DE CUADROS

<u>Cuadro 1.</u> Clasificación serológica del VNPI propuesta por Hill & Way en 1995.	17
<u>Cuadro 2.</u> Procedimiento básico de una PCR.....	28
<u>Cuadro 3.</u> Datos con los que se realizó los cálculos de sensibilidad y especificidad de la PCRa.....	41
<u>Cuadro 4.</u> Gradiente de temperatura para los oligonucleótidos	43
<u>Cuadro 5.</u> Etapas de la estandarización de la PCRa para la detección del VNPI.....	43
<u>Cuadro 6.</u> Identificación del VNPI por medio de PCRa.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

<u>Figura 1.</u> Diagrama de un birnavirus.....	13
<u>Figura 2.</u> Mapa genómico del VNPI.....	15
<u>Figura 3.</u> Genogrupos del VNPI.....	20
<u>Figura 4.</u> Cría de trucha arcoíris infectada experimentalmente con VNPI.....	22
<u>Figura 5.</u> Esquema general de una PCR anidada.....	31
<u>Figura 6.</u> Muestras de órganos, grupos de infección (día 2 posterior a la infección).....	45
<u>Figura 7.</u> Muestras de órganos, grupos de infección (día 4 posterior a la infección).....	46
<u>Figura 8.</u> Muestras de órganos, grupos de infección (día 6 posterior a la infección).....	47

ÍNDICE DE GRÁFICOS

[Gráfico 1.](#) Serie histórica de la producción de trucha arcoíris en México.....25

RESUMEN

El procedimiento diagnóstico para la identificación del virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI) a partir de peces sin signos clínicos, con base en el Manual de Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos, editado por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) son: el aislamiento viral en cultivo celular, seguido de inmunoensayos (inmunofluorescencia indirecta, seroneutralización y ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas). Sin embargo, el protocolo indicado por la OIE para dar una muestra negativa por medio de cultivo celular requiere de al menos 21 días, lo que resulta costoso y demorado. Para reducir tiempo en el diagnóstico, se estandarizó una PCR anidada (PCRa) utilizando dos pares de oligonucleótidos iniciales: INFE1+ e INFE1- en muestras de peces infectados. A partir de la prueba diagnóstica estandarizada, el valor de las características intrínsecas para sensibilidad fue de 66% al incluir los días 2, 4 y 6 posterior a la infección, mientras que la sensibilidad a partir del día 4 posterior a la infección fue de 100%. La especificidad obtenida fue del 100%. Con base en los resultados, la técnica de PCRa puede implementarse para la detección del VNPI, en menor tiempo que las técnicas recomendadas por la OIE, a partir de los serotipos antigénicos ampliamente diseminados en el mundo (A1 y A2).

Palabras clave: virus de la necrosis pancreática infecciosa, trucha arcoíris, PCRa, México, A1, A2.

ABSTRACT

The diagnostic procedures for the identification of the infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) from fish without clinical signs, based on the Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals, edited by World Organization for Animal Health (OIE) are viral isolation in cell culture, followed by immunoassays (indirect immunofluorescence, seroneutralización and enzyme-linked immunosorbent assay). However, the indicated OIE protocol to give a negative result takes at least 21 days, which may result in high costs and time. To increase the speed at which results may be revealed, a nested PCR (nPCR) was standardized by using two initial oligonucleotide pairs: INFE1+ and INFE1- in samples from infected fish. From the standardized diagnostic test, the value of the intrinsic characteristics for sensitivity was 66% when including days 2, 4 and 6 post-infection, while the sensitivity from day 4 post-infection was 100%. The specificity obtained was 100%. Based on these results, the nPCR technique can be implemented for the detection of INPV, in less time than the techniques recommended by the OIE, from the antigenic serotypes widely disseminated in the world (A1 and A2).

Key words: infectious pancreatic necrosis virus, rainbow trout, nPCR, Mexico, A1, A2.

INTRODUCCIÓN

El virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI) pertenece a la familia *Birnaviridae*, género *Aquabirnavirus*. Es un virus sin envoltura, llega a medir 70 nanómetros de diámetro y tiene forma de icosaedro (Dobos, 1996). El VNPI es el agente causal de la enfermedad denominada necrosis pancreática infecciosa (NPI) caracterizada por una mortalidad de hasta el 90% en crías jóvenes de salmónidos (Munro & Midtlyng, 2011). La enfermedad también afecta a varias especies de peces de agua continental y salobre, así como a crustáceos y moluscos (Rodríguez *et al.*, 2003).

El genoma del VNPI consiste en dos segmentos de doble cadena de ARN (ARNdc): segmento A y B. El segmento A codifica para cuatro proteínas: la VP2, principal proteína externa de la cápside, VP3 proteína interna de la cápside, VP4 proteasa viral y VP5 proteína presente en células infectadas que se sintetiza en pequeñas cantidades en la fase inicial de la replicación viral. A la VP5, se le atribuye una función antiapoptótica (Dobos, 2001; Rodríguez *et al.*, 2003). El segmento B, contiene al gen que codifica para la VP1, la cual corresponde a la polimerasa del virión (Duncan *et al.*, 1991). El VNPI se caracteriza por su gran variabilidad antigénica y genotípica (Heppell *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1996). Por medio de la prueba de seroneutralización, el VNPI se ha clasificado en dos serogrupos A y B. El serogrupo A tiene nueve serotipos (A1 al A9) y el serogrupo B sólo uno (B1). Algunos serotipos predominan en regiones geográficas específicas: el serotipo A1 destaca en los Estados Unidos de América (EUA), los serotipos A6, A7, A8 y A9 predominan en Canadá y los serotipos A2 y A3 están ampliamente distribuidos en Europa (Hill & Way, 1995). En México, el primer caso de la NPI se reportó en el 2000 a partir de crías de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) importadas de los EUA (Ortega *et al.*, 2002). Posteriormente, en el 2009, se identificó una prevalencia nacional del 11.9% y una diseminación en el 62.5% en las principales entidades trutícolas nacionales (Salgado-Miranda *et al.*, 2009).

La NPI tiene una distribución mundial y la mortalidad en peces es inversamente proporcional a la edad del pez, por lo que las crías y juveniles de trucha arcoíris son más susceptibles a la enfermedad. Los peces adultos infectados pueden sobrevivir a la enfermedad, pero son portadores del virus y lo eliminan toda su vida por medio de heces, orina y fluidos reproductivos. Debido a esto, la diseminación del VNPI puede ser amplia, constante y permanente en las granjas, lo que dificulta el manejo reproductivo en las granjas acuícolas. La enfermedad provoca grandes pérdidas económicas en la producción de trucha arcoíris. En los peces enfermos se observa principalmente distensión abdominal, nado errático y oscurecimiento de piel. En la necropsia, los ciegos pilóricos y el tejido adiposo anterior presentan petequias. El bazo, el corazón, el hígado y el riñón pueden estar pálidos (Rodríguez *et al.*, 2003).

La producción nacional de la trucha arcoíris se realiza principalmente en 9 entidades federativas: Estado de México, Puebla, Tamaulipas, Veracruz, Michoacán, Chihuahua, Hidalgo, Durango y Nayarit. El Estado de México, se ha destacado por varias décadas como el primer productor de trucha arcoíris del país. Por su volumen, la trucha se encuentra posicionada en el lugar 21 de la producción pesquera nacional. Sin embargo, por su valor ocupa el lugar 10 (SAGARPA, 2018).

Con base en la última vez que la NPI estuvo en el Manual de Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos, publicado por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), las técnicas diagnósticas recomendadas para la identificación del VNPI a partir de peces sin signos clínicos, son el aislamiento viral en líneas celulares de peces (BF-2 y CHSE-214), seguido de la identificación inmunológica mediante pruebas de inmunofluorescencia indirecta, seroneutralización y ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA). El diagnóstico a partir de peces enfermos inicia con la histología o demostración inmunológica del VNPI en los tejidos infectados, confirmado posteriormente con el aislamiento viral y la identificación inmunológica en cultivo celular (OIE, 2006). Sin embargo, el protocolo indicado por la OIE para dar una muestra negativa por medio de cultivo celular debe pasar por un cultivo (7 días) y por dos subcultivos (14 días)

(OIE, 2006). A la fecha, varios estudios (López-Lastra *et al.*, 1994; Blake *et al.*, 1995; Rodríguez *et al.*, 2001; Barrera-Mejía *et al.*, 2009) han validado la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) para identificar el VNPI en menor tiempo que las técnicas antes mencionadas. Una variante de la técnica de PCR es la PCR anidada (PCRa). La PCRa, ha demostrado ser una técnica de detección rápida y sensible para el VNPI (Rimstad *et al.*, 1990). Esta técnica aumenta la sensibilidad y especificidad, por medio de dos pares de oligonucleótidos y dos reacciones de PCR sucesivas (Carr *et al.*, 2010). La PCRa, puede llegar a detectar hasta una milbillonésima parte de un gramo (1 femtogramo) del genoma viral de los birnavirus marinos (Suzuki *et al.*, 1997) en comparación con la PCR convencional (o punto final), que llega a detectar hasta 15 femtogramos o 10 picogramos del genoma viral (López-Lastra *et al.*, 1994; Rimstand *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1997). También, la PCRa resulta ser eficiente y sensible al amplificar material genético del VNPI para su posterior secuenciación, a partir de tejidos, incluso de muestras de riñón y bazo de salmónidos, en las que no se puede aislar el virus por medio de cultivo celular (Torres *et al.*, 2016). Con el fin de contar con una técnica diagnóstica para identificar el VNPI en menor tiempo y con alta sensibilidad, se estandarizará una PCR anidada.

MARCO TEÓRICO

1. Características del virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI)

1.1 Estructura viral

Los birnavirus, pertenecientes a la familia *Birnaviridae*, presentan un genoma de dos segmentos de doble cadena de ARN (ARNdc). Esta familia presenta cuatro géneros: *Aquabirnavirus*, *Avibirnavirus*, *Blosnavirus* y *Entomobirnavirus* (Delmas, 2019).

El virus de la necrosis pancreática infecciosa pertenece al género *Aquabirnavirus*. Como el nombre del género indica, este virus está presente en organismos acuáticos (prefijo *aqua-* del latín para agua). Asimismo, presenta un genoma de dos segmentos (prefijo *bi-* del latín para doble o dos) de doble cadena de ARN (ácido ribonucleico) (Dobos, 2001).

El VNPI no tiene envoltura, llega a medir hasta 70 nanómetros de diámetro y tiene forma de icosaedro (Dobos, 1996). Su cápside está compuesta principalmente por la VP2, siendo esta proteína la más abundante en el virión, constituyendo entre el 50-70% de la cápside. La estructura interna de la cápside está compuesta primordialmente por VP3, abarcando desde el 20-40% de la cápside (Dobos, 2001). Otro componente estructural del virión es la VP1, polimerasa de ARN dependiente de ARN. Puede encontrarse de manera libre o vinculada al genoma (VPg), donde se une un residuo de serina de la VPg al extremo 5' de cada hebra de ARN genómico por un enlace fosfodiéster (**Figura 1**). Esta proteína constituye entre el 3-5% del virión (Dobos, 2001).

El genoma está dividido en dos segmentos A y B, ambos conformados por ARN de doble cadena (ARNdc), representa el 7-10% del peso total de la partícula (Dobos, 2001; Rodríguez, *et al.*, 2003).

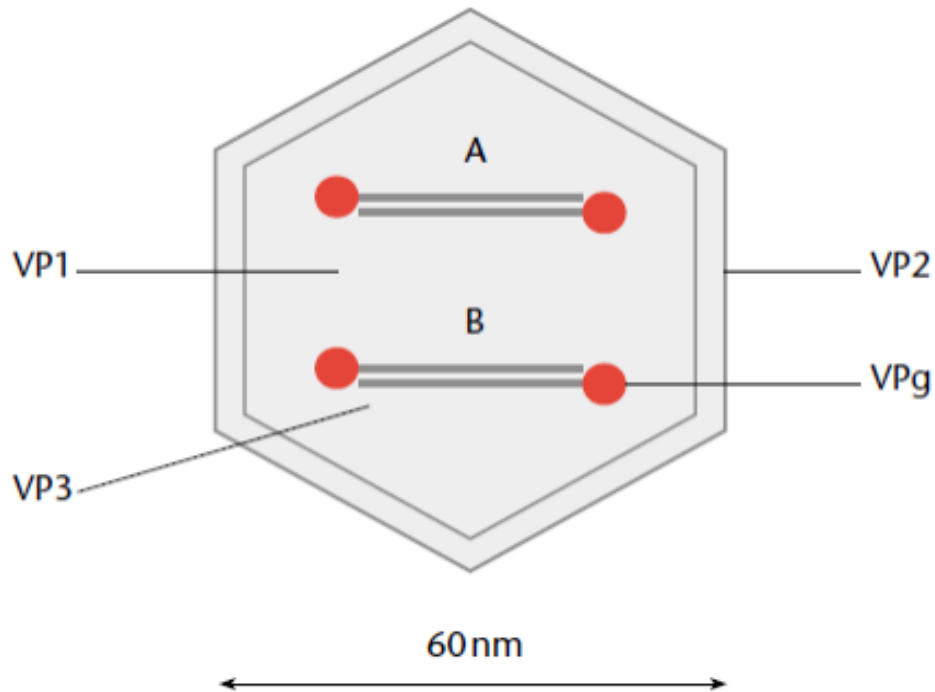


Figura 1. Diagrama de un birnavirus. Los segmentos del genoma están señalados por A y B. **VPg**, polimerasa de ARN dependiente de ARN vinculada al genoma. **VP1**: proteína viral 1, se representa de manera libre. **VP2**: proteína viral 2, conforma la estructura externa de la cápside. **VP3**: proteína viral 3, conforma la estructura interna de la cápside. **VPg**: proteína viral del genoma, se encuentra de manera libre o anclada a VP1, en la figura se representa anclada a VP1. Tomado de Dobos (2001).

1.2 Genoma del virus

El genoma consiste en dos segmentos, A y B, de doble cadena de ARN. El segmento A tiene un peso de 2.5×10^6 dáltones, mientras que el segmento B llega a pesar hasta 2.3×10^6 dáltones (Dobos, 1996; Rodríguez, *et al.*, 2003). La longitud del segmento A más grande secuenciado y reportado para los VNPI corresponde a la cepa Jasper, con un tamaño aproximado de 3092 pares de bases (pb). Por otra

parte, el segmento B es de aproximadamente 2784 pb (Dobos, 2001). El contenido de guanina-citosina aproximado en cada segmento es aproximadamente del 54%, por lo que su temperatura de desnaturalización es de +/- 89 °C (Dobos, 1996; Rodríguez, *et al.*, 2003).

La organización del genoma se muestra en la **Figura 2**. El segmento A contiene dos marcos abiertos de lectura (ORFs, del inglés *Open Reading Frame*): ORF 1, marco de lectura sobrepuesto al segundo, que codifica para una proteína pequeña denominada como VP5; ORF 2 codifica para una poliproteína (PP) (NH₂-pVP2-VP4 o NS-VP3-COOH) de aproximadamente 106-kDa, la cual contiene el precursor de VP2 (pVP2), VP4 o NS correspondiente a una proteasa no estructural, y VP3. Por otro lado, el segmento B cuenta con un solo ORF que codifica para una sola proteína, VP1, polimerasa de ARN dependiente de ARN, de 94-kDa (Dobos, 1996).

Ambos segmentos del genoma presentan regiones no codificantes. Se considera que estas regiones son importantes para el reconocimiento de la polimerasa, inicio de la traducción y un posible empaquetamiento del genoma (Dobos, 1996).

1.3 Proteínas virales

Dentro de la familia *Birnaviridae*, todas las cepas contienen al menos cuatro polipéptidos. De manera general para el VNPI, las proteínas del virión son: VP1 (94 kDa), la cual es la polimerasa de ARN dependiente de ARN, se puede encontrar de manera libre (VP1) o anclada al genoma (VPg); precursor de VP2 o pre-VP2 (pVP2 62 kDa) y su forma más abundante VP2 (54 kDa), principal componente de la cápside del virión; VP3 (30 kDa), la proteína estructural interna de la cápside; VP4, proteasa viral; y VP5, proteína presente en células infectadas que se sintetiza en

pequeñas cantidades en la fase inicial de la replicación viral. Se le atribuye una función antiapoptótica (Dobos, 2001; Rodríguez, *et al.*, 2003) (Figuras 1 y 2).

1.4 Replicación del VNPI

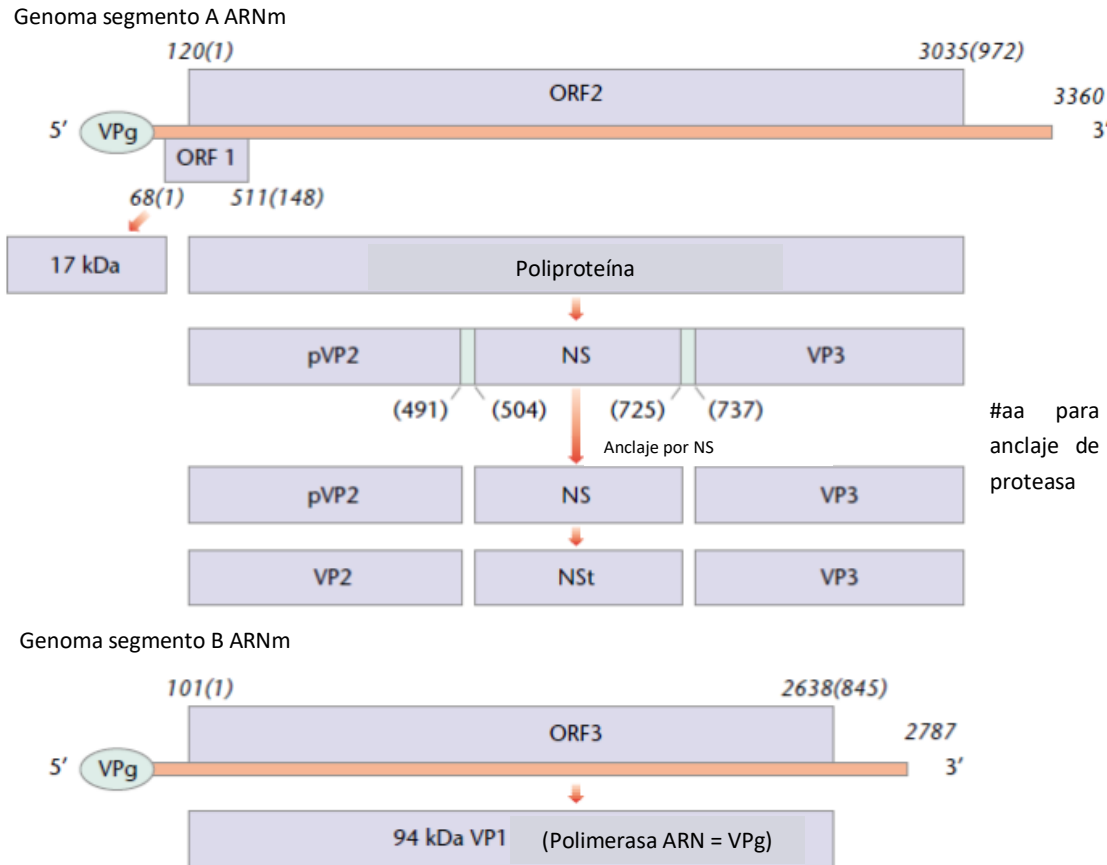


Figura 2. Mapa genómico del VNPI. Las barras representan secuencias codificantes como marcos abiertos de lectura (ORFs) en la cadena positiva de ARNm. Los números sobre cada segmento de ARN indican el número de nucleótido. Números en paréntesis se refieren al número de aminoácido (aa) dentro de ORFs. VPg en el extremo 5' de cada ARN denota la proteína unida al genoma. Las áreas sombreadas entre pVP2/NS y NS/VP3 indican el sitio del anclaje proteolítico. NS, proteasa no estructural; VP, proteína del virión. Tomado de Dobos (2001).

Los viriones de la familia *Birnaviridae* pueden replicarse experimentalmente dentro de laboratorios en líneas celulares específicas, incluyendo el VNPI. El virión se replica dentro de varias líneas celulares de peces a una temperatura menor de 24 °C, siendo la temperatura óptima entre 18 a 20 °C. En las líneas celulares, el ciclo de replicación completo se lleva a cabo entre 16 a 22 horas (Dobos, 2001; Dopazo, 2020).

Al ser la proteína externa de la cápside, VP2 es la proteína de unión celular del virus. Sin embargo, los receptores en las células hospederas no han sido identificados. La unión viral tiene una duración de entre 1 a 2 horas. En cuanto el virión entra (por endocitosis), la VP1 se activa, por lo que produce ARN mensajero (ARNm) de cada una de las hebras del genoma del VNPI. El transcrito se realiza de manera semiconservativa y por desplazamiento de hebra (Dobos, 2001).

Después de 6-9 horas post infección (h p.i.), la síntesis de proteínas alcanza su punto máximo, pasado este tiempo la síntesis de las mismas decrece. A continuación, la poliproteína sufre un cambio conformacional rápido, gracias a la actividad proteasa de NS o VP4, generando pVP2, NS libre y VP3. Posteriormente, pVP2 sufre cambios conformacionales para producir VP2 (**Figura 2**). Hay poca información sobre el ensamble de los birnavirus. Los viriones completos se acumulan en el citoplasma de la célula hospedera, hasta generar una lisis celular (Dobos, 2001).

1.5 Caracterización de los aislamientos del VNPI

El VNPI se caracteriza por su gran variabilidad antigénica y genotípica (Heppell *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1996). La heterogenicidad antigénica tiene base molecular, los epítomos de neutralización variables y conservados se localizan en la proteína VP2 (Christie *et al.*, 1990; Frost *et al.*, 1995).

Actualmente existen dos tipos de clasificaciones del VNPI: una es la clasificación serológica actual realizada a partir de ensayos de neutralización con anticuerpos propuesta por Hill & Way (1995), y la otra es la división en siete genogrupos a partir de secuencias del genoma (Barrera-Mejía, *et al.*, 2011; Blake *et al.*, 2001; Nishizawa *et al.*, 2005; Salgado-Miranda *et al.*, 2014).

1.5.1 Clasificación serológica

El primer agrupamiento de aislamientos virales propuesto designó a tres serotipos: VR-299 (serotipo 1), Ab (serotipo 2) y Sp (serotipo 3) (Rodríguez *et al.*, 2003). Sin embargo, debido a inconsistencias en el procedimiento y resultados, Hill & Way (1995) propusieron una nueva clasificación de serogrupos (**Cuadro 1**), la cual es la clasificación serológica vigente.

SEROGRUPO	SEROTIPO	NOMBRE	ABREVIACIÓN
A	A1	VR-29 West Buxton	VR-299 WB
	A2	Spjarup	Sp
	A3	Abild	Ab
	A4	Hecht	He
	A5	Telliana	Te
	A6	Canadá 1	Can. 1
	A7	Canadá 2	Can.2
	A8	Canadá 3	Can. 3
	A9	Jasper	Ja
B	B1	TV-1	TV-1

Cuadro 1. Clasificación serológica del VNPI propuesta por Hill & Way en 1995. Tomado de Hill & Way (1995).

La gran mayoría de los birnavirus acuáticos están relacionados antigénicamente, pertenecen a un mismo serogrupo (serogrupo A). Algunos aislamientos que están menos relacionados están comprendidos en el serogrupo B (Lee *et al.*, 1996). Cada serotipo está compuesto de numerosas cepas que difieren en la virulencia (Hill, 1982; Silim *et al.*, 1982), por ejemplo, los serotipos A1 y A2 provocan una mayor mortalidad en truchas arcoíris que el serotipo A3 (Jørgensen & Kehlet, 1971).

Algunos serotipos predominan en zonas geográficas específicas. La mayoría de los aislamientos virales de Estados Unidos de América (EUA) pertenecen al serotipo A1 (WB), mientras que los aislamientos canadienses corresponden al serotipo A6 (C1), A7 (C2), A8 (C3) o A9 (Ja). En Europa se han identificado los serotipos A2 (Sp), A3 (Ab), A4 (He) o A5 (Te). En Asia, los serotipos predominantes son A1 (WB), A2 (Sp) y A3 (Ab) (Hill & Way, 1995; Lee *et al.*, 1996). En México, el primer reporte de aislamiento y caracterización del VNPI ocurrió en el 2000. Algunos estudios genotípicos y filogenéticos determinaron que el primer aislamiento mexicano de VNPI presentaba un 99.5% de similitud con la secuencia de aminoácidos de una cepa perteneciente al serotipo A1 (Ortega *et al.*, 2002).

1.5.2 Clasificación genotípica

Blake *et al.* (2001) propusieron una clasificación totalmente nueva para el VNPI, realizada a partir de la secuencia completa del segmento A del genoma.

Se desprenden 6 genogrupos: el genogrupo 1 incluye los serotipos A1 y A9; el segundo genogrupo incluye aislamientos del serotipo A3; el genogrupo 3 incluye los serotipos A5 y A6; el cuarto aislamientos del A7 y A8; el quinto contiene al serotipo A2; y el sexto genogrupo contiene al serotipo A4. Además, Nishizawa *et al.* (2005) propusieron la inclusión de una nueva categoría, el genogrupo 7, el cual comprende aislamientos encontrados en Japón y Corea (Barrera-Mejía *et al.*, 2011), realizada a partir de la secuencia entre pVP2/NS.

En México, el primer aislamiento del VNPI se identificó como serotipo A1, el cual fue obtenido en el Estado de México a partir de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Ortega *et al.*, 2002). Posteriormente, por medio de análisis de secuencias de VP2 y VP1, el aislamiento fue incluido en el genogrupo 1 (Barrera-Mejía *et al.*, 2010; Nishizawa *et al.*, 2005).

Los análisis filogenéticos subsecuentes indican que el VNPI de aislamientos mexicanos está fuertemente relacionado con cepas de EUA y Canadá. Todos los aislamientos mexicanos del VNPI, a partir de la secuencia de VP2, pertenecen al genogrupo 1 (Salgado-Miranda *et al.*, 2014) (**Figura 3**). Adicionalmente, Barrera-Mejía *et al.* (2010) identificaron tres genotipos distintos del VNPI con la secuencia completa de VP1.

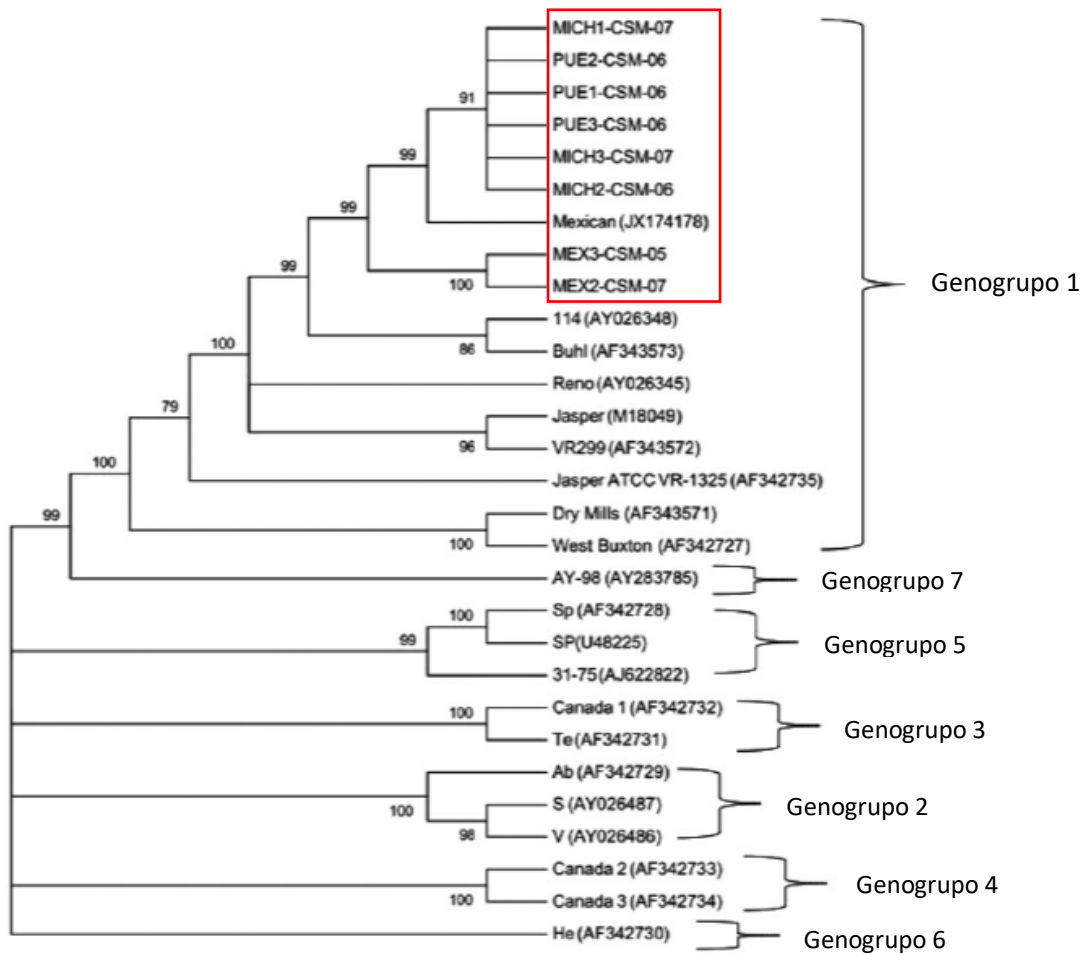


Figura 3. Genogrupos del VNPI. Basado en la secuencia de 29 nucleótidos correspondientes al gen VP2. Se muestran distintos aislamientos mexicanos comprendidos dentro del Genogrupo 1 (color rojo). Tomado de Salgado-Miranda *et al.* (2014).

2. Características de la necrosis pancreática infecciosa (NPI)

La necrosis pancreática infecciosa (NPI) es causada por el VNPI; es una enfermedad altamente contagiosa presente en varias especies de peces de agua continental y salobre, así como algunos crustáceos y moluscos (Rodríguez *et al.*, 2003).

Se caracteriza por una mortalidad de hasta el 90% en crías jóvenes de salmónidos (Munro & Midtlyng, 2011). Los peces mayores de 6 meses padecen una enfermedad crónica, siendo portadores del VNPI toda su vida (Dobos, 2001). Por ello, la NPI tiene un impacto económico considerable en la salmonicultura y truticultura (Salgado-Miranda, 2006).

2.1 Vías de entrada, transmisión y vías de salida

La transmisión de la NPI se da tanto horizontal como vertical. La transmisión horizontal, ocurre cuando los organismos portadores eliminan el virus por medio de heces, orina y fluidos reproductivos, que a su vez tienen contacto con el agua y con otros hospederos susceptibles. El VNPI entra al organismo por medio de las branquias o por la boca a través de la comida. La transmisión vertical es gracias a la presencia del VNPI en los productos reproductivos (Dobos, 2001; Rodríguez *et al.*, 2003).

2.2 Signos clínicos y órganos diana

Los síntomas de la NPI son muy particulares y depende de varios factores, como la virulencia de la cepa, estado inmunitario de los peces y condiciones ambientales, entre otros.

FIGURA PROTEGIDA

Figura 4. Cría de trucha arcoíris infectada experimentalmente con VNPI. Se observa distensión abdominal (rojo). Fotografía tomada por: Pliego-León, G.E. (2021).

Usualmente los peces infectados nadan de forma irregular, en forma de sacacorchos tanto vertical como horizontalmente. Otros signos clínicos incluyen: exoftalmia, distensión abdominal, hiperpigmentación, en algunos también se puede observar branquias pálidas y hemorragias en la zona ventral, con “heces colgantes” de color blanquecino (Dobos, 2001; Salgado-Miranda, 2006) (**Figura 4**). En la necropsia los ciegos pilóricos y el tejido adiposo anterior presentan petequias. El bazo, el corazón, el hígado y el riñón pueden estar pálidos (Rodríguez *et al.*, 2003).

2.3 Morbilidad y mortalidad

En otros birnavirus que pertenecen a la familia *Birnaviridae*, la tasa de morbilidad puede alcanzar el 100%, mientras que los valores de tasa de mortalidad varían entre el 20 y 30% (Pérez-Lozano, 2018). En el VNPI, la mortalidad es inversamente proporcional a la edad del pez, llegando a tener valores del 90% en crías jóvenes (Rodríguez *et al.*, 2003). La morbilidad del VNPI podría depender de la virulencia del virus y la edad del pez (Pérez-Lozano, 2018).

3. Producción de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en México

La acuicultura es el sector productor de alimentos de más rápido crecimiento y representa ahora el 50% del pescado destinado a la alimentación a nivel mundial (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación [FAO], 2021). En México, la acuicultura y pesca son parte esencial del quehacer económico y social del país (García-Mondragón *et al.*, 2013).

En México, la producción de la trucha arcoíris es predominante en los siguientes estados: Durango, Chihuahua, Puebla, Tamaulipas, Veracruz, Estado de México, Michoacán, Hidalgo y Nayarit. El Estado de México se ha destacado por varias décadas como el primer productor de trucha arcoíris del país, con una participación equivalente al 52% de la producción nacional (García-Mondragón *et al.*, 2013) (**Gráfico 1**). La trucha se encuentra posicionada en el lugar 21 de la producción pesquera nacional, de acuerdo a su volumen. Sin embargo, por su valor ocupa el lugar 10 (SAGARPA, 2018).

La producción acuícola en el Estado de México se ha incrementado en un 6.5%, lo que representa un promedio de 672 toneladas de productos acuícolas al año. Cabe destacar que del volumen reportado de 17,979 toneladas para 2016, 4,406

toneladas corresponden a la producción de trucha arcoíris con un valor de producción aproximado de \$396, 507, 330.00 pesos mexicanos (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural [SADER], 2018).

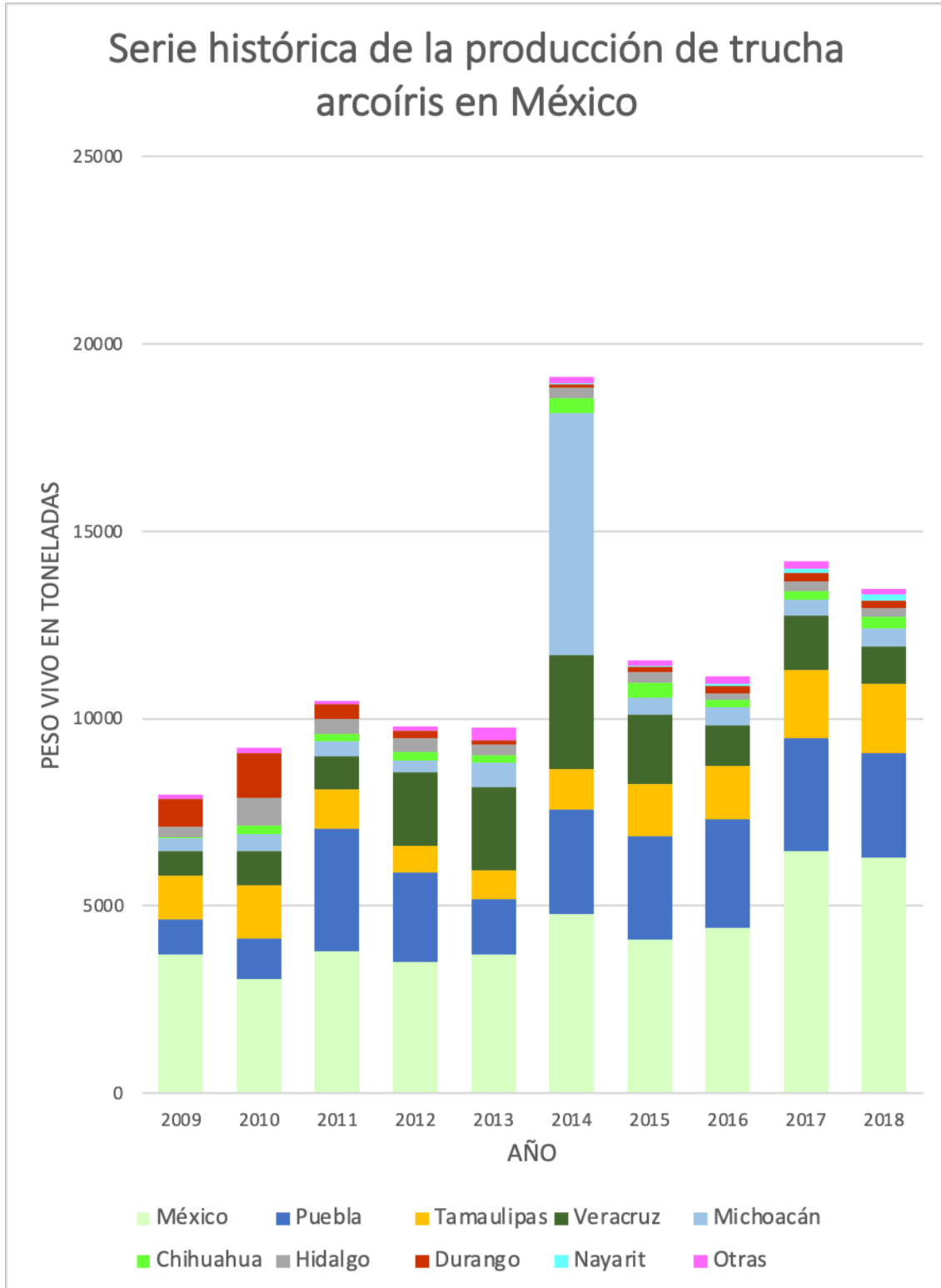


Gráfico 1. Serie histórica de la producción de trucha arcoíris en México. Fuente: Gráfica de elaboración propia, a partir de cifras tomadas del Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca, SAGARPA (2018).

4. Métodos de diagnóstico para el VNPI

Los brotes de enfermedades virales, como la necrosis pancreática infecciosa (NPI), pueden causar pérdidas importantes a la industria de acuicultura, esto debido a que varias enfermedades virales actualmente no cuentan con tratamiento. La prevención es la mejor opción ante la enfermedad (Rodríguez *et al.*, 2003).

Aunque existen algunas vacunas comerciales disponibles contra el VNPI, la enfermedad sigue siendo un problema mayor en el desarrollo de la acuicultura (Cuesta *et al.*, 2010). Debido a esto, la implementación de métodos diagnósticos rápidos, sensibles, seguros y eficaces es el mejor acercamiento para prevenir un brote infeccioso en diversas instalaciones de acuicultura (Rodríguez, *et al.*, 2003).

Además, algunos cuadros clínicos de varias enfermedades en peces son muy similares, por ejemplo, la NPI con la necrosis hematopoyética infecciosa (NHI). Por lo que debe optarse por un aislamiento del agente causal y posterior identificación para confirmar el diagnóstico preliminar (Rodríguez, *et al.*, 2003).

De acuerdo al Manual de Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos, publicado por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), se recomiendan dos técnicas diagnósticas para la identificación del VNPI a partir de peces sin signos de enfermedad y peces enfermos. Para el primer grupo (peces sin signos de enfermedad) inicialmente se realizaba el aislamiento viral en líneas celulares de peces (BF-2 y CHSE-214), continuando con la identificación inmunológica mediante pruebas de inmunofluorescencia indirecta, seroneutralización y ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Para el segundo grupo (peces enfermos), se inicia con la histología o demostración inmunológica del VNPI en tejidos infectados, con el fin de confirmar posteriormente el diagnóstico con el aislamiento viral e identificación inmunológica en cultivo celular (OIE, 2006). No obstante, para dar una muestra negativa por medio de cultivo celular debe pasar por un cultivo (7 días) y dos subcultivos (14 días) (OIE, 2006). Debido a la cantidad

de tiempo que consumen estas pruebas, al costo elevado que presentan y que la efectividad de este método depende directamente de la susceptibilidad de la línea celular (Rodríguez *et al.*, 2003), actualmente se utilizan métodos moleculares.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una poderosa técnica para amplificar regiones específicas del genoma del VNPI en una cantidad detectable (Rodríguez *et al.*, 2003). Para la PCR, no es necesario partir de una cantidad grande de material genético, basta un poco del mismo para amplificarlo y así obtener un diagnóstico, además de que se puede obtener un diagnóstico el mismo día que se realice la prueba. Hoy en día, la PCR y sus variantes son el método de diagnóstico de infecciones virales más utilizado en el mundo.

4.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue desarrollada por Kary Mullis en 1983 (Buckingham & Flaws, 2007). La PCR y sus variantes son, por mucho, el método predilecto para la identificación de uno o más agentes patógenos (Carr *et al.*, 2010). Este proceso amplifica exponencialmente (2^N , donde N=número de repeticiones o ciclos) secuencias específicas en el ADN (Buckingham & Flaws, 2007). Los principales componentes, de manera general, son: una polimerasa de ADN dependiente de ADN, nucleótidos trifosfato (dNTPs) y oligonucleótidos específicos para la secuencia de ADN a amplificar (Carr *et al.*, 2010).

El procedimiento básico de una PCR incluye 4 etapas: 1. Desnaturalización de la doble hebra de ADN, con una temperatura cercana a los 100 °C, 2. Alineamiento de oligonucleótidos, con una temperatura específica dependiente de la cantidad de guaninas y citosinas presentes en el oligonucleótido, 3. Elongación de las secuencias del oligonucleótido, con una temperatura específica directamente relacionada con la temperatura óptima de trabajo de la polimerasa de ADN

dependiente de ADN y 4. Elongación final, la misma temperatura que en la etapa 3, con una extensión de tiempo un poco mayor para finalizar la reacción. Las etapas 1, 2 y 3 se repiten desde 30 hasta 50 ciclos. La etapa 4 ocurre únicamente al final de los ciclos correspondientes (Carr *et al.*, 2010) y antes de la etapa 1, puede añadirse una desnaturalización inicial a 95 °C de 5 a 10 min (Espinoza, 2007) (**Cuadro 2**). Para las muestras que parten de ARN, como lo es el genoma del VNPI, primero debe retro transcribirse a ADN complementario (ADNc). Usualmente, se lleva a cabo antes de la primera etapa de la PCR, teniendo como resultado una técnica conocida como retro transcripción de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) (Buckingham & Flaws, 2007; Carr *et al.*, 2010).

Etapa	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Elongación	Elongación final
Temperatura	95 – 100 °C	90-100 °C	50-70 °C	68-75 °C	68-75 °C
Tiempo (segundos)	300-600 (5-10 min)	20-60	20-90	10-60	60
Ciclos	No aplica	30 – 50 ciclos			1-5 ciclos

Cuadro 2. Procedimiento básico de una PCR. Tomado de Buckingham & Flaws (2007); Espinoza (2007).

Los factores que influyen en el rendimiento y funcionamiento de la PCR y RT-PCR son la concentración de oligonucleótidos, calidad del templado (ADN molde a amplificar), dNTPs, y magnesio (Mg^{2+}), tipo de polimerasa, contenido de guaninas y citosinas en el templado, y parámetros del ciclado (Carr *et al.*, 2010).

La interpretación de resultados de la PCR (amplicones), puede hacerse por medio de la separación de los amplicones utilizando un gel de electroforesis teñido con algún intercalador o utilizando sondas de ADN específicas (Carr *et al.*, 2010).

4.1.1 PCR y RT-PCR Punto final

La PCR convencional (o punto final) se caracteriza por utilizar un par de oligonucleótidos para amplificar una región específica del genoma. Una RT-PCR punto final parte desde una retro transcripción (RT) del genoma ARN a ADN complementario (ADNc), para después llevar a cabo una PCR convencional. Se ha reportado que la PCR convencional (o punto final) llega a detectar hasta 15 femtogramos o 10 picogramos del genoma viral (López-Lastra *et al.*, 1994; Rimstand *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1997).

4.1.2 PCR en tiempo real (qPCR) y RT-qPCR

Después de la amplificación del material genético utilizando una PCR convencional, se utiliza un gel de electroforesis para analizar los productos amplificados. Sin embargo, la PCR en tiempo real permite la detección y medición cuantitativa de los productos generados durante cada ciclo del proceso de PCR, que son directamente proporcionales a la cantidad del ADN en la muestra. Esta técnica requiere el uso de un termociclador específico que registre los resultados obtenidos en cada amplificación (ciclo) de una manera en tiempo real. Lo anterior se logra gracias al uso de fluorocromos no específicos (SYBR® Green I) o sondas moleculares dependientes de la secuencia (Guerrero-García, 2013).

4.1.3 PCR anidada (PCRa) y RT-PCR anidada (RT-PCRa)

La PCR anidada (PCRa) es una modificación de la PCR diseñada para perfeccionar la sensibilidad y especificidad de la reacción. En esta variante, la reacción utiliza 2 pares de oligonucleótidos y dos reacciones de PCR consecutivas (Carr *et al.*, 2010).

El primer par de oligonucleótidos se utiliza para amplificar una región específica del genoma, se utilizan en la primera reacción. El segundo par es para otorgar una especificidad aún mayor, puesto que reconocen el primer fragmento amplificado, de esta manera se amplifica la secuencia de interés; se lleva a cabo en una segunda reacción (Carr *et al.*, 2010) (**Figura 5**).

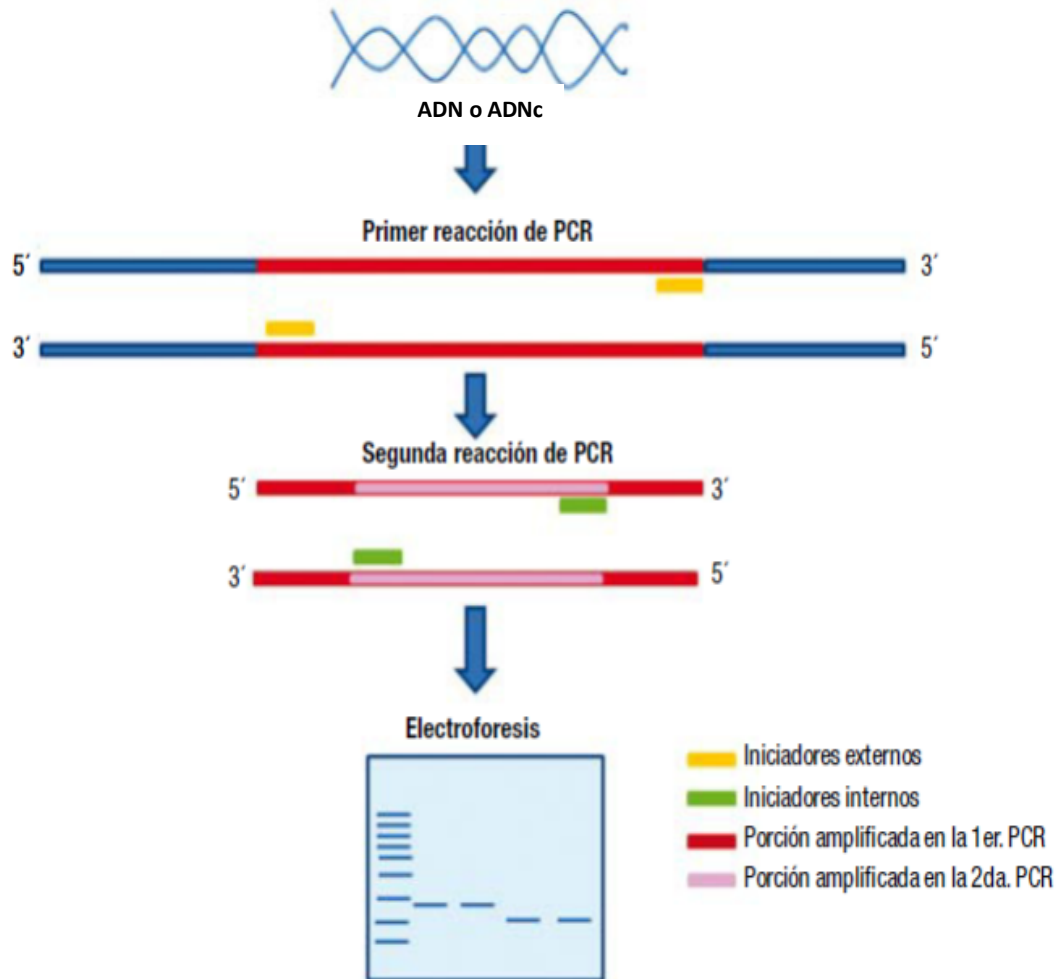


Figura 5. Esquema general de una PCR anidada. Al final los resultados pueden ser analizados por medio de electroforesis. Tomado de Ramírez-Pacheco *et al.* (2013).

La PCRa, ha demostrado ser una técnica de detección rápida y sensible para el VNPI (Rimstad *et al.*, 1990). Esta técnica puede llegar a detectar hasta una milbillonésima parte de un gramo (1 femtogramo) del genoma viral de los birnavirus marinos (Suzuki *et al.*, 1997). También, la PCRa resulta ser eficiente y sensible al amplificar material genético del VNPI para su posterior secuenciación, a partir de tejidos, incluso de muestras de riñón y bazo de salmónidos, en las que no se puede aislar el virus por medio de cultivo celular (Torres *et al.*, 2016).

ANTECEDENTES

Como se expuso previamente, el método diagnóstico recomendado por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) parte inicialmente de un aislamiento viral en líneas celulares (como BF-2 o CHSE-214), seguido de su identificación inmunológica mediante inmunofluorescencia indirecta, seroneutralización o ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Aunque es un método confiable, la realización del mismo tiene costos elevados y para confirmar un resultado como negativo se requieren de al menos 21 días (OIE, 2006). Este tiempo es crítico para la diseminación del virus, debido a que su dispersión es rápida, lo cual puede generar pérdidas económicas importantes. Debido a que los métodos moleculares, como la PCR y sus variantes, requieren de un menor costo y un menor tiempo de realización, hoy en día son las técnicas más utilizadas para la identificación y diagnóstico de infecciones virales.

Varios autores reportan como eficiente, sensible y rápido el uso de la PCR y sus variantes para la detección y diagnóstico del VNPI, por ejemplo, López-Lastra *et al.* (1994) propusieron un protocolo para la detección del VNPI mediante la RT-PCR. Diseñaron oligonucleótidos específicos para el reconocimiento de la secuencia correspondiente a VP2, los cuales proporcionaron la especificidad en el experimento. Los resultados del ensayo mostraron que la RT-PCR era un método útil en la detección del VNPI a partir de un cultivo celular previo.

Posteriormente, Blake *et al.* (1995) desarrollaron un protocolo para la detección e identificación de birnavirus acuáticos, a partir de especímenes portadores y sobrevivientes a la infección del VNPI. Propusieron el uso de cuatro oligonucleótidos complementarios a regiones específicas del segmento A del genoma de los birnavirus marinos. Los resultados indicaron que la RT-PCR puede ser un sustituto confiable y rápido de los cultivos celulares para la detección de birnavirus acuático.

Rodríguez *et al.* (2001) realizaron una comparación evaluativa de seis métodos distintos para la detección del VNPI (inmunofluorescencia indirecta, citometría de flujo, inmunoperoxidasa, inmunodot blot, proteína A inmunoestafilococos, y RT-PCR). Los métodos más confiables, apropiados y sensibles del ensayo fueron la citometría de flujo y RT-PCR. Ambos métodos detectaron la presencia del VNPI a las 4 horas posteriores a la infección.

Debido a que los estudios reportados por López-Lastra *et al.*, 1994 y Rodríguez *et al.*, 2001 partían de un cultivo celular previo, Barrera-Mejía *et al.*, 2009 propusieron un método con un cultivo celular corto (14 días) y RT-PCR múltiple para incrementar la probabilidad de detectar los serotipos de VNPI del serogrupo A. Con su método, pudieron identificar la presencia del VNPI en concentraciones muy bajas. Además, el tiempo del cultivo se redujo en un 30%, por lo que los costos de tiempo y eficiencia se redujeron significativamente.

Guerrero-García (2013) desarrolló la estandarización de RT-qPCR utilizando oligonucleótidos diferentes a los del presente estudio (oligonucleótidos CIESAIPNV, DIAINP y DIAint) para la detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa en truchas arcoíris. Reportan una sensibilidad mayor al utilizar los oligonucleótidos DIAint comparando sus resultados con los previamente descritos por López-Lastra *et al.*, 1994 y Rimstad *et al.*, 1990.

Tufiño-Loza *et al.*, 2020 reportaron el uso de la PCRa para la detección de VNPI en truchas adultas de campo. En los resultados, se observa que la RT-PCR tuvo menor sensibilidad que la PCRa, la cual mostró una sensibilidad del 100% en peces adultos. Por lo que, concluyeron que la PCRa tenía una mayor sensibilidad y especificidad que la RT-PCR en su ensayo.

JUSTIFICACIÓN

La necrosis pancreática infecciosa, provocada por el VNPI, es una enfermedad con distribución mundial, nacional y estatal. La enfermedad genera importantes pérdidas económicas en las granjas de producción de trucha arcoíris. La truticultura nacional es una actividad agropecuaria de gran importancia económica en México y el Estado de México es el principal productor nacional. En el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, la identificación del VNPI se lleva a cabo por medio de cultivo celular (un cultivo, seguido de dos subcultivos, cada uno de 7 días), seguido de la prueba de inmunofluorescencia. Estas técnicas son costosas y tardadas. Estandarizar en el CIESA una técnica de PCRa para identificar los serotipos A1 y A2 del VNPI, con alta sensibilidad y especificidad permitirá un diagnóstico correcto y expedito para disminuir la dispersión del virus en las unidades de producción trutícola estatal y nacional. En consecuencia, se dará respuesta a la demanda de productores de trucha arcoíris que solicitan técnicas diagnósticas confiables, rápidas y modernas.

HIPÓTESIS

La técnica de PCRa identificará los serotipos A1 y A2 del virus de la necrosis pancreática a partir del día 3 posterior a la infección en muestras de peces infectados.

OBJETIVOS

General:

- Identificar el virus de la necrosis pancreática infecciosa por medio de PCR anidada en órganos de truchas arcoíris infectadas experimentalmente con el VNPI.

Específicos:

- Infectar crías de truchas arcoíris con los serotipos A1 y A2 del VNPI bajo condiciones controladas.
- Estandarizar la técnica de PCR anidada para identificar el serotipo A1 del VNPI en truchas arcoíris infectadas experimentalmente con el virus.
- Estandarizar la técnica de PCR anidada para identificar el serotipo A2 del VNPI en truchas arcoíris infectadas experimentalmente con el virus.
- Estimar la sensibilidad y especificidad de la PCR anidada para identificar los serotipos A1 y A2 del VNPI en truchas arcoíris infectadas experimentalmente.

MATERIAL Y MÉTODO

1. Aislamientos virales

Se incluyó el aislamiento mexicano del VNPI denominado MEX2-CSM-07 (número de acceso MH708132, GenBank), previamente aislado en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM). El aislamiento MEX2-CSM-07 se obtuvo de crías de trucha arcoíris con signos clínicos de la NPI. El aislamiento ha sido caracterizado a partir del gen VP2 y se ubica en el clado del genogrupo I, junto con las cepas de referencia de EUA, serotipo A1. Su secuencia de nucleótidos y proteínas se encuentran en el GenBank (Salgado-Miranda *et al.*, 2014). También se incluyó una cepa de referencia del VNPI serotipo A2, denominada Sp (ATCC® VR-1318™).

2. Cultivo celular y replicación viral

Se utilizó la línea celular epitelial BF-2 (Bluegill fry, ATCC® CCL-91™), para replicar los VNPI con base en protocolos establecidos y estandarizados (OIE, 2006) (**Anexo 1**).

3. Determinación del título viral

De cada aislamiento se determinó un título de 5×10^5 DICCC50/ml, mediante el método de Reed & Muench (1938) (**Anexo 2**).

4. Organismos de trucha arcoíris

120 crías de trucha arcoíris del Centro Acuícola el Zarco (granja de gobierno federal libre del VNPI), de aproximadamente 3 cm de longitud y 1 g de peso, fueron trasladadas en bolsas de plástico con agua y oxígeno, al Bioterio de Organismos Acuáticos, CIESA, FMVZ, UAEM. Las truchas se mantuvieron en peceras de 10 litros con agua dulce a 15 +/- 1 °C, con un sistema de aireación constante y con un sistema de filtración física, química y biológica. Las crías se alimentaron diariamente con alimento comercial peletizado (El Pedregal, Silver Cup). Se les proporcionó el 5% de su peso por día (Bebak *et al.*, 1998). Los organismos estuvieron 3 semanas en período de adaptación. Previo a la infección, se determinó el estado sanitario del lote de truchas arcoíris. Se seleccionaron 30 crías al azar y se remitieron para diagnóstico del CIESA. Se les realizó los siguientes estudios diagnósticos: bacteriológicos, parasitológicos y virológicos.

5. Infección experimental de crías de trucha arcoíris con los aislamientos del VNPI

Un día antes de la infección las truchas fueron sometidas a ayuno. Se formaron tres grupos experimentales con 30 crías de trucha arcoíris cada uno. Los organismos de los grupos 1 y 2 se infectaron por inmersión con los virus (5×10^5 DICC50/ml) (Skjesol *et al.*, 2011). A los peces del grupo 3 se les adicionó Minimal Essential Medium (MEM). La temperatura del agua se mantuvo a 15 +/- 1 °C. Los peces se colocaron en las peceras y la infección duró 3 horas con 30 minutos (Salgado-Miranda *et al.*, 2020). Después de la infección y antes de haber sido regresados a sus peceras (10 litros), las crías de trucha arcoíris se enjuagaron con agua limpia (Salgado-Miranda *et al.*, 2020).

6. Eutanasia y necropsia de organismos experimentales

Para este estudio, la eutanasia de peces moribundos o con signos clínicos se realizó los días 2, 4 y 6 posterior a la infección (con base en Salgado-Miranda *et al.*, 2020). La eutanasia se llevó a cabo por sobredosis de triclaína metano sulfonato (300 mg/l) (AVMA, 2013). La necropsia y toma de muestra de órganos se realizó con base en los protocolos establecidos por Noga (2000). De cada pez se tomaron muestras de hígado, riñón, bazo y páncreas (OIE, 2006; Salgado-Miranda *et al.*, 2020). En total se analizaron 45 peces.

7. Extracción de ARN

A partir de los órganos de las trucha arcoíris, se realizó la extracción del ARN viral. Se utilizó el kit QIAamp Viral RNA Mini (QIAGEN, Alemania) (**Anexo 3**). Una vez realizada la extracción, se cuantificó la cantidad, calidad y pureza del ARN con el Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, EUA).

8. ADNc

A partir del ARN total se sintetizó la primera cadena de ADNc por medio de oligonucleótidos hexaméricos aleatorios, utilizando el kit iScript™ Select cDNA Synthesis, (BIO-RAD, California, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante (**Anexo 4**).

9. PCR anidada

Se utilizó el par de oligonucleótidos referidos por Salgado-Miranda *et al.* (2020). El primer par fue el INFE1 + 5'-ATGAGCACATCCAAGGCAA-3' (posición 137-160), e INFE1- 5'-TCTGATGCCTCTGACTAGGTCC-3' (posición 796-818), con un producto de PCR amplificado de 682 pb. El segundo par de oligonucleótidos fue INFE2 + 5'-ATTCGACCAGTGGCTAGAGACG-3' (posición 482-503) e INFE2- 5'-GCGGTCTGCTGGTTGAGCTGG-3' (posición 688-710), con un producto de PCR amplificado de 229 pb. Las regiones de interés se amplificaron utilizando el kit iProof™ High-Fidelity PCR (BIO-RAD, California, EUA), mediante las instrucciones del fabricante: las muestras se amplificaron en PCRa con volúmenes de 25 µL totales, conteniendo 2.5 µL de *Dream Taq Buffer* (10X), 0.5 µL de *dNTP's* (2 mM), 0.5 de oligonucleótidos *forward* y *reverse* (5 µM), 2.5 µL de templado de ADNc, 0.13 µL de polimerasa de ADN dependiente de ADN (5 U/ µL) y 18.37 µL de agua grado PCR.

Se realizó un gradiente de temperatura, para determinar la temperatura de hibridación (T_m , *melting temperature*) óptima para cada par de oligonucleótidos.

10. Análisis de resultados

Los productos de la PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1%. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (concentración de 0.5 µg/ml) y posteriormente se visualizaron en el transiluminador UV. Se añadieron controles positivos y negativos, para determinar la veracidad de los resultados que serán visibles. Después, se tomaron fotografías de cada uno de los geles.

Para el análisis de especificidad y sensibilidad, se utilizó una tabla de contingencia y se realizaron los cálculos utilizando los parámetros mostrados en **Cuadro 3**.

		Infectados	Sanos	
Prueba molecular	Positivo	Verdaderos positivos (VP)	Falsos positivos (FP)	Sensibilidad = $VP / (VP+FN)$
	Negativo	Falsos negativos (FN)	Verdaderos negativos (VN)	Especificidad = $VN / (FP+VN)$

Cuadro 3. Criterios con los que se realizó el cálculo de sensibilidad y especificidad de la PCRa.

RESULTADOS

Se realizó eutanasia a los peces con signos clínicos, los días 2, 4 y 6 post infección, con base a lo reportado previamente por Salgado-Miranda *et al.* (2020). De cada pez se tomaron muestras de bazo, hígado, páncreas y riñón (OIE, 2006; Salgado-Miranda *et al.*, 2020) y se realizaron *pools* de los órganos extraídos. A continuación, se realizó la extracción de ARN viral y posteriormente se realizó la estandarización de PCR anidada por día (2, 4 y 6).

Para determinar la temperatura de alineamiento se realizó un gradiente de temperatura (**Cuadro 4**). Las temperaturas y ciclos para la PCR anidada se muestran en el **Cuadro 5**.

Fila	Primer par de oligonucleótidos	Segundo par de oligonucleótidos
A	52.0 °C	57.0 °C
B	52.7 °C	57.7 °C
C	54.0 °C	59.0 °C
D	55.8 °C	60.8 °C
E	58.0 °C	63.0 °C
F	60.1 °C	65.1 °C
G	61.3 °C	66.3 °C
H	62.0 °C	67.0 °C

Cuadro 4. Gradiente de temperatura para los oligonucleótidos.

Etapa	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento		Elongación	Elongación final
			INFE1+ e INFE1-	INFE2+ e INFE2-		
Temperatura	95 °C	95 °C	60 °C	65 °C	72 °C	72 °C
Tiempo (segundos)	180 (3 min)	30	30	30	60 (1 min)	900 (15 min)
Ciclos	No aplica	35 ciclos				1 ciclo

Cuadro 5. Etapas de la estandarización de la PCRa para la detección del VNPI. Valores de temperatura y tiempo estandarizados en el presente trabajo.

A continuación, se presentan 3 geles correspondientes a los días en que se realizó el estudio de los individuos enfermos, siendo la **Figura 6** la correspondiente al día 2, **Figura 7** al día 4 y **Figura 8** al día 6 posterior a la infección.

En cada gel las muestras fueron colocadas en el siguiente orden: carril 1: marcador de peso molecular 100 pb (Thermo Scientific), carriles 2 a 5: grupo Control negativo (bazo, hígado, páncreas y riñón sanos, respectivamente), carriles 6 a 9: grupo

MEX2-CSM-07 (bazo, hígado, páncreas y riñón, respectivamente), carriles 10 a 13: grupo Sp (bazo, hígado, páncreas y riñón, respectivamente), carril 14: control negativo (-), carriles 15 y 16: control positivo (+).

IMAGEN PROTEGIDA

Figura 6. Amplicones de la PCRa. Muestras de órganos, grupos de infección (Día 2 posterior a la infección). Carril 1: marcador de peso molecular 100 pb (Thermo Scientific). Carriles 2 a 5: grupo Control (bazo, hígado, páncreas y riñón). Carriles 6 a 9: grupo MEX2-CSM-07 (bazo, hígado, páncreas y riñón). Carriles 10 a 13: grupo Sp (bazo, hígado, páncreas y riñón). Carril 14: Control -. Carril 15 y 16: Control +.

FOTOGRAFÍA PROTEGIDA

Figura 7. Amplicones de la PCRa. Muestras de órganos, grupos de infección (Día 4 posterior a la infección). Carril 1: Marcador de peso molecular 100 pb (Thermo Scientific). Carriles 2 a 5: grupo Control (bazo, hígado, páncreas y riñón). Carriles 6 a 9: grupo MEX2-CSM-07 (bazo, hígado, páncreas y riñón). Carriles 10 a 13: grupo Sp (bazo, hígado, páncreas y riñón). Carril 14: Control -. Carril 15 y 16: Control +.

FOTOGRAFÍA PROTEGIDA

Figura 8. Amplicones de la PCRa. Muestras de órganos, grupos de infección (Día 6 posterior a la infección). Carril 1, Marcador de peso molecular 100 pb (Thermo Scientific), Carriles 2 a 5, grupo Control – (bazo, hígado, páncreas y riñón), Carriles 6 a 9, grupo MEX2-CSM-07 (bazo, hígado, páncreas y riñón), Carriles 10 a 13, grupo Sp (bazo, hígado, páncreas y riñón), Carril 14, Control -, Carril 15 y 16, Control +.

Tanto el aislamiento MEX2-CSM-07 como la cepa Sp dieron resultados negativos el día 2 posterior a la infección, y para el día 4 y 6 posterior a la infección ambos ensayos tuvieron al menos un resultado positivo. El macerado de órganos que presentó resultado positivo para MEX2-CSM-07 fue el de riñón en ambos días (4 y 6 posterior a la infección), mientras que para la cepa Sp el resultado positivo se observó en los macerados de hígado y riñón en los mismos días. El grupo control negativo no presentó amplificación de ADN en ningún día posterior a la infección, ver **Cuadro 6**.

Grupo	2º día posterior a la infección				4º día posterior a la infección				6º día posterior a la infección			
	B	H	P	R	B	H	P	R	B	H	P	R
MEX2-CSM-07	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Sp	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
Control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Cuadro 6. Identificación del VNPI por medio de PCRa. (+) Indica resultado positivo o presencia de material genético en el gel. (-) indica resultado negativo o ausencia de material genético en el gel. **B** corresponde a bazo, **H** a hígado, **P** a páncreas y **R** a riñón.

DISCUSIÓN

El aislamiento viral en líneas celulares de peces (BF-2 y CHSE-214), seguido de la identificación inmunológica mediante inmunoensayos es el método recomendado por la OIE, pero tiene un costo elevado y la realización del mismo conlleva al menos 21 días para confirmar un resultado como negativo (OIE, 2006; Rodríguez *et al.*, 2003). Varios autores han validado el uso la técnica de RT-PCR para la detección del VNPI (López-Lastra *et al.*, 1994; Blake *et al.* 1995; Rodríguez *et al.*, 2001; Barrera-Mejía *et al.*, 2009). Así como también algunos autores han validado el uso de la PCR anidada (Rimstad *et al.*, 1990; López-Lastra *et al.*, 1994; Torres *et al.*, 2016; Tufiño-Loza *et al.*, 2020).

Los patrones de excreción en crías de trucha arcoíris fueron determinados por Bebak *et al.*, 1998 demostrando la presencia del VNPI en el tanque de agua que contenía los alevines 2 días después de la infección, por lo que la eliminación del virus se presentó después de 48 horas. El virus es excretado a través de heces, orina y fluidos reproductivos, lo que origina una transmisión horizontal entre los peces infectados y susceptibles (Salgado-Miranda, 2006). A medida que la carga viral del VNPI aumenta, así lo hace la excreción del mismo, teniendo el pico de concentración viral más alto desde los 6 hasta los 10 días posteriores a la infección, para posteriormente descender en los días próximos (Bebak *et al.*, 1998).

Tufiño-Loza *et al.*, 2020 reportan la presencia de signos clínicos sugerentes a la NPI a partir del día 7 posterior a la infección en truchas arcoíris inoculadas experimentalmente con el aislamiento MEX2-CSM-05. En comparación con el presente estudio, el avistamiento de signos clínicos sugerentes a la NPI en truchas inoculadas experimentalmente con el aislamiento MEX2-CSM-07 se reportó el día 4 posterior a la infección. Se obtuvieron resultados positivos para la presencia de VNPI en la prueba PCRa a partir del día 4 posterior a la infección tanto en el

aislamiento MEX2-CSM-07 como para la cepa Sp en crías de trucha arcoíris infectadas experimentalmente.

La PCRa es una excelente opción de diagnóstico ya que se puede obtener la máxima sensibilidad sin perder especificidad (Rimstad *et al.*, 1990; López-Lastra *et al.*, 1994). Con esta técnica, se ha detectado el VNPI incluso en peces sin signos clínicos aparentes, como fue reportado por López-Lastra *et al.*, 1994; realizaron una RT-PCR en un grupo de peces sin signos clínicos, provenientes de una granja productora de trucha arcoíris con antecedentes de ser positiva al VNPI. Como consecuencia de la baja concentración viral en los tejidos utilizados para la RT-PCR y el límite de detección en el análisis gel de poliacrilamida (PAGE), los resultados fueron negativos para la presencia del VNPI. Sin embargo, cuando se realizó la PCRa con los productos de la RT-PCR previa, se obtuvieron resultados positivos, esto se debe a que la PCRa tiene mayor sensibilidad (López-Lastra *et al.*, 1994).

Para la detección del VNPI mediante inmunoensayos, la OIE (2006) recomienda obtener muestras del hígado, riñón y bazo en cultivos celulares. El principal órgano blanco para la identificación del VNPI es el riñón, pues es el órgano hematopoyético principal (Godoy-Rubio, 2009). También desempeña una actividad de filtración y excreción, donde la replicación del VNPI es constante y persistente, usualmente con cargas virales bajas en peces portadores (Ørpetveit *et al.*, 2010). Tufiño-Loza *et al.* (2020) y Torres *et al.* (2016) han referido el uso de un macerado homogeneizado de tejidos provenientes del bazo y riñón en PCRa. En este estudio, se tomaron macerados de bazo, hígado, páncreas y riñón. Los resultados fueron positivos para el hígado y el riñón en la cepa Sp, pues es una cepa de alta virulencia (Hill & Way, 1995). Mientras que para el aislamiento MEX2-CSM-07 sólo se observó resultado positivo en el riñón. Para el resto de los órganos (páncreas y bazo), se obtuvieron resultados negativos.

Se incluyó un grupo control negativo al cual se le añadió MEM. Los resultados del control negativo fueron negativos, por lo que se descarta completamente la

presencia de contaminación de VNPI en el agua, entre otras variables que pudieran comprometer los resultados del presente estudio.

Los resultados obtenidos en este estudio determinaron que, mediante la PCRa, la detección del VNPI es más rápida en comparación con los inmunoensayos propuestos por la OIE (2006), pues en aproximadamente 4 días posterior a la infección fue posible obtener resultados positivos o negativos a la presencia del VNPI. Igualmente, es posible la detección tanto de aislamientos nacionales como cepas de otras partes del mundo con el par de iniciadores específicos propuestos. Por lo que utilizar esta técnica podría conllevar un menor gasto, reducir tiempos e identificar la presencia de cepas o aislamientos del VNPI. Además, los valores de sensibilidad a partir del día 2 posterior a la infección fueron de 66%, mientras que a partir del día 4 se presenta una sensibilidad del 100%. La especificidad fue de 100% tanto a partir del día 2 posterior a la infección como del día 4 posterior a la infección.

López-Lastra *et al* (1994) desarrollaron una PCRa para detectar hasta 1 pg del VNPI en portadores asintomáticos a partir de muestras de campo. Tufiño-Loza *et al.* (2020) reportaron la sensibilidad de la RT-PCR en distintos órganos involucrados en la replicación del VNPI (riñón, hígado, sacos pilóricos, intestino, branquias y bazo). El valor de sensibilidad para el riñón es de 58.6% mientras que para el hígado es del 61.4%, los cuales se presentan por debajo de los valores de sensibilidad reportados en este estudio (66%).

Es probable que los resultados del día 2 posterior a la infección fueran negativos debido a que la carga viral del VNPI en los órganos de truchas arcoíris podría ser demasiado baja en las primeras 48 horas posterior a la infección, pues hay evidencia de que la eliminación del virus en el hospedero se da a los 2 días posterior a la infección (Bebak *et al.*, 1998).

Cuando se realiza un gel de agarosa para determinar los resultados de una PCR, deben añadirse tanto controles positivos como negativos, esto para determinar la veracidad de los resultados que serán visibles. El control positivo contiene una

muestra de ADN que haya amplificado adecuadamente y cuyo patrón de bandas es conocido. Por otro lado, el control negativo contiene todos los reactivos de la PCR excepto ADN (Espinoza, 2007). Como se muestra en la **Figura 6** a la **Figura 8**, ambos controles fueron colocados en cada uno de los geles.

En los resultados del día 2 posterior a la infección (**Figura 6**) se incluyeron dos muestras positivas: Carril 15 y Carril 16, sin embargo, en el Carril 15 la banda se observó muy tenue. Debido a que no se cuantificó el ADN de los controles, el error en el control positivo no amplificado (Carril 15) puede deberse a un mal pipeteo o no haber cargado suficiente material genético. El control negativo no presenta ningún bandedo, por lo que los reactivos utilizados en la PCR se encuentran en condiciones óptimas.

CONCLUSIONES

La PCRa propuesta en este estudio es un método sensible y específico para la identificación del VNPI en órganos de truchas arcoíris infectadas experimentalmente, tanto para serotipos A1 como serotipos A2.

El diagnóstico de VNPI por PCR anidada es más eficiente y sensible que la técnica recomendada por la OIE (cultivo celular e inmunoensayos).

PERSPECTIVAS

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo, se sugiere :

- Realizar estudios en los que se comparen las técnicas PCR anidada, PCR en tiempo real (incluyendo controles endógenos) y cultivo celular e inmunofluorescencia, para comparar su eficiencia, sensibilidad y especificidad en aislamientos mexicanos.

REFERENCIAS

AVMA (American Veterinary Medical Association) (2013). Guidelines on euthanasia (Formerly report of the AVMA panel on euthanasia). AVMA. USA.

Barrera-Mejía, M., Simón-Martínez, J., Salgado-Miranda, C., Vega, F., Ortega, C. & Aragón, A. (2009). Development and validation of a short-time cell culture and multiplex reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for infectious pancreatic necrosis virus in Mexican farm-sampled rainbow trout. *Journal of Aquatic Animal Health*, 21: 167-72.

Barrera-Mejía, M., Simón-Martínez, J., Ulloa-Arvizu, R., Salgado-Miranda, C. & Soriano-Vargas, E. (2010). Molecular characterization of the VP1 gene of a Mexican isolate of infectious pancreatic necrosis virus. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 74: 218-222.

Barrera-Mejía, M., Simón-Martínez, J., Ortega, C., & Ulloa-Arvizu, R. (2011). Genotyping of Infectious Pancreatic Necrosis Virus Isolates from Mexico State. *Journal of Aquatic Animal Health*, 23:4, 200-206

Bebak, J., McAllister, P.E. & Smith, G. (1998). Infectious pancreatic necrosis virus: Transmission from infectious to susceptible rainbow trout fry. *Journal of Aquatic Animal Health*, 10: 287-293.

Blake, S., Lee, M.K., Singer, J., McAllister, P.E. & Nicholson, B.L. (1995). Detection and identification of aquatic birnavirus by polymerase chain reaction assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 835-839.

Blake, S., Ma, J. Y., Caporale, D. A., Jairath, S. & Nicholson, B.L. (2001). Phylogenetic relationships of aquatic birnaviruses based on deduced amino acid sequences of genome segment A cDNA. *Diseases of aquatic organisms*, 45: 89-102.

Buckingham, L. & Flaws, M. (2007). *Molecular Diagnostics. Fundamentals, Methods & Clinical Applications*. F.A. Davis Company. USA.

Delmas, B., Attoui, H., Gosh, S., Malik, Y. S., Mundt, E., Vakharia, V. N. & ICTV Report Consortium. (2019). ICTV virus taxonomy profile: Birnaviridae. *Journal of General Virology*, 100: 5-6.

Carr, J., Williams, D.G. & Hayden, R.T. (2010). *Molecular Detection of Multiple Respiratory Viruses*. En: *Molecular Diagnostics Techniques and Applications for the Clinical Laboratory*. Editado por: Grody W, Nakamura R, Kiechle F y Strom C., pp. 289-300, Academic Press, USA.

Christie, K.E., Ness, S. & Djupvik, H.O. (1990). Infectious pancreatic necrosis virus in Norway: Partial serotyping by monoclonal antibodies. *Journal of Fish Diseases*, 13: 323-327.

Cuesta, A., Chaves-Pozo, E., de las Heras, A. I., Saint-Jean, S., Pérez-Prieto, S. & Tafalla, C. (2010). An active DNA vaccine against infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) with a different mode of action than fish rhabdovirus DNA vaccines. *Vaccine*, 28:3291-3300.

Dobos, P. (1996). The molecular biology of Infectious Pancreatic Necrosis Virus. *Annual Review of Fish Diseases*, 5: 25-54.

Dobos, P. (2001). Birnaviruses. *Encyclopedia of life sciences*, Nature Publishing Group, Canadá.

Dopazo, C. (2020) The infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and its virulence determinants: what is known and that should be known. *Pathogens*, 9: 94.

Duncan, R., Mason, C., Nagy, E., Leding, J. & Dobos, P. (1991). Sequence analysis of Infectious Pancreatic Necrosis Virus genome segment B and its encoded VP1 protein: A putative RNA-Dependent RNA polymerase Lacking the Gly-Asp-Asp Motif. *Virology*, 181: 541-552.

Espinosa, L. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. En L. E. Eguiarte *et al* (Ed.) *Ecología molecular* (pp. 517-536). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.

Frost, P., Havarstein, L.S., Lygren, B., Stahl, S., Endresen, C. & Christie, K.E. (1995). Mapping of neutralization epitopes on infectious pancreatic necrosis viruses. *Journal of General Virology*, 76: 1165-1172.

García-Mondragón, D., Alarcón-Gallego, I., Espinoza-Ortega, A., García-Martínez, A. & Arriaga-Jordán, C. Desarrollo de la producción de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en el Centro de México. *AquaTIC*, 38: 46-56.

Guerrero-García, M. D. (2013). Desarrollo de una RT-PCR en tiempo real (RTq-PCR) para la detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en trucha arcoíris (*Onchorhynchus mykiss*). [Tesis de maestría, Universidad Autónoma del Estado de México]. Repositorio Institucional.]

Heppell, J., Tarrab, E., Lecomte, J., Berthiaume, L. & Arella, M. (1995). Strain variability and localization of important epitopes on the major structural protein (VP2) of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology*, 214: 40-49.

Hill, B. & Way, K. (1995). Serological classification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and other aquatic birnaviruses. *Annual Review of Fish Diseases*, 5:55-77.

Hill, B.J. (1982). Infectious pancreatic necrosis virus and its virulence. En: *Microbial Diseases of Fish*. (ed. por Roberts R), pp. 91-114. Blackwell. London.

Jørgensen, P.E.V. & Kehlet, N.P. (1971). Infectious pancreatic necrosis (IPN) viruses in Danish rainbow trout: Their serological and pathogenic properties. *Nordisk Veterinaermedicin*, 23: 568-575.

Lee, M.K., Blake, S.L., Singer, J.T. & Nicholson B.L. (1996). Genomic variation of aquatic birnaviruses analyzed with restriction fragment length polymorphism. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 62:2513-2520.

López-Lastra, M., Gonzalez, M., Jashes, M. & Sandino, A.M. (1994). A detection method for infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) based on reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Fish Diseases*, 17: 269-282.

Munro, E.S. & Midtlyng, P.J. (2011). Infectious Pancreatic Necrosis and Associated Aquatic Birnaviruses. En: *Fish Diseases and Disorders, Volume 3, 2nd edition* (eds. P. T. K. Woo and D. W. Bruno), CABI, Wallingford, UK. pp. 1-65.

Nishizawa, T., Kinoshita, S. & Yoshimizu, M. (2005). An approach for genogrouping of Japanese isolates of aquabirnaviruses in a new genogroup, VII, based on the VP2/NS junction region. *Journal of General Virology*, 86: 1973-1978.

Noga, J.E. (2000). *Fish Disease. Diagnosis and Treatment. First Edition*. Iowa State Press. Iowa. USA.

OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) (2006). Necrosis pancreática infecciosa. En: Manual de Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos 2006. 6ª ed. (ed. por OIE), pp. 190-199. Organisation Mondiale de la Santé Animale. Francia.

Olabuenaga, S. E. (2000). FISH IMMUNE SYSTEM. *Gayana (Concepción)*, 64 (2): 205-215.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación. (12 de julio de 2021). *Acuicultura*. <http://www.fao.org/aquaculture/es/>

Ortega, S.C., Montes de Oca, R., Groman, D., Yason, C., Nicholson, B. & Blake, S. (2002). Case report: Viral infectious pancreatic necrosis in farmed rainbow trout from Mexico. *Journal of Aquatic Animal Health*, 4: 305-310.

Ørpetveit I, Mikalsen AB, Sindre H, Evensen Ø, Dannevig BH, Midtlyng PJ (2010). Detection of infectious pancreatic necrosis virus in subclinically infected Atlantic salmon by virus isolation in cell culture or real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction: influence of sample preservation and storage. *J Vet Diagn Invest*, 22(6): 886-895.

Pérez-Lozano, A. A. (2018). Patogenia del virus de la necrosis pancreática infecciosa [Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de México]. Repositorio Institucional UAEM.

Ramírez-Pacheco, A., Moreno-Guerrero, S. C. & Medina-Sandson, A. (2013). Herramientas moleculares y su utilidad en el cáncer pediátrico. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 12:3, 162-173.

Reed, L.J. & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene*, 27: 493-497.

Rimstad, E., Hornes, E., Olsvik, Ø. & Hyllseth, B. (1990). Identification of a Double-Stranded RNA Virus by Using Polymerase Chain Reaction and Magnetic Separation of the Synthesized DNA Segments. *Journal of Clinical Microbiology*, 28: 2275-2278.

Rodriguez, S.J., Borrego, J.J. & Perez-Prieto, S.I. (2001). Comparative evaluation of five serological methods and RT-PCR assay for the detection of IPNV in fish. *Journal of Virological Methods*, 97: 23-31.

Rodriguez, S., Borrego, J. & Perez-Prieto, S. (2003). Infectious Pancreatic Necrosis Virus: biology, pathogenesis, and diagnostic methods. *Advances in Virus Research*, 62:113-165.

Rubio-Godoy, M. (2010) Inmunología de los peces óseos: Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 1 (1): 47-57.

SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). (2018): Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca. Editado por la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. Sinaloa. México.

Salgado-Miranda, C. (2006). Necrosis pancreática infecciosa: enfermedad emergente en la truiticultura de México. *Veterinaria México*, 37:4, 467-477.

Salgado-Miranda, C., Corona-Barrera, E., Marín, G.R.A., Palomares, S.M.E., Jurado, C.M., Ortega, S.C. & Soriano-Vargas, E. (2009). Prevalence and distribution of infectious pancreatic necrosis virus in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* from commercial farms in Mexico. Book of Abstracts World Aquaculture 2009. pp. 25-29. Veracruz, Veracruz.

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

Salgado-Miranda, C., Rojas-Anaya, E., García-Espinosa, G. & Loza-Rubio, E. (2020). Virulence of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) isolates from Mexico. *Journal of Veterinary Medical Science*, 82: 394-398.

Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (12 de julio de 2021). *Producción de trucha en el Estado de México*. <https://www.gob.mx/agricultura/edomex/articulos/produccion-trucha-en-el-estado-de-mexico?idiom=es>

Silim, A., Elazhary, S.Y., & Lagacé, A. (1982). Susceptibility of trouts of different species and origins to various isolates of infectious pancreatic necrosis virus. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 39: 1580-1584.

Skjesol, A., Skjæveland, I., Elnæs, M., Timmerhaus, G., Fredriksen, B.N., Jørgensen, S.M., Krasnov, A. & Jørgensen, J.B. (2011). IPNV with high and low virulence: host immune responses and viral mutations during infection. *Virology Journal*, 8: 396.

Suzuki, S., Hosono, N., & Kusuda, R. (1997). Detection of aquatic birnavirus gene from marine fish using a combination of reverse transcription- and nested-PCR. *Journal of Marine Biotechnology*, 5: 205-209.

Torres, P., Eissler, Y., Tapia, D., Espinoza, J.C. & Kuznar, J. (2016). Genotipificación y relación hospedador-específica del virus de la necrosis pancreática infecciosa en Chile. *Journal of Aquatic Research*, 44: 860-868.

Tufiño-Loza, C., Maya-Martínez, J. J., Carrillo-González, A., Neria-Arriaga, D., Salgado-Miranda, C., Rojas-Anaya, E. & Loza-Rubio, E. (2020). Uso de una PCR anidada para el diagnóstico del virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI) en truchas de campo. *Revista Mexicana Ciencias Pecuarias*, 11:3, 811-827.

Wang W.S., Wi Y.L., and Lee J.S. (1997): Single-tube, non-interrumper reverse transcription PCR for detection of infectious pancreatic necrosis virus. *Diseases of Aquatic Organisms*. 28:229-233.

ANEXO 1

CULTIVO CELULAR Y REPLICACIÓN VIRAL

Línea celular BF-2:

A) Inoculación de monocapas celulares.

- i. Se prepara una dilución decimal adicional de los sobrenadates homogeneizados del órgano al 1/10 y se transfiere un volumen apropiado de cada una de las dos diluciones sobre monocapas celulares de 24 horas. Se inoculan al menos 2 cm² de monocapa celular con 100 microlitros de cada dilución.
- ii. Se deja que se adsorba durante 0.5-1 horas y, sin retirar el inóculo, se añade el medio de cultivo celular tamponado a pH 7.6 y suplementado con 2% de suero fetal bovino (FCS) (1 ml/pocillo para placas de cultivo celular de 24 pocillos), y se incuba a 15 °C.

B) Control de la incubación

- i. Se sigue el curso de la infección en cultivos control positivo y en otros cultivos celulares inoculados mediante examen microscópico diario a 40-100 aumentos durante 7 días. Se recomienda el uso de un microscopio de contraste de fases.
- ii. Se mantiene el pH del medio de cultivo celular entre 7.3 y 7.6 durante la incubación. Esto se logra añadiendo al cultivo celular inoculado medio de tampón bicarbonato estéril (para frascos de cultivo celular con cierre hermético) o solución tamponada de Tris (para placas de cultivo celular), o, preferiblemente, utilizando medio tamponado HEPES (ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N-2etanosulfónico).
- iii. Si aparece efecto citopático (ECP) en cultivos celulares inoculados con diluciones de los sobrenadantes o los homogeneizados, se deben emprender inmediatamente procedimientos de identificación del VNPI.

ANEXO 2

Método Reed & Muench.

1. Registrar los datos al inocular cultivo celular.
2. Realizar diluciones del virus 1/10.
3. Contabilizar el número de infectados y el número de no infectados, registrar los datos.
4. Calcular el valor acumulado de infectados y no infectados.
5. Estimar la proporción infectada.
6. Obtener el porcentaje.
7. Ubicar los datos inmediatos con valores mayores del 50%, así como los datos inmediatos con valores menores al 50%.
8. Estimar el título del virus utilizando la siguiente fórmula:

$$DIE_{50} = \frac{\% \text{ de infección por encima del } 50\% - 50\%}{\% \text{ de infección por encima del } 50\% - \% \text{ de infección por debajo del } 50\%} \times \log 10$$

ANEXO 3

Protocolo kit QIAamp Viral RNA Mini: Protocolo de centrifugado.

1. Pipetear 560 microlitros del Buffer AVL preparado con *Carrier RNA* en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml.
2. Añadir 140 microlitros de supernadante de cultivo celular al tubo con el buffer y el *Carrier RNA*. Mezclar con el vórtex por 15 segundos.
3. Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.
4. Centrifugar brevemente.
5. Añadir 560 microlitros de etanol (96%) a la muestra, mezclar en vórtex por 15 segundos. Después, centrifugar brevemente.
6. Añadir 630 microlitros de la solución del paso 5 a una columna QIAamp Mini (dentro de un tubo de recolección de 2 ml) sin tocar la membrana. Cerrar el tubo, centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto. Colocar la columna en un tubo de recolección nuevo y descartar el filtrado.
7. Abrir la columna QIAamp Mini, repetir paso 6.
8. Abrir la columna QIAamp Mini y añadir 500 microlitros de Buffer AW1. Cerrar la columna, centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto. Colocar la columna en un tubo de recolección nuevo y descartar el filtrado.
9. Abrir la columna QIAamp Mini y añadir 500 microlitros de Buffer AW2. Cerrar la columna, centrifugar a 14,000 rpm por 3 minutos. Colocar la columna en un tubo de recolección nuevo y descartar el filtrado.
10. Colocar la columna QIAamp Mini en un tubo de recolección nuevo. Centrifugar a 14,000 rpm por 1 minuto.
11. Colocar la columna en un tubo de microcentrífuga. Descartar el filtrado. Abrir la columna QIAamp Mini y añadir 60 microlitros de Buffer AVE a temperatura ambiente. Cerrar e incubar por 1 minuto a temperatura ambiente.
12. Centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto. Guardar muestra.

ANEXO 4

RT-PCR: kit iScript™ Select cDNA Synthesis: Protocolo de RT-PCR.

1. Descongelar componentes excepto *iScript reverse transcriptase*. Mezclar los componentes y centrifugar brevemente antes de usar. Poner los componentes en hielo.
2. Añadir los siguientes componentes a un tubo de PCR: 4 microlitros de *5x iScript select reaction mix*, 2 microlitros de *Oligo(dT)₂₀ primer or random primer*, muestra de ARN y agua libre de nucleasas para dar un total de 20 microlitros.
3. Mezclar gentilmente e incubar por 5 minutos a 25 °C, después 30 min a 42 °C.
4. Incubar a 85 °C por 5 minutos.
5. Guardar producto de ADNc a -20 °C.
6. El producto se puede utilizar directamente para amplificar por medio de una PCR.