



UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**“DETECCIÓN DE *Renibacterium salmoninarum* EN TRUCHA ARCO IRIS
(*Oncorhynchus mykiss*) DE GRANJAS COMERCIALES
DEL ESTADO DE MÉXICO”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA
SELENE ZAMUDIO NEGRETE

ASESORES

M en C. CELENE SALGADO MIRANDA
M en C. LUIS FERNANDO VEGA CASTILLO
MVZ. SALVADOR LAGUNAS BERNABE

REVISORES:

DR. CESAR ORTEGA SANTANA
QFB. HECTOR ROBERTO DIAZ GUADARRAMA



TOLUCA MEXICO, SEPTIEMBRE DE 2013.

DEDICATORIA

A mis padres, Margarita y Delfino, por ser un ejemplo en mi vida, por todos los sacrificios que han hecho por mí y por darme siempre y a manos llenas su amor, apoyo y confianza incondicionalmente.

A mis hermanos, Karina y Víctor Manuel, por el amor que nos une y por las experiencias compartidas. Karina gracias por compartir conmigo siempre cada momento de mi vida, en especial gracias por la compañía en aquellas noches de desvelo.

A mi pequeño Maximiliano, por ser la fuerza que necesitaba en mi vida, la fuente de mis alegrías y esperanzas. Más que una dedicatoria, esta es una promesa de lo que lograré por ti.

A mis amigos, hermanos por elección: Paty, Laura, Alma, Neto, Liz, por los buenos y malos momentos, por las risas, y las angustias compartidas, pero sobretodo por ser parte de mi vida y por permitirme ser parte de las suyas.

A todas las personas que de una u otra manera influyeron en mí para ser quién soy hoy.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme llegar a este momento y por las bendiciones que me da día a día.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México.

Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, por todas las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

A mis asesores de tesis, M. en C. Celene Salgado Miranda, M. en C. Luis Fernando Vega Castillo y M. V. Z. Salvador Lagunas Bernabé, por todo su apoyo, paciencia y los conocimientos aportados.

A mis revisores de tesis, Dr. César Ortega Santana y Q. F. B. Héctor Roberto Díaz Guadarrama por su ayuda y valioso tiempo para mejorar este trabajo.

FINANCIAMIENTO

El presente trabajo de investigación forma parte del proyecto “Estandarización de la técnica de ELISA (ensayo inmunoenzimático) para la detección de *Renibacterium salmoninarum* en especímenes de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*)” financiado por el Comité de Sanidad Acuícola del estado de México. Número de contrato 110093, UAEM.

TÍTULO

Detección de *Renibacterium salmoninarum* en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) de granjas comerciales del estado de México.

ÍNDICE

	Página
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA	5
LA TRUTÍCULTURA EN MÉXICO	5
ENFERMEDADES BACTERIANAS	7
ENFERMEDAD BACTERIANA DEL RIÑÓN	8
INSTITUCIONES FEDERALES: SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN Y EL SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD, INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA.....	12
DIRECCIÓN GENERAL DE SALUD ANIMAL	15
DIRECCIÓN DE SANIDAD ACUÍCOLA Y PESQUERA	17
JUSTIFICACIÓN	20
HIPÓTESIS.....	21
OBJETIVOS.....	22
MATERIAL.....	23
MÉTODO	25
TAMAÑO DE MUESTRA	27
GRANJAS PARTICIPANTES.....	27
COLECCIÓN DE LA MUESTRA	29
EVALUACIÓN DEL EVENTO.....	29
<i>Historia clínica</i>	29
<i>Sacrificio de los organismos</i>	30
<i>Medición de organismos</i>	30
<i>Técnica de disección</i>	31
<i>Toma y procesamiento de la muestra:</i>	31
<i>Ensayo inmunoenzimático</i>	32
<i>Análisis de datos</i>	32
LÍMITE DE ESPACIO	33
LÍMITE DE TIEMPO	34
DISCUSIÓN	39

CONCLUSIONES	48
SUGERENCIAS.....	50
BIBLIOGRAFÍA	51
ANEXO A.....	62
ANEXO B.....	63
ANEXO C.....	63
ANEXO D.....	68
ANEXO E.....	69

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Granjas de trucha arco iris en el estado de México.....	25
Cuadro 2. Volumen de la producción de trucha arco iris (en peso vivo) por municipio.	27
Cuadro 3. Número de granjas comerciales de trucha arco iris muestreadas por municipio y número de muestras colectadas en cada una.	28
Cuadro 4. Número de muestras de fluido ovárico y seminal colectadas por municipio.....	29
Cuadro 5. Tallas de los organismos de trucha arco iris incluidos en el estudio.	30
Cuadro 6. Peso de los organismos de trucha arco iris incluidos en el estudio.	30
Cuadro 7. Número de granjas comerciales de trucha arco iris muestreadas por municipio y los resultados obtenidos en cada una de ellas.	36
Cuadro 8. Resultados de la prueba de ELISA para BKD a partir de muestras de riñón y fluidos gonadales.	36
Cuadro 9. Tipo de estanques presentes en las granjas.....	37
Cuadro 10. Tipo de alimento proporcionado a los peces.....	37
Cuadro 11. Origen del agua utilizada en los estanques.....	38
Cuadro 12. Procedencia de los peces.	38
Cuadro 13. Uso de tapetes sanitarios.....	38
Cuadro 14. Tratamientos preventivos llevados a cabo en los organismos de trucha arco iris. .	38

RESUMEN

DETECCIÓN DE *Renibacterium salmoninarum* EN TRUCHA ARCO IRIS (*Oncorhynchus mykiss*) DE GRANJAS COMERCIALES DEL ESTADO DE MÉXICO

Tesista: Selene Zamudio Negrete

Asesores: M. en C. Celene Salgado Miranda, M. en C. Luis Fernando Vega Castillo y
M. V. Z. Salvador Lagunas Bernabé

Tesis de Licenciatura, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad
Autónoma del Estado de México

La enfermedad bacteriana del riñón (BKD, por sus siglas en inglés: Bacterial Kidney Disease), es una patología infecciosa causada por la bacteria *Renibacterium salmoninarum*. Esta bacteria puede provoca una enfermedad crónica y mortalidad en salmónidos juveniles de entre 6 y 12 meses de edad y en los adultos antes del desove. En nuestro país, la enfermedad se clasifica en las Normas Oficiales Mexicanas: NOM-010-PESC-1993 y NOM-011-PESC-1993 como certificable. Con el objetivo de determinar la existencia de *R. salmoninarum*, en organismos de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) de granjas comerciales del estado de México, se realizó un muestreo por conveniencia. Se incluyeron 100 unidades de producción de trucha arco iris de los 16 principales municipios productores de la especie, tomando en cuenta su volumen de producción. De cada granja, se obtuvo un organismo vivo de trucha arco iris. Asimismo, se obtuvieron 86 muestras de fluidos gonadales de reproductores de una granja del municipio de Ocoyoacac: 58 de fluido ovárico y 28 de líquido seminal. Obteniéndose un total de 186 muestras. A partir de los organismos vivos, se realizó la necropsia y se procedió a tomar una muestra de riñón. Las muestras fueron procesadas de manera individual para ser analizadas por la técnica inmunoenzimática (ELISA). El 100% de las muestras analizadas (riñón y fluidos gonadales), fueron negativas a la bacteria *Renibacterium salmoninarum*. En cada granja, se aplicó una encuesta para determinar posibles factores de riesgo asociados a la bacteria. La información obtenida en las encuestas, indica que existen medidas que ayudan a controlar el ingreso de agentes infecciosos a las granjas de trucha arco iris; como el uso de agua de manantial en el 100% de las granjas encuestadas, el uso de concentrados comerciales para la alimentación de los peces y el hecho de que el 97% de las mismas obtiene a sus peces dentro del territorio nacional. Sin embargo, fueron detectados factores de riesgo; ya que en el 64% de las granjas, no se utiliza ningún tipo de desinfectante en los equipos y artes de pesca y que tan sólo el 60% realiza algún tipo de tratamiento preventivo a los peces que entran a las granjas. Siendo estas actividades consideradas de riesgo para la introducción de patógenos que afectan a los peces. El presente trabajo contribuye al conocimiento de la situación sanitaria de los principales municipios productores de la trucha arco iris a nivel estatal, permitiendo establecer estrategias de prevención y control de esta bacteria y la enfermedad que provoca en las granjas trutícolas.

Palabras clave: *Renibacterium salmoninarum*, trucha arco iris, granjas comerciales, ELISA, vigilancia epidemiológica, desinfección.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, México ha iniciado un repunte en el desarrollo de la acuicultura, debido al incremento en el número de granjas acuícolas y en la diversidad de especies cultivables, tales como carpa (*Cyprinus* spp.), tilapia (*Oreochromis* spp.), bagre (*Ictalurus punctatus*) y trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Siendo el cultivo de estas especies uno de los principales recursos acuiculturales de México (Caballero, 1992). Durante el año 2010, la participación de la truticultura en la producción nacional fue de 9,212 toneladas, año en que el estado de México se posicionó nuevamente como el principal productor de la especie, con 3,046 toneladas de peso vivo (SAGARPA, 2010).

La importancia de las enfermedades bacterianas en los peces no es solamente por la pérdida económica que ocasionan en los diferentes tipos de producción piscícola, sino por el impacto sobre las poblaciones naturales de peces y la amenaza que representan algunos agentes a la salud humana (de Kinkelin *et al.*, 1991).

Dentro de las enfermedades consideradas de riesgo para los salmónidos se encuentra la enfermedad bacteriana del riñón (BKD, por sus siglas en inglés: bacterial kidney disease), causada por *Renibacterium salmoninarum*. Esta enfermedad fue inicialmente reportada en Escocia en 1931 y desde entonces en varios países alrededor del mundo se ha reportado, entre ellos: Inglaterra, Francia, Alemania, Islandia, Italia, Japón, España, Turquía, Canadá, Estados Unidos de América, Chile y la península de los Balcanes (Inglis *et al.*, 1993; Magnusson *et al.*, 1994).

La enfermedad es crónica y la mortalidad ocurre en peces juveniles de entre 6 y 12 meses de edad y en los adultos antes del desove (Goodfellow *et al.*, 1985). La diseminación de BKD ha tenido una rápida expansión en el cultivo del salmón. *Renibacterium salmoninarum* es uno de los pocos patógenos bacterianos que se conoce, se transmiten de manera vertical *intraovum* durante la maduración del huevo (Bruno *et al.*, 1986) y de manera horizontal por la vía orofecal (Balfry *et al.*, 1996). Las infecciones *intra ovo* pueden generar la transmisión de algunas células bacterianas y la enfermedad puede o no volverse activa en la vida posterior después de un prolongado período de incubación y quizá por los cambios fisiológicos inducidos, por cambios en la calidad y temperatura del agua, el estado nutricional, o por cambios hormonales, tal como sucede durante el desove (Starliper y Teska, 1995). La profilaxis y la prevención son un reto debido a la capacidad de la bacteria de sobrevivir a la fagocitosis y de replicarse en los macrófagos (Grayson *et al.*, 2002).

En la truticultura mexicana existen pocos estudios que aborden la ocurrencia de enfermedades en unidades de producción. Durante los años 1997 y 1998 se realizó un estudio bacteriológico en algunas granjas de trucha del estado de México. El trabajo reportó el aislamiento de *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Aeromonas salmonicida*, *Pseudomonas* spp., *Aeromonas hydrophila*, *Flexibacter* spp., y *Yersinia* spp. (Vega, 2001).

Así mismo, en el 2009 se realizó un estudio epidemiológico para identificar los agentes bacterianos que afectan a la trucha arco iris de los Estados Unidos Mexicanos. Los resultados del estudio reportan la presencia de bacterias notificables pero no certificables en trucha arco iris de los principales estados productores de esta especie (Salgado-Miranda *et al.*, 2010). Asimismo, según la NOM-010-PESC-1993 (Anexo D) *Renibacterium salmoninarum* es considerado como agente certificable, es decir; de alto riesgo, no tiene tratamiento actual

conocido y es de difícil control. A la fecha, en los Estados Unidos Mexicanos no se cuenta con información sobre la presencia o ausencia de BKD.

En el período de tiempo de 2008 a 2010 se introdujeron a nuestro país, específicamente al estado de México, ovas oculadas de trucha provenientes de Estados Unidos de América, Dinamarca, Chile, Sudáfrica, Irlanda del Norte e Inglaterra (SENASICA¹). La introducción indiscriminada y sin control sanitario de organismos acuáticos vivos, de un país a otro y su posterior movilización en las instalaciones acuícolas del país han sido el mecanismo a través del cual se dispersaron diferentes agentes causales de enfermedades. Lo anterior plantea la necesidad de establecer mecanismos, medidas y acciones para minimizar estos riesgos y consecuentemente las pérdidas que se ocasionan por mortalidad, en especial cuando no se dispone de tratamientos efectivos para su control (NOM-010-PESC-1993).

A la fecha diversos procedimientos han sido utilizados para diagnosticar BKD, entre ellos los siguientes: ELISA (ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas), FAT (tinción de anticuerpos fluorescentes), cultivo bacteriano, Inmunohistoquímica, anticuerpos mono y policlonales, Western Blot (Randall *et al.*, 1995) y métodos basados en la (PCR) reacción en cadena de la polimerasa (Chase y Pascho, 1998).

La ELISA es un método rápido, de gran sensibilidad, especificidad y bajo costo. Entre sus principales ventajas pueden citarse: su alta sensibilidad que permite la detección de concentraciones muy bajas de antígenos o anticuerpos, la rapidez y precisión en la ejecución del método, la posibilidad de utilización de extractos

¹ Comunicación personal, M. V. Z. Fernando Vergara Domínguez, encargado de Despacho de la Subdelegación de pesca de SAGARPA del estado de México.

crudos y detección de antígenos fragmentados y de diferente tamaño, la especificidad en la detección que permite la diferenciación y estudio de serotipos y relaciones antigénicas, la factibilidad de automatización, estandarización y empleo para pruebas de diagnóstico masivo, la fácil conservación de los reactivos por períodos largos y el bajo costo de determinación y requerimiento de equipamiento simple (Peralta y Frías, 1987).

El presente trabajo tiene por objeto determinar la presencia de antígenos de BKD mediante la técnica de ELISA directa, a partir de muestras de riñón y fluidos gonadales de trucha arco iris de granjas comerciales del estado de México, lo cual contribuirá con el conocimiento del estado sanitario de la truticultura de la entidad federal, respecto a las enfermedades certificables, dentro de las actividades fundamentales de vigilancia epidemiológica nacional en materia de sanidad acuícola.

REVISIÓN DE LITERATURA

LA TRUTÍCULTURA EN MÉXICO

El cultivo de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) comenzó a principios del siglo XIX en los Estados Unidos de América, Europa y Japón, y desde entonces ésta actividad se ha desarrollado progresivamente en todo el mundo, lo que ha permitido adelantos significativos en la calidad del producto, genética, alimentación, insumos y servicios (Bernabé, 1991).

En México, uno de los pioneros en darle formalidad a la acuicultura y comprender las posibilidades fue sin duda Esteban Cházari, quién en 1883 publicó su obra “Piscicultura de agua dulce”, con lo cual puso de manifiesto la trascendencia que esta actividad podría representar para el desarrollo económico (Rodríguez y Cortés, 2003).

El primer centro acuícola para la producción de esta especie, fue el Vivero Nacional de Chimalapan, construido en 1883, en Lerma, estado de México y hacia 1893, se produjeron las primeras crías las cuales fueron liberadas en algunos ríos y lagos. Es hasta 1923 en que se retoma la importancia de la piscicultura con la reintroducción de ovas oculadas provenientes de los Estados Unidos de América. Posteriormente en 1937, se inicia el funcionamiento de la Estación Piscícola de Almoloya del Río, que fue la segunda que operó en nuestro país, iniciando con 300,000 ovas. Después, se pasó a Ocoyoacac donde se construye la Estación Piscícola “El Zarco” que se inaugura en 1943, a partir de entonces se inicia la producción controlada de esta especie, que dio como resultado que se ampliara la distribución geográfica. En la actualidad el cultivo de trucha se realiza en las entidades de Chihuahua, Coahuila, Durango, Nuevo León, Zacatecas, San Luis

Potosí, Jalisco, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Michoacán, México, Tlaxcala, Morelos, Puebla, Veracruz, Guerrero, Oaxaca y Chiapas (Rodríguez y Cortés, 2003). Durante el año 2010, el estado de México produjo 3,046 toneladas de peso vivo, ubicándolo nuevamente por 10 años consecutivos como el principal productor a nivel nacional de esta especie (SAGARPA, 2010). Sin embargo, en México la demanda de trucha arco iris es superior a la oferta, razón por la cual se importa de otros países, especialmente de Estados Unidos de América (SAGARPA, 2003; SAGARPA 2004).

En las principales regiones de producción trutícola en México, se distinguen granjas con diferentes niveles de integración tecnológica y capacidad de producción, dominando las pequeñas granjas con estanques rústicos, en donde los propios dueños o encargados asignados por los consejos ejidales aportan el trabajo (Juárez y Palomo, 1987). Según cifras del anuario estadístico de pesca, durante el 2010 se produjeron 9,212 toneladas de trucha a nivel nacional (SAGARPA, 2010).

Por otra parte, en México existen granjas que cuentan con sistemas de producción intensivos y que en conjunto son las responsables de aproximadamente el 60% de la producción nacional. Están constituidas como empresas formales, contratan personal, lo que representa además, ingresos para otras familias en las comunidades en las que se localizan (Guevara y Vergara, 1999). Sus capacidades de producción son mayores que las de las granjas rústicas, pero también con mayores costos de operación. Sin embargo, el avance de la actividad ha sido lento, en comparación con otros países, el nuestro se encuentra atrasado en cuanto a los rendimientos logrados en los sistemas de producción. Las alternativas que existen para el país se muestran optimistas, pero hay que demostrar tenacidad y deseos de alcanzar un buen nivel de producción que permita mejorar la condición socioeconómica de los productores (Cifuentes *et al.*, 1997).

Entre los principales aspectos para obtener éxito en las actividades pecuarias, está mantener a los animales en buenas condiciones de salud. Para ello, se debe impedir el contacto de los peces con otros animales y artes de pesca pertenecientes a otras unidades de producción acuícola que puedan contagiarlos de enfermedades infecciosas y también se debe procurar darles el medio adecuado para que no padezcan de problemas que tengan que ver con la calidad del ambiente en que se encuentran. En realidad, la mayoría de los agentes infecciosos que pueden causar enfermedades se encuentran presentes en los lugares donde existen peces, este hecho no significa que estos últimos deban enfermarse inmediatamente, ya que habitualmente viven juntos en el agua y no se presentan problemas hasta que ocurren cambios o variaciones que agreden esta normalidad y alguno de ellos se ve afectado (Ortega, 1998).

ENFERMEDADES BACTERIANAS

Por enfermedad se entiende cualquier desviación del estado normal de salud, e incluye condiciones patológicas como resultado de factores genéticos, fisiológicos, nutricionales, ambientales y de la condición infecciosa causada por el patógeno. Las enfermedades bacterianas de los peces son una limitante en la producción piscícola, las cuales pueden presentarse en forma esporádica o periódica repercutiendo en el rendimiento del pez, lo cual afecta la economía del productor (Jiménez, 1986).

Al hablar de enfermedades bacterianas en peces, se deben contemplar las siguientes categorías:

Enfermedades causadas por patógenos primarios, específicos u obligados, los cuales son capaces de iniciar una enfermedad por sí mismos y cuyo modo de vida

es la infección y constituyen un riesgo continuo para las especies en cultivo. Entre ellas destacan las causadas por *Renibacterium salmoninarum* y *Aeromonas salmonicida* (Espinosa de los Monteros y Laborta, 1988).

Enfermedades causadas por patógenos secundarios, inespecíficos u oportunistas, mismos que tienen capacidad limitada de invasión y requieren un factor que favorezca su acción y pueda provocar enfermedad, y normalmente son parte de la microbiota acuática. Por ejemplo: *Vibrio* spp. *Pseudomonas fluorescens* y *Aeromonas hydrophila* (Espinosa de los Monteros y Laborta, 1988).

La identificación del agente bacteriano en el diagnóstico de las enfermedades que afectan a los peces se puede realizar por diversos métodos. Los métodos de identificación establecidos pueden ser pruebas fisicoquímicas, estudios serológicos y genéticos (Roberts, 1981). Siendo los serológicos los más frecuentemente sugeridos por su bajo costo y su capacidad para analizar grandes números de muestras simultáneamente. La técnica inmunoenzimática ELISA (ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas) es un método rápido de gran sensibilidad, especificidad, y bajo costo, que supera a muchas de las técnicas de diagnóstico empleadas con anterioridad, por lo que su uso se ha extendido rápidamente a diversos campos de la patología humana, animal y vegetal (Peralta y Frías, 1987).

ENFERMEDAD BACTERIANA DEL RIÑÓN

La renibacteriosis es una enfermedad de distribución mundial, muy importante para los cultivos de peces salmónidos o en estado silvestre. Actualmente la enfermedad esta presente en países como Dinamarca (Pedersen *et al.*, 2008), Suiza (Jansson *et al.*, 2008), Escocia, Noruega, Islandia, Inglaterra, Gales,

Estados Unidos de América, Canadá, Suecia y Alaska (Grayson *et al.*, 2000). Los salmónidos varían en su susceptibilidad, y generalmente se considera que las especies del género *Oncorhynchus* son las más susceptibles. Debido a que *Renibacterium salmoninarum* es a menudo endémico en las poblaciones de salmónidos silvestres, las medidas para controlar la transmisión horizontal pueden anularse por la exposición constante de los criaderos a la bacteria transmitida por el agua mediante descargas originadas por peces silvestres que residen aguas arriba de los criaderos (Wiens y Kaattari, 1999).

El agente causal de la enfermedad bacteriana del riñón, es la bacteria *Renibacterium salmoninarum* (Sanders y Fryer, 1980). Los peces severamente afectados con BKD pueden no mostrar signos externos obvios de la enfermedad, o presentar uno o varios de los siguientes: agallas pálidas como indicio de anemia, exoftalmia, distensión abdominal debido a la ascitis, oscurecimiento de la piel, letargia hemorragias perianales, vesículas y úlceras en la piel. El examen interno revela ascitis en la cavidad abdominal y el pericardio, hemorragias en la pared abdominal y en las vísceras y una membrana blanquecina en los órganos abdominales, así como lesiones granulomatosas de color blanco cremoso en el riñón, bazo e hígado. A la histopatología, se observa una reacción inflamatoria granulomatosa, como respuesta del hospedero por encapsular al patógeno. Es evidente un avanzado daño tisular, proliferación de macrófagos y deposición de complejos inmunes en el bazo e hígado. Además, puede haber líquido turbio en la cavidad abdominal, hemorragias en la pared del abdomen y en las vísceras y una pseudomembrana difusa y blanca en uno o más de los órganos internos. En cortes tisulares de las lesiones se observa frecuentemente a la bacteria dentro de células fagocíticas, particularmente en macrófagos. La muerte se atribuye a una disfunción orgánica generalizada y falla cardiaca (Inglis *et al.*, 1993).

Renibacterium salmoninarum, es un bacilo Gram positivo, forma colonias amarillo crema, convexas y suaves de diferentes tamaños en el agar Kidney Disease Medium (KDM) (Sanders y Fryer, 1980). La bacteria vive tanto intracelular como extracelularmente en el hospedero y se ha demostrado que puede sobrevivir e incluso multiplicarse dentro de los macrófagos (Halaihel *et al.*, 2008).

Varios medios han sido desarrollados para aislar al microorganismo y mejorar su crecimiento, incluidos los siguientes: el agar con sangre y cisteína, que fue llamado “Kidney Disease Medium”, el “Agar Carbón”. Evelyn en 1977 desarrolló el “Kidney Disease Medium 2”, el cual contenía 1% de peptona, 0.05% de extracto de levadura, 0.1% de cisteína y 20% de suero. Mismo que permitió el aislamiento primario del microorganismo. Y el “Selective Kidney Disease Medium” que es el más ampliamente utilizado para medios de diagnóstico. El crecimiento a partir de especímenes con lesiones macroscópicas usualmente ocurre dentro de 4 a 10 días, pero en infecciones clínicas o subclínicas, el crecimiento a partir de tejidos de peces es lento en todos los medios y a menudo requiere de varias semanas de incubación (Sanders y Fryer, 1980). La incubación mínima de 12 semanas para cultivos primarios es recomendable para detectar niveles bajos de la bacteria en los tejidos de los portadores sanos (Hirvelä-Koski *et al.*, 2006), a una temperatura de 15 a 18 °C, pero hay que tener cuidado, ya que el crecimiento se inhibe a 25 °C (Wiens y Kaattari, 1999).

Un problema frecuente en el cultivo de *Renibacterium salmoninarum* es la contaminación con bacterias heterotróficas, que crecen mucho antes y pueden invadir la caja del cultivo completamente (Austin *et al.*, 1983). Asimismo, *Renibacterium salmoninarum* es extremadamente sensible a algunos de los componentes del medio (Evelyn *et al.*, 1990). En general, el cultivo bacteriológico es relativamente difícil (Reinchenbach-Klinke, 1980). Debido a lo anterior, se han propuesto otros métodos de diagnóstico, entre los que destacan, el aislamiento

bacteriológico, la ELISA, la tinción de anticuerpos fluorescentes, la inmunohistoquímica y Western Blot (Randall *et al.*, 1995).

En el estado de México durante los años 1997 y 1998 se realizó un estudio mediante aislamiento bacteriológico en granjas productoras de trucha arco iris, el cual reportó la identificación de *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Aeromonas salmonicida*, *Pseudomonas* spp., *Aeromonas hydrophila*, *Flexibacter* spp., y *Yersinia* spp. (Vega, 2001). Posteriormente se realizó un estudio de aislamiento e identificación de bacterias notificables pero no certificables en trucha arco iris de diferentes estados del país, sin embargo no se reportó la presencia de *Renibacterium salmoninarum* (Salgado-Miranda *et al.*, 2010).

Asimismo de acuerdo a datos del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), no existen antecedentes o indicios patológicos de la presencia de BKD, la cual se trata de una enfermedad crónica y sistemática caracterizada por una reacción granulomatosa con marcada afinidad por el tejido renal (Wolke, 1975) y debido a la capacidad del patógeno de evadir la respuesta inmune del organismo, los peces pueden llegar a ser portadores asintomáticos (Evelyn, 1993).

Los antibióticos y vacunas disponibles no controlan satisfactoriamente la transmisión de BKD, los programas de control requieren vigilancia con técnicas validadas de detección y deben ser reforzadas por restricción de movilización sacrificio y desinfección adecuados (Jansson *et al.*, 2008).

INSTITUCIONES FEDERALES: SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN Y EL SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD, INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA

En la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal, de los Estados Unidos Mexicanos, se le delega a la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), entre otros asuntos: “Vigilar el cumplimiento y aplicar la normatividad en materia de sanidad animal y vegetal; fomentar los programas y elaborar normas oficiales de sanidad animal y vegetal; atender, coordinar, supervisar y evaluar las campañas de sanidad, así como otorgar las certificaciones relativas al ámbito de su competencia” (Ley Orgánica de la Administración Pública Federal, 1976).

Posteriormente, en la Ley General de Pesca y Acuicultura Sustentables (LGPAS) (2007), se refiere en el Título Décimo Primero de la Sanidad, Inocuidad y Calidad, Capítulo I de la Sanidad de Especies Acuícolas, Artículo 103, que la SAGARPA “ejercerá sus atribuciones y facultades en materia de sanidad de especies acuícolas a través del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), de conformidad con esta Ley, sus disposiciones reglamentarias, las normas oficiales que de ella deriven y los demás ordenamientos que resulten aplicables”. Asimismo, en el Artículo 104, la Secretaría expedirá las Normas Oficiales Mexicanas y establecerá las medidas de diagnóstico, detección, erradicación, prevención, y control para evitar la introducción y dispersión de enfermedades, determinar y clasificar las patologías de alto riesgo; así como para evaluar los daños, restaurar las áreas afectadas y establecer procesos de seguimiento; y en el Artículo 105, menciona que: “Requerirán de certificado de sanidad acuícola, de manera previa a su realización, las siguientes actividades”:

- I. La importación y exportación y tránsito internacional de especies acuáticas, sus productos y subproductos y de productos biológicos, químicos, farmacéuticos o alimenticios para uso o consumo de dichas especies.
- II. La movilización de especies acuícolas vivas, en cualesquiera de sus fases de desarrollo, que se cultiven en instalaciones ubicadas en el territorio nacional, que se haga de una unidad de producción acuícola a otra, así como sus productos y subproductos y de productos biológicos, químicos, farmacéuticos o alimenticios para uso o consumo de dichas especies.
- III. Los establecimientos en operación en los que se produzcan, procesen, comercialicen, transporten y almacenen productos y subproductos acuícolas, así como productos químicos, biológicos, farmacéuticos y alimenticios para el uso o consumo de dichas especies.
- IV. Uso y aplicación de antibióticos, medicamentos veterinarios, aditivos y demás sustancias químicas a los organismos de cultivo.
- V. La introducción de especies acuícolas vivas a un cuerpo de agua de jurisdicción federal.

Asimismo, en el Artículo 107, señala que “Los certificados de sanidad acuícola podrán ser expedidos directamente por el SENASICA o a través de los organismos de certificación, acreditados y aprobados en términos de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización y del reglamento de esta Ley. Los Comités de Sanidad Acuícola serán órganos auxiliares para que el SENASICA lleve a cabo la prevención, diagnóstico y control de enfermedades. Y en el Artículo 108, que “Las Entidades Federativas, se coordinarán con la Secretaría, con el objeto de:

- I. Organizar, apoyar y supervisar el funcionamiento de los Organismos Auxiliares.
- II. Inducir el cumplimiento de las disposiciones legales y las medidas de seguridad de sanidad acuícola establecidas.

III. Difundir permanentemente la información y conocimientos sobre sanidad acuícola.

IV. Realizar acciones de saneamiento acuícola.

Otra sección de la LGPAS (2007) de gran importancia es el Capítulo II De Las Medidas Sanitarias, Artículo 109; el cual establece que Las medidas sanitarias tienen por objeto prevenir, controlar, combatir y erradicar enfermedades y plagas de las especies acuáticas vivas, con la finalidad de proteger su salud y la del hombre. Las medidas sanitarias serán establecidas por el SENASICA. Corresponde a la Secretaría con la opinión del SENASICA la emisión de normas oficiales relativas a esta materia, y cuando la situación lo amerite, podrán ser emergentes. Las normas oficiales podrán comprender alguna o algunas de las siguientes medidas:

- I. Campañas sanitarias, entendidas como el conjunto de medidas para prevenir, controlar o erradicar enfermedades o plagas de las especies acuáticas vivas en un área o zona determinada.
- II. La cuarentena, siendo una medida basada en el aislamiento, observación y restricción de la movilización de especies acuáticas vivas, por la sospecha o existencia de una enfermedad de las mismas, sujeta a control.
- III. El diagnóstico e identificación de enfermedades y plagas de las especies mencionadas.
- IV. La retención y disposición de especies acuáticas vivas, sus productos, subproductos y productos químicos, farmacéuticos, biológicos y alimenticios, para uso o consumo de dichas especies, que puedan ocasionar enfermedades o plagas en los mismos.
- V. Las demás que se establezcan en las propias normas oficiales, así como aquellas que, conforme a los avances y adelantos científicos y tecnológicos, sean eficaces para la atención de cada caso de enfermedad o plaga.

DIRECCIÓN GENERAL DE SALUD ANIMAL

Las acciones de Salud Animal en México, empiezan a tener un carácter formal y organizado a partir del gran brote de la enfermedad vesicular que se presentó en el estado de Tabasco el año de 1925 y fue erradicado en 1926. Este episodio sentó las bases para que en 1933 se creara en la Secretaría de Agricultura y Fomento, una Oficina de Sanidad Animal antecedente de la actual Dirección General de Salud Animal (DGSA). La experiencia acumulada en cuanto a sistemas de vigilancia epidemiológica, aplicación de medidas de cuarentena exterior y control de la movilización de animales, sus productos y subproductos, desinfección, vacunaciones masivas y su apoyo logístico, fueron determinantes para el despegue definitivo de los Servicios Veterinarios del país que hoy incorporan los servicios de medicina preventiva, de reglamentación y servicios, incluidos los de diagnóstico que han permitido enfrentar exitosamente las nuevas demandas de servicios emanadas de los compromisos adquiridos por México al ingresar a la Organización Mundial de Comercio y que motivaron la creación de la nueva Dirección de Vigilancia Epidemiológica, dentro de la DGSA en el año 2000, responsable de atender los nuevos retos de la globalización en aspectos tales como: la certificación del estatus sanitario del país, la realización de estudios de análisis de riesgo, la administración de las áreas libres de plagas y enfermedades y la incorporación de las acciones de trazabilidad y rastreabilidad y bienestar animal en el ámbito sanitario nacional (SENASICA, 2012a).

Con el fin de apoyar el mejoramiento de la producción, la comercialización y el desarrollo de la productividad nacional en materia pecuaria, la DGSA del SENASICA, organiza, coordina y genera la normatividad de los servicios de salud de la ganadería nacional. Sus principales acciones se citan a continuación (SENASICA, 2012b):

- I. Promover, fomentar, organizar, vigilar, coordinar y evaluar, las actividades de las campañas zoonosanitarias, el análisis de riesgo, la regionalización, la trazabilidad y la rastreabilidad, el bienestar animal, con la participación de diversas dependencias y entidades de la administración pública federal, gobiernos estatales y municipales, así como de la iniciativa privada.
- II. Normar, coordinar y supervisar la operación del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica y del Dispositivo Nacional de Emergencia de Salud Animal (DINESA), así como organizar el Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal (CONASA).
- III. Proponer anteproyectos de Normas Oficiales Mexicanas y de emergencia en materia zoonosanitaria, así como vigilar y certificar su cumplimiento y mantener actualizado y en operación el Comité Consultivo Nacional de Normalización de Protección Zoonosanitaria (CONAPROZ).
- IV. Determinar las políticas y lineamientos en materia de diagnóstico, determinación de residuos tóxicos, constatación y referencia en salud animal, a través del Centro Nacional de Diagnóstico en Salud Animal (CENASA) y del Centro Nacional de Constatación en Salud Animal (CENAPA), para su aplicación por parte de las entidades públicas y privadas, en el ámbito nacional.
- V. Determinar, fomentar, coordinar y vigilar la operación de la infraestructura zoonosanitaria, incluidas: la Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y Otras Enfermedades Exóticas de los Animales (CPA) y la Comisión México-Americana para la Erradicación del Gusano Barrenador del Ganado (COMEXA).
- VI. Atender las denuncias ciudadanas que se presenten en materia de salud animal.
- VII. Celebrar acuerdos interinstitucionales, así como bases de coordinación, convenios y acuerdos con dependencias y entidades de la administración pública federal, gobiernos estatales y municipales y con particulares, así

como centros de educación media y superior e institutos de investigación, en materia de salud animal.

- VIII. Determinar y orientar la normatividad para que los organismos coadyuvantes, en particular los comités de fomento y protección pecuaria y otros auxiliares, impacten favorablemente en la salud animal.
- IX. Determinar y dictar normas y lineamientos para la importación y exportación, de animales, sus productos y subproductos, así como de productos biológicos, químicos, farmacéuticos y alimenticios, para uso en animales o consumo por estos y el registro y certificación de estos últimos.
- X. Dictar las restricciones a animales, sus productos y subproductos, importados o de origen nacional, en caso de sospecha de riesgo zoonosario para la ganadería nacional.

DIRECCIÓN DE SANIDAD ACUÍCOLA Y PESQUERA

La acuicultura de peces crustáceos y moluscos bivalvos ha tomado gran importancia en el país ya que es una alternativa de producción de alimentos de origen animal con alto valor nutricional, que además de representar una fuente importante de empleos permanentes y de arraigo para las sociedades rurales o costeras en donde se establece, contribuye a disminuir la sobreexplotación de los océanos, así como la destrucción de los ecosistemas marinos (SAGARPA, 2005).

De este modo el desarrollo de la actividad ha propiciado que la sanidad acuícola adquiera significativa importancia debido a la necesidad de optimizar recursos y evitar pérdidas provocadas por etiologías provocadas ni previstas y ha generado la necesidad de recursos humanos, profesionales especialistas en el diagnóstico de enfermedades de organismos acuáticos, así como de su medio ambiente (Rodríguez, 1998). La sanidad acuícola se define como el estudio de las

enfermedades que afectan a los organismos acuáticos cultivados, silvestres y de ornato, y al conjunto de prácticas encaminadas a la prevención, diagnóstico y control de las mismas (NOM-011-PESC-1993).

Es así que, considerando la importancia del sector acuícola en la economía, se crea la Dirección de Sanidad Acuícola y Pesquera que es el área encargada de establecer las medidas sanitarias que se realizan para prevenir, controlar, combatir y erradicar enfermedades y plagas de las especies acuáticas vivas, con la finalidad de proteger su salud y la del hombre. Esta Dirección fue incorporada como estructura organizada a la DGSA en enero de 2005 y a partir del 16 de noviembre de 2007. Entre sus objetivos destacan los siguientes. Prevenir, controlar, combatir y erradicar enfermedades que ataquen especies cuyo hábitat sea el agua, mediante el apoyo de los Comités de Sanidad Acuícola en la aplicación de medidas sanitarias; elaboración de proyectos de Normas Oficiales Mexicanas y Leyes que garanticen su implementación. Sus funciones son las siguientes (SENASICA, 2012c):

- I. Participar en la elaboración de proyectos y modificaciones de Normas Oficiales Mexicanas relativas a esta materia.
- II. Asegurar la sanidad de los organismos acuáticos.
- III. Revisar y dictaminar los programas de trabajo en materia de sanidad acuícola que los comités (CSA) presentan al inicio de cada ejercicio anual y que se realizan con recursos federales en coordinación con los gobiernos estatales y productores.

Inicialmente con la finalidad de tener eficiencia en los programas de sanidad, se impulsó la integración de los productores en una figura organizativa de participación ciudadana identificada como Comités Estatales de Sanidad Acuícola, a través de los cuales se implementaron campañas voluntarias en materia

sanitaria enfocadas a difundir e implementar medidas para detectar, controlar y prevenir enfermedades en los cultivos de camarón, mismas que se han ampliado a otras especies tales como peces (trucha, carpa y tilapia) y moluscos bivalvos (ostiones). Para realizar esta tarea se cuenta con el apoyo de los laboratorios de la red nacional de diagnóstico que son apoyados con recursos federales y brindan servicios de diagnóstico y prevención al sector acuícola y pesquero, así mismo coadyuvar con las instituciones públicas y de investigación en la construcción de un Sistema de Vigilancia Epidemiológica (SAGARPA, 2005).

JUSTIFICACIÓN

En nuestro país, la producción de trucha arco iris tiene una alta demanda, sin embargo, la producción de ovas nacionales no es suficiente, siendo necesaria la importación, introducción e intercambio de ovas oculadas de trucha arco iris. No obstante, algunos de los países de los que proceden los gametos, reportan la presencia de *Renibacterium salmoninarum*, el cual puede provocar una enfermedad subclínica.

El último estudio realizado en nuestro país, para identificar los agentes bacterianos presentes en las truchas arco iris de las granjas comerciales, fue realizado en el 2007. Este y otros estudios previos, no detectaron la presencia del agente causal de la enfermedad bacteriana del riñón, sin embargo las actividades relacionadas a la Vigilancia Epidemiológica, son esenciales en la truticultura nacional y estatal.

Debido al impacto negativo que puede provocar *Renibacterium salmoninarum* en la truticultura mexicana, es necesario realizar estudios diagnósticos para conocer el estatus sanitario de la truticultura nacional y estatal respecto a este patógeno. Asimismo, estandarizar técnicas diagnósticas para la identificación rápida, segura y oportuna del agente bacteriano.

HIPÓTESIS

Las truchas arco iris de granjas comerciales del estado de México no presentan antígenos de *Renibacterium salmoninarum*.

OBJETIVOS

Detectar el agente bacteriano de *Renibacterium salmoninarum* por medio de la técnica de ELISA, a partir de muestras de riñón y fluidos gonadales de truchas arco iris del estado de México.

Estandarizar la técnica de ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la detección de antígenos de *Renibacterium salmoninarum* a partir de muestras de riñón y fluidos gonadales de truchas arco iris comerciales de granjas del estado de México.

MATERIAL

MATERIAL BIOLÓGICO

Para el estudio, se incluyeron 100 organismos (talla comercial) de trucha arco iris de unidades de producción (granjas) del estado de México. Asimismo, 86 muestras de fluidos gonadales de reproductores de trucha arco iris de granjas comerciales del estado de México. De las cuales, 58 fueron a partir de fluido ovarico y 28 de líquido seminal.

MATERIAL DE CAMPO

Bolsas de plástico 60 cm x 90 cm

Cuaderno

Hielera

Ligas

Marcador, lápiz, pluma

Redes

Refrigerantes

Sistema de oxigenación

MATERIAL DE LABORATORIO

Alcohol

Autoclave

Balanza analítica

Bata

Bolsas de plástico 10 x 15 cm

Centrífuga

Estuche de disección

Estufa bacteriológica

Guantes

Kit de ensayo inmunoenzimático para *Renibacterium salmoninarum* (BIOS, Chile)

Lavador de placas de ELISA, modelo ELx 50, marca Luminex® Corporation

Lector de placas de ELISA, modelo ELx 800, marca Luminex® Corporation

Mechero Bunsen

Mesa de trabajo

Micropipeta de 1000 µl

Multipipeta de 200 µl

Puntas de pipeta de 200 µl

Puntas de pipeta de 1000 µl Tubos Eppendorf

Toallas de papel

Vortex

MÉTODO

POBLACIÓN DE ESTUDIO

El presente trabajo se realizó bajo un diseño no experimental y de estudio transversal con el fin de establecer un análisis epidemiológico en los principales municipios productores de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) del estado de México: Amanalco de Becerra, Temascaltepec, Valle de Bravo, Tenancingo, Ocoyoacac, Villa Victoria, Isidro Fabela, Ocuilán, Donato Guerra, Tenango del Valle, Temoaya, Villa de Allende, Jilotzingo, Nicolás Romero, Villa del Carbón y Chapa de Mota, principales productores de la especie (SAGARPA, 2011²) remitidos al Departamento de Sanidad Acuícola del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), FMVZ, UAEM, por personal técnico del Comité de Sanidad Acuícola del estado de México (CSAEM).

Con base en el número de granjas de trucha arco iris en el estado, referidas por la Subdelegación de Pesca de la SAGARPA (Cuadro 1) en el estado de México (SAGARPA, 2011²) y de acuerdo al volumen de producción pesquera en peso vivo, se eligieron los 16 principales municipios productores (Cuadro 2).

Cuadro 1. Granjas de trucha arco iris en el estado de México.

MUNICIPIO	NÚMERO DE GRANJAS
Acambay	1
Aculco	1
Almoloya de Juárez	1
Amanalco de Becerra	69
Amecameca	1
Atlacomulco	5
Atlautla	1
Calimaya	1

² Comunicación personal con el Sr. Javier Martínez Ortiz, Técnico del Área de Fomento Pesquero de la Subdelegación de Pesca de la SAGARPA, estado de México.

*Detección de Renibacterium salmoninarum en trucha arco iris (Oncorhynchus mykiss)
en granjas comerciales del estado de México*

Capulhuac	1
Chapa de Mota	2
Coatepec Harinas	3
Cocotitlán	1
Donato Guerra	17
El Oro	1
Huixquilucan	3
Isidro Fabela	14
Ixtapaluca	1
Ixtapan del Oro	1
Ixtlahuaca	4
Jilotepec	1
Jilotzingo	17
Jiquipilco	5
Lerma	2
Luvianos	1
Malinalco	1
Naucalpan de Juárez	4
Nicolás Romero	26
Ocuilán	12
Ocoyoacac	31
Otzolotepec	4
San Felipe del Progreso	4
San José del Rincón	6
Tlalmanalco	2
Tejupilco	1
Temascaltepec	24
Temoaya	9
Tenango del Valle	3
Tenancingo	3
Texcaltitlán	5
Texcoco	3
Villa de Allende	8
Valle de Bravo	31
Villa del Carbón	22
Villa Guerrero	1
Villa Victoria	4
Xonacatlán	4
Zinacantepec	3

Fuente: Comunicación personal con el Biol. Miguel Ángel Medina Aranda, Coordinador de Profesionales Dictaminador de la SAGARPA, estado de México, 2011.

Cuadro 2. Volumen de la producción de trucha arco iris (en peso vivo) por municipio.

MUNICIPIO	PRODUCCIÓN (TONELADAS ANUALES)
Amanalco de Becerra	411.33
Chapa de Mota	3
Donato Guerra	45.69
Isidro Fabela	36.86
Jilotzingo	69.43
Nicolás Romero	58.2
Ocuilán	22
Ocoyoacac	112.5
Temascaltepec	63.45
Temoaya	43.4
Tenango del Valle	28
Tenancingo	26.30
Villa de Allende	121
Valle de Bravo	251.97
Villa del Carbón	33.41
Villa Victoria	7.8

Fuente: Comunicación personal con el P.Biol. Miguel Ángel Medina Aranda, Coordinador de Profesionales Dictaminador de la SAGARPA, estado de México, 2011.

TAMAÑO DE MUESTRA

El tamaño de muestra se adecuó a los objetivos del Comité de Sanidad Acuícola del estado de México, referidos en su Plan Anual de trabajo 2009 aprobado previamente por el SENASICA. El estudio se realizó a partir de 100 organismos de trucha arco iris de talla comercial, de los cuales se tomaron muestras de riñón. Asimismo, fueron incluidas 86 muestras de fluidos gonadales de reproductores (58 muestras de fluidos ovárico y 28 muestras de líquido seminal). Todas las muestras fueron analizadas de manera individual.

GRANJAS PARTICIPANTES

Se llevó a cabo, un muestreo de conveniencia o de sujetos disponibles. El tipo de

muestreo, permitió seleccionar las unidades de producción de trucha arco iris, de acuerdo a su etapa de producción (Jaramillo y Martínez, 2010). Las granjas participantes fueron seleccionadas por el CSAEM, con base en el programa de Vigilancia Epidemiológica establecido en el Plan Anual de trabajo 2009 para el estado de México. Personal técnico del CSAEM visitó 100 granjas comerciales de trucha arco iris de los municipios antes mencionados, de las cuales recolectó las muestras biológicas antes referidas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Número de granjas comerciales de trucha arco iris muestreadas por municipio y número de muestras colectadas en cada una.

MUNICIPIO	NÚMERO DE GRANJAS	NÚMERO DE MUESTRAS
Amanalco de Becerra	25	25
Ocoyoacac	13	13
Donato Guerra	9	9
Temascaltepec	8	8
Temoaya	7	7
Isidro Fabela	6	6
Valle de Bravo	6	6
Ocuilán	5	5
Villa del Carbón	5	5
Tenancingo	4	4
Villa Victoria	4	4
Tenango del Valle	3	3
Nicolás Romero	2	2
Chapa de Mota	1	1
Jilotzingo	1	1
Jiquipilco	1	1
	100	100

Las muestras de fluidos gonadales fueron recolectadas de una granja del municipio de Ocoyoacac (Cuadro 4).

Cuadro 4. Número de muestras de fluido ovárico y seminal colectadas por municipio.

Municipio	Muestras de hembras	Muestras de machos
Ocoyoacac	58	28

COLECCIÓN DE LA MUESTRA

En cada granja se colectó al azar un organismo vivo de trucha arco iris. Los peces se colocaron individualmente en bolsas de plástico nuevas de 60 x 90 cm, con un 1/3 de agua del estanque de procedencia y 2/3 de aire u oxígeno. Las bolsas fueron atadas con una liga, identificadas y colocadas en una hielera manteniéndolas a una temperatura entre 4 y 10 °C por medio de refrigerantes hasta su llegada al laboratorio (Noga, 2000). Las muestras de fluido gonadales, fueron individuales y colectadas asépticamente en un vial de plástico.

EVALUACIÓN DEL EVENTO

Historia clínica: se recabó información de la muestra remitida en el formato denominado Historia Clínica, DI-SAC-01 (Anexo A). A cada muestra se le asignó un número de caso para su seguimiento. A partir de la historia clínica, se evaluaron factores asociados a la presencia de *Renibacterium salmoninarum* en los organismos muestreados. Con base a los datos obtenidos en la historia clínica se clasificó los siguientes elementos como factores de riesgo: el tipo de estanques presentes en las granja, el tipo de alimento proporcionado a los peces, el uso de agua de río o manantial, uso de tapetes sanitarios, tipo de desinfectantes utilizados en los tapetes sanitarios y en las artes de pesca, tratamientos preventivos y tipo de tratamientos preventivos, granjas que realizan tratamientos preventivos en organismos de trucha arco iris, y origen de los peces de la granja.

Sacrificio de los organismos: los organismos fueron sacrificados de manera individual por la técnica de asfixia (Noga, 2000). Una vez concluida la toma de muestras de un pez, se sacrifico al siguiente y así sucesivamente.

Medición de organismos: se determino el peso y la longitud patrón de los peces, el registro de los datos se realizo en el formato denominado Toma de Muestras, DI-SAC-02 (Anexo B). Inmediatamente se procedió a la disección y colecta de muestras para el ensayo inmunoenzimático, el cual se realizó asépticamente (Jiménez y Galviz, 1990).

Los organismos muestreados en el presente estudio correspondían a la talla comercial de acuerdo a los objetivos del Comité de Sanidad Acuícola del estado de México. En los cuadros 5 y 6, se cita el rango de peso y talla de cada uno de los organismos.

Cuadro 5. Rango de talla de los organismos de trucha arco iris incluidos en el estudio.

TALLA (cm)	NÚMERO DE ORGANISMOS
17-26	44
26.1-29	31
29.1 en adelante	25

Cuadro 6. Rango de peso de los organismos de trucha arco iris incluidos en el estudio.

PESO (g)	NÚMERO DE ORGANISMOS
70-100	6
101-131	8
132-162	14
163-193	14
194-224	18
225-255	10
256-286	8
287-317	13
318-348	2
349-379	3
380 en adelante	5

Técnica de disección: los peces se colocaron en la mesa de trabajo con la cabeza hacia la mano izquierda del operador y el vientre hacia el mismo. Se roció alcohol al 70% sobre la superficie del pez para la desinfección. A continuación se efectuó un corte ventral desde el ano hasta la cabeza, pasando entre las aletas pélvicas y pectorales. Se realizó otro corte en forma de arco partiendo del ano, pasando por la parte lateral del cuerpo y por encima del opérculo. La pared corporal se levantó dejando visibles los órganos (Erwin, 1980).

La obtención de los fluidos gonadales se realizó anestesiando a los reproductores mediante inmersión en agua tratada con MS-222 (Metano sulfonato de triclaína) en una concentración de 40 a 80 ppm, en contenedores de vidrio. Los peces anestesiados fueron sacados del agua colocando la mano derecha en la región abdominal, colocando a los peces en posición de desove. Con la mano izquierda protegida con un guante o franela, se sujetó al pez por su extremo caudal, el dorso y el flanco lateral del pez se apoyó sobre el abdomen del manipulador, ofreciendo su abdomen sobre el que, con los dedos se realizó una suave presión deslizándolos varias veces desde las branquias hasta la cloaca, hasta que el pez fue completamente vaciado (Blanco, 1995).

Toma y procesamiento de la muestra: para el ensayo inmunoenzimático se preparó el extracto de riñón, tomando un trozo de aproximadamente un gramo de tejido y se transfirió a una bolsa nueva de plástico conjuntamente con 2 ml de la solución de extracción del kit de ensayo inmunoenzimático para *Renibacterium salmoninarum*. Las muestras de fluidos gonadales (fluido ovárico en el caso de las hembras y fluido seminal en el caso de los machos) fueron obtenidas por el personal del CSAEM y llevadas al laboratorio para la realización del estudio. Para realizar el ensayo inmunoenzimático a partir de muestras de fluidos gonadales se tomó 1 ml de fluido ovárico o seminal, y se mezcló con 1 ml de solución de dilución de fluido celómico (previamente diluida) y se le centrifugó a 1.000g durante 10 minutos (Instructivo del Kit de ensayo inmunoenzimático para *Renibacterium salmoninarum*, BIOS, Chile. Anexo C).

Ensayo inmunoenzimático: la detección del agente *Renibacterium salmoninarum*, se realizó a partir de la técnica de ELISA. La muestra (tejido de riñón, fluido gonadal), se preparó con base al procedimiento indicado por el fabricante del kit: ELISA BKD Bios Chile, Santiago de Chile, número de catálogo 1430138 (Anexo C). La prueba de ELISA, fue validada con una muestra clínica positiva de *R. salmoninarum*, donada por la Dra. Diane Elliott (Western Fisheries Research Center, Seattle, Washington, EUA).

Un total de 186 muestras obtenidas de las unidades de producción de trucha arco iris de los principales municipios productores de la especie fueron procesadas. Las muestras se analizaron por duplicado. Las densidades ópticas se obtuvieron utilizando el lector de placas de ELISA, modelo ELx 800 con una longitud de onda de 705 nm. Con base en la densidad óptica, el punto de corte para las muestras fue el siguiente:

- Positivo: ≥ 0.364
- Sospechoso: entre 0.299 y 0.363
- Negativo: ≤ 0.298

Análisis de datos: A partir de los resultados obtenidos se realizó un cuadro de frecuencia por municipio muestreado.

LÍMITE DE ESPACIO

El muestreo se realizó en las granjas comerciales de trucha arco iris de los municipios antes mencionados.

Los organismos muestreados fueron procesados en el Departamento de Sanidad Acuícola del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) ubicado en el Campus San Cayetano, carretera Toluca-Atlacomulco kilómetro 15.5, C. P. 50200, Toluca estado de México.

LÍMITE DE TIEMPO

El presente trabajo se llevo a cabo a partir de junio de 2009 a agosto de 2013.

ACTIVIDAD	FECHA
Búsqueda de información bibliográfica y hemerográfica	Junio 2009 a Septiembre de 2012
Elaboración de protocolo	Junio 2009 a Septiembre de 2012
Muestreo y procesamiento de muestras	Julio a Agosto 2009
Análisis de resultados	Septiembre 2009 a Octubre de 2012
Elaboración de tesis	Noviembre 2012 a Abril 2013
Tesis para revisión e impresión	Mayo a Agosto 2013

RESULTADOS

POBLACIÓN DE ESTUDIO Y GRANJAS PARTICIPANTES

Un total de 100 unidades comerciales de producción de trucha arco iris fueron incluidas en el estudio. Los municipios de los cuales procedió la muestra, fueron: Amanalco de Becerra, Chapa de Mota, Donato Guerra, Isidro Fabela, Jilotzingo, Nicolás Romero, Ocuilán, Ocoyoacac, Jiquipilco Temascaltepec, Temoaya, Tenango del Valle, Tenancingo, Valle de Bravo, Villa del Carbón y Villa Victoria.

El municipio con más granjas muestreadas fue Amanalco de Becerra con un total de 25 granjas, los municipios con el menor número de unidades de producción fueron, Jiquipilco, Jilotzingo y Chapa de Mota, con 1 granja respectivamente. Las 86 muestras de fluidos gonadales procedieron de una granja en el municipio de Ocoyoacac. En el cuadro 7, se especifica el número de granjas comerciales de trucha arco iris muestreadas por municipio y los resultados obtenidos en cada una de ellas. El cuadro 8 muestra los resultados obtenidos en el ensayo inmunoenzimático a partir de muestras de fluidos gonadales.

Cuadro 7. Número de granjas comerciales de trucha arco iris muestreadas por municipio y los resultados obtenidos en cada una de ellas.

MUNICIPIO	NÚMERO DE MUESTRAS POSITIVAS	NÚMERO DE MUESTRAS NEGATIVAS
Amanalco de Becerra	0	25
Ocoyoacac	0	100
Donato Guerra	0	9
Temascaltepec	0	8
Temoaya	0	7
Isidro Fabela	0	6
Valle de Bravo	0	6
Ocuilán	0	5
Villa del Carbón	0	5
Tenancingo	0	4
Villa Victoria	0	4
Tenango del Valle	0	3
Nicolás Romero	0	2
Chapa de Mota	0	1
Jilotzingo	0	1
Jiquipilco	0	1
	0	186

Cuadro 8. Resultados de la prueba de ELISA para BKD a partir de muestras de riñón y fluidos gonadales.

TIPO DE MUESTRA	MUESTRAS	RESULTADO
Riñón	100	Negativo
Fluido ovárico	58	Negativo
Líquido seminal	28	Negativo

Se obtuvo un 100% de resultados negativos a *Renibacterium salmoninarum* por la técnica de ELISA a partir de las muestras de riñón y de fluidos gonadales (ANEXO E).

POSIBLES FACTORES ASOCIADOS

A partir de la historia clínica (formato DISAC-01, ANEXO A), se evaluaron posibles factores asociados a la presencia de *Renibacterium salmoninarum* en los organismos muestreados. Los factores valorados fueron: el tipo de alimento proporcionado a los peces, el origen del agua utilizada en los estanques, en ambos casos, el 100% de las granjas proporcionan alimento comercial a sus peces y utilizan agua de manantial en sus estanques; tipo de estanques presentes en las granjas (Cuadro 9), procedencia de los peces (Cuadro 10), uso de tapetes sanitarios (Cuadro 11), tratamientos preventivos llevados a cabo en los organismos de trucha arco iris (Cuadro 12), tipo de desinfectantes utilizados en los tapetes sanitarios y en las artes de pesca (Cuadro 13) y número de granjas que realizan tratamientos preventivos en organismos de trucha arco iris (Cuadro 14).

En los siguientes cuadros se presentan los posibles factores asociados a la presencia de *Renibacterium salmoninarum* presentes en las unidades de producción trutícola participantes.

Cuadro 9. Tipo de estanques presentes en las granjas.

TIPO DE ESTANQUE PRESENTE EN LA GRANJA	GRANJAS	PORCENTAJE
Concreto	75	75%
Fibra de Vidrio	2	2%
Mamposteo	2	2%
Rústico	8	8%
Dos o más tipos	13	13%

Cuadro 10. Procedencia de los peces.

PROCEDENCIA	GRANJAS	PORCENTAJE
Nacional	97	97%
Extranjero	1	1%
Desconocida	1	1%
Capturados o silvestres	1	1%

Cuadro 11. Uso de tapetes sanitarios.

TAPETES SANITARIOS	GRANJAS	PORCENTAJE
Si	32	32%
No	68	68%

Cuadro 12. Tratamientos preventivos llevados a cabo en los organismos de trucha arco iris.

TIPO DE TRATAMIENTOS PREVENTIVOS	GRANJAS	PORCENTAJE
Baños con sal	31	51.7%
Verde malaquita	10	16.7%
Formol	17	28.3%
Dos o más de los anteriores	2	3.3%

Cuadro 13. Tipo de desinfectantes utilizados en los tapetes sanitarios y en las artes de pesca.

TIPO DE DESINFECTANTE	GRANJAS	PORCENTAJE DE GRANJAS QUE UTILIZAN EL DESINFECTANTE
Hipoclorito de calcio	20	55.6%
Biodegerm® (Filiferina 0.66 ml)	11	30.6%
Ambos	5	13.8%

Cuadro 14. Granjas que realizan tratamientos preventivos en los organismos de trucha arco iris.

TRATAMIENTOS PREVENTIVOS	GRANJAS	PORCENTAJE
Si	60	60%
No	40	40%

DISCUSIÓN

En el presente estudio se analizaron 100 muestras de riñón de trucha arco iris de talla comercial y 86 muestras de fluidos gonadales de organismos reproductores, procedentes de granjas de los principales municipios productores de la especie en la entidad federal.

La muestra fue conformada por organismos adultos con una talla de 17 a 29.1 cm de longitud y 70 a 380 gramos de peso, con base en que la enfermedad es crónica en la naturaleza y la mortalidad ocurre mayormente en salmónidos juveniles de entre seis y doce meses de edad y en adultos próximos a desovar (Evelyn, 1993).

Los ejemplares y la técnica diagnóstica utilizada (ELISA), fueron los adecuados para identificar al agente de la enfermedad. A partir de todas las muestras analizadas, no hay evidencia del patógeno *Renibacterium salmoninarum*, agente etiológico de la enfermedad bacteriana del riñón, la cual se encuentra en la lista de enfermedades certificables en el ámbito nacional como internacional (NOM-010-PESC-1993; OIE, 2006).

La enfermedad bacteriana del riñón puede ser transmitida horizontalmente, es decir, de un pez a otro y verticalmente, de los padres a su progenie a través de los huevos (Evelyn, 1988). La transmisión vertical del patógeno, así como la falta de una vacuna efectiva han causado grandes dificultades en el control de ésta enfermedad crónica (Evelyn *et al.*, 1984).

El intercambio internacional de peces de cultivo está aumentando rápidamente, facilitando la diseminación de graves enfermedades infecciosas, es por eso que son necesarios programas de prevención y control efectivos para evitar la extensión de los agentes patógenos de los peces dentro de los países y entre

ellos (Brown, 2000). Las medidas de profilaxis sanitaria tienden a impedir que los agentes patógenos afecten a los animales sanos, contaminando su ambiente. La aplicación de estas medidas, se realiza según 2 métodos:

- I. La Aplicación sanitaria puntual: que es viable en cualquier sitio y cualquier enfermedad, en forma de precaución permanente para evitar el traslado de agentes patógenos a los animales sanos. Llevada a cabo con continuidad y asociada a otros métodos preventivos hace disminuir las pérdidas en una explotación.
- II. Intervención sanitaria coordinada a escala nacional o internacional: se trata de interrumpir la transmisión de las enfermedades eliminando por una parte la fuente de infección (destrucción de animales contaminados y desinfección de los lugares de producción, así como de los materiales) y por otra parte, repoblando las explotaciones saneadas con animales sanos. La aplicación de esta metodología hace necesario contar con medios de diagnóstico que permitan definir las zonas indemnes y medios de vigilancia epidemiológica y protección de estas zonas, así como de las que han sido saneadas (de Kinkelin *et al.*, 1991).

En el año 2009 se realizó el aislamiento e identificación de bacterias notificables pero no certificables en trucha arco iris en granjas comerciales de nuestro país, en el estudio, no se aisló *Renibacterium salmoninarum* (Palomares 2009). Sin embargo, las continuas adquisiciones de animales y productos de origen animal, ya sea acuático o terrestre, implican un riesgo para el país importador. Este riesgo, al que pueden verse expuestas las personas o los animales pueden constituirlo una o varias enfermedades que no estén presentes en el país importador (OIE, 2003).

A partir de los resultados del presente estudio se sabe que el 75% de las granjas encuestadas cuentan con estanques de concreto, 2% con estanques de fibra de vidrio, 2% con estanques mamposteados, 8% con estanques rústicos y 13% con uno o más de los tipos anteriormente mencionados.

Los estanques deben ofrecer las mejores condiciones para el cultivo de las truchas, así como garantizar una construcción sólida y sencilla que permita al piscicultor realizar los trabajos con funcionalidad y alto grado de mecanización (Blanco, 1995). El fondo de los estanques debe mantenerse tan limpio como sea posible durante su uso y después de este, es preciso limpiarlos a fondo con un desinfectante adecuado y dejarlos secar. En el caso de los estanques de tierra no es posible adoptar ninguna medida útil para la limpieza mientras contengan peces, la mejor manera de limpiarlos es vaciarlos, dejarlos secar y pulverizar el fondo y las paredes con una lechada de cal apagada (Drummond, 1988).

En los animales acuáticos, la vía más importante en la transmisión de enfermedades es la infección a través de las mucosas y menos frecuente es la transmisión a través de la alimentación. Sin embargo esta es posible sobre todo cuando se utilizan en la dieta de los peces, restos de otros peces, crustáceos o moluscos (Espinoza de los Monteros y Laborta, 1988).

Un estudio publicado en 1986, revela que los piscicultores principalmente engordaban a las truchas con hígado de res o carne de res molida de baja calidad. En el mismo trabajo, se menciona que las menudencias de pescado también han sido utilizadas. Este tipo de alimento, se ha asociado con la transmisión de enfermedades, por lo que a menos que el piscicultor pueda aprovechar una fuente de alimentos baratos, los más convenientes son los alimentos deshidratados preparados (Bardach *et al.*, 1986). La alimentación de los peces con cadáveres y/o vísceras de peces infectados con *Renibacterium salmoninarum* es una vía de

contagio y puede provocar una epidemia debido a las prácticas de alimentación en las pesquerías del pacífico (Wood y Wallis, 1955). A partir de la información obtenida en el presente estudio, se hace evidente que el 100% de las granjas participantes, alimentan a las truchas con concentrados comerciales y nunca con vísceras o cadáveres de peces.

En el 100% de las granjas incluidas en el estudio se utiliza agua de manantial. Los riesgos potenciales de cualquier fuente de agua se deben comprender bien siempre y con respecto a esto merece la pena enfatizar la importancia de controlar el suministro de agua a los criaderos (Brown, 2000). Se debe evitar la entrada de peces silvestres por que pueden comerse a los del estanque o impedir que crezcan. Se puede utilizar agua de manantial ya que en los manantiales no suele haber peces (FAO, 1981). Las aguas superficiales de los ríos con altas poblaciones de salmónidos silvestres son una de las principales fuentes de la furunculosis, entre otras enfermedades (Brown, 2000). El agua de manantial resulta excelente para la acuicultura. Suele ser muy limpia y su temperatura se mantiene estable todo el año. Su caudal no sufre alteraciones y está menos susceptible a la previa contaminación por actividades industriales que afecta cada vez más a las de arroyos y ríos. Además por darse con frecuencia en los flancos de los altos cerros y en partes muy elevadas de la orografía, suelen resultar propicias para la cría de la trucha, que las exige frescas y limpias (Rubin, 1982). Asimismo, una mala calidad del agua predispone a la propagación de enfermedades, tales como: lesiones en la piel de los peces, infecciones bacterianas, envenenamiento por tóxicos o exceso de nutrientes. Otro problema frecuente en las granjas es el uso de la misma agua a través de diferentes estanques; esto trae como consecuencia problemas sanitarios o baja supervivencia, debido a la poca cantidad de oxígeno y la alta concentración de sólidos que ocasionan generalmente la muerte (Klontz, 1991).

Al investigar el origen de los peces cultivados en las granjas, 97 acuacultores (97% de las granjas) obtienen a los organismos dentro del territorio nacional o los intercambian con otras granjas. Un productor (1% granjas) introduce peces del extranjero, específicamente de Estados Unidos de América. Y solo un productor reporta que desconoce el origen de sus peces (1% granjas) y otro (1% granjas) que captura peces del río para introducirlos a sus estanques. Los peces salvajes, de otras granjas o retornados después de estar en otra granja pueden portar enfermedades. Los peces deben ser inspeccionados para detectar enfermedades, de ser posible, los peces nuevos o retornados deberán ser cuarentenados en estanques o instalaciones alejadas de la granja y no debe permitirse que ningún pez o flujo de agua salga del área de cuarentena (Sadler y Goodwin, 2007). Una medicina preventiva en general a nivel de granja significa evitar la introducción del patógeno en la misma. Quizá la situación ideal es cuando una granja es autosuficiente en términos de reemplazo de existencias, no está bajo ninguna amenaza de una población natural adyacente y posee agua en exceso disponible. El suministro de agua deberá mantenerse libre de peces salvajes y otros animales que puedan actuar como reservorios (Sheperd y Bromage, 1999).

Debido al incremento nacional en el número de granjas productoras de trucha y a la necesidad de contar con crías todo el año, los productores se han visto en la necesidad de importar crías, sobre todo de países como Estados Unidos de América, Inglaterra, Sudáfrica y Australia, pero principalmente de Estados Unidos (SAGARPA, 2011³). La producción de trucha del estado de México ha incrementado, en el año 2002 la producción llegó a las 2,014 toneladas, mientras que en el 2011 fue de 3,786 toneladas. Y en ese mismo año las exportaciones ascendieron a 1,049 millones de dólares con 371 toneladas de pescados y mariscos en diversas presentaciones; mientras que la importación de productos

³ Comunicación personal, M. V. Z. Fernando Vergara Domínguez, encargado de Despacho de la Subdelegación de pesca de SAGARPA del estado de México.

pesqueros alcanzo un valor de 679 millones de dólares y un volumen de 215,000 toneladas de las cuales 18 correspondieron a organismos acuáticos vivos. (SAGARPA, 2011). Mientras que a nivel estatal el estado de México recibe truchas de talla comercial del estado de Michoacán durante la temporada de Cuaresma y Diciembre para satisfacer la demanda de los consumidores (SAGARPA, 2011³). Sin embargo, los movimientos de peces están asociados con la diseminación de casos de BKD en granjas de salmones y truchas y el movimiento de equipo contaminado posee el riesgo potencial de importar o mover patógenos entre granjas (Murray *et al.*, 2002). Y el patógeno produce mortalidad o morbilidad en poblaciones de peces cultivados o salvajes en todas las regiones donde se encuentren salmones (Wiens, 2006).

La comercialización de ovas de trucha es global y tiene el potencial para incrementar la prevalencia de las enfermedades, así como de evitar su erradicación, tal como sucede en el caso del virus de la necrosis pancreática infecciosa en Irlanda (Ruane *et al.*, 2009). La introducción de crías u ovas infectadas constituyen el principal riesgo en la transmisión de enfermedades en los peces (Reno, 1998). Un factor importante en la diseminación de enfermedades de los animales acuáticos es el transporte de dichos animales por vehículos que pueden actuar como vectores en la transmisión de la enfermedad (Torgersen y Håstein, 1995). Así el transporte de peces en camiones ha sido identificado como un factor de riesgo potencial en la diseminación de enfermedades de los peces (Peeler y Thrush, 2009). Los camiones y vehículos utilizados para transportar peces se deberán limpiar con agua a presión en toda su superficie externa y en el interior se utilizará yodo (Sadler y Goodwin, 2007).

La prevención y control de la enfermedad bacteriana del riñón puede ser difícil ya que la información recabada mediante el cuestionario señala medidas deficientes de bioseguridad en las granjas, esto debido a que el 68% de las granjas

encuestadas no hacen uso de tapetes sanitarios y un 64% no utiliza ningún tipo de desinfectante en sus instalaciones y/o artes de pesca. Las enfermedades de los peces, causadas por parásitos, virus o bacterias pueden diseminarse de estanque a estanque, de granja a granja mediante la transferencia de peces infectados, y por animales, personas, equipo y agua contaminada por contacto con peces infectados o patógenos de los peces. Para prevenir la introducción de nuevas enfermedades una granja acuícola, no debe haber contacto entre los peces de la granja y potenciales portadores de enfermedades. El equipo de la granja debe ser limpiado y desinfectado antes de cada uso. Los trabajadores deben desinfectar sus ropas, botas y cualquier otro accesorio antes de tener contacto con peces sanos (Sadler y Goodwin, 2007).

Las acciones de limpieza y desinfección comprenden: el retiro de peces muertos o moribundos, el control de vectores, la limpieza en seco de todas las superficies y la aplicación de desinfectantes (Ortega, 2003). Entre los más comúnmente utilizados el hipoclorito de sodio en una concentración de 100 ppm (partes por millón) durante 10 minutos para la desinfección de jaulas, tanques, equipo de cosecha, es efectivo contra el Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV, por sus siglas en inglés: Infectious Necrosis Virus) y el Virus de la Anemia Infecciosa del Salmón (ISAV, por sus siglas en inglés: Infectious Salmon Anaemia Virus). El uso de iodoformas es frecuente en los tapetes sanitarios, desinfección de redes, ropa, equipo de buceo y superficies no porosas y para la desinfección de las ovas de salmónidos, y será a una concentración de 10 ppm durante 10 minutos; este desinfectante es eficaz contra IPNV e ISAV.

Un estudio en 2004 reportó que *Renibacterium salmoninarum* puede sobrevivir a la desinfección con hipoclorito de sodio y mantener su capacidad de formar colonias (Hirvelä-Koski, 2004), es por eso que se recomienda el uso de compuestos peroxy, por ejemplo Virkon S, que en una solución al 1% durante 10

minutos, es efectivo contra IPNV, BKD e ISAV. Puede ser utilizado en tapetes sanitarios y superficies no porosas. Otro desinfectante eficaz contra BKD es el ácido fórmico a un pH menor de 4 durante 24 horas (Fraser *et al.*, 2006).

En las encuestas se encontró que de las granjas que utilizan algún desinfectante el 30.5% utiliza el desinfectante comercial Biodegerm® (Filiferina 0.66 ml) el cual es un desinfectante natural biodegradable con efecto bactericida (Prieto *et al.*, 2005).

La filiferina es un glucósido terpenoide que se comporta como detergente y en este caso se le llama saponina y es extraída de la *Yucca filifera* (Collera y García, 2006). El uso de extractos de plantas del semi desierto mexicano es una buena alternativa en el control de bacterias Gram positivas y Gram negativas (Mendez *et al.*, 2012).

En el presente estudio se encontró que el 60% de las granjas participantes realizan algún tipo de tratamiento preventivo a sus peces. De estas un 51.67% lo hace con baños de sal, 16.7% con verde de malaquita, y 28.3% con formol. Sin embargo todos los anteriores están indicados para el tratamiento y control de enfermedades parasitarias e incluso bacterianas, mas nunca para el tratamiento de la enfermedad bacteriana del riñón (Lázaro y Chávez, 1985).

Todas las ovas que entren a la piscifactoría deben ser desinfectadas aunque provengan de un lugar libre de enfermedades. Las sustancias más recomendables para desinfectar son aquellas que contienen yodo como principio activo (PRONALSA, 2001). Para aplicarlo debe prepararse una solución con agua libre de materia orgánica y 100 mg/l de yodo sumergir en esta las ovas durante al menos 25 minutos Se recomienda mantener el pH de la solución entre 6 y 8 ya que un pH menor a 6 aumenta la toxicidad del yodo y uno mayor a 8 disminuye su efectividad (Torgersen y Håstein, 1995; OIE, 2010). Sin embargo, aunque el yodo

es muy efectivo matando al patógeno en la superficie de los huevos es totalmente ineficaz reduciendo la prevalencia *intra ovum* de *Renibacterium salmoninarum* (Evelyn *et al.*, 1984). Mientras que en general no se recomienda la administración de productos quimioterápicos, especialmente antibióticos a un grupo de peces sanos, hay circunstancias específicas donde esta actuación puede ser valiosa; se ha sugerido que al inyectar 20 mg/kg de eritromicina antes del desove se conseguirán importantes niveles de antibiótico dentro de los huevos. Después del desove los huevos son desinfectados superficialmente con un yodoforo y los alevines pueden tratarse con eritromicina al poco tiempo de iniciar la ingestión de alimento (Brown, 2000). Por otra parte, el uso de acriflavina es delicado ya que es una sustancia muy ácida, produce esterilidad temporal en los peces y nunca debe ser utilizada para el tratamiento de micosis en los huevos (Lázaro y Chávez, 1985).

CONCLUSIONES

En las truchas arco iris de talla comercial de las granjas comerciales de los municipios de Amanalco de Becerra, Temascaltepec, Valle de Bravo, Tenancingo, Ocoyoacac, Villa Victoria, Isidro Fabela, Ocuilán, Donato Guerra, Tenango del Valle, Temoaya, Villa de Allende, Jilotzingo, Nicolás Romero, Villa del Carbón y Chapa de Mota, no se detectó el agente bacteriano *Renibacterium salmoninarum*. Asimismo, la bacteria no fue detectada en muestras gonadales de machos y hembras de trucha arco iris del municipio de Ocoyoacac.

La movilización e introducción de peces, la deficiente bioseguridad en la mayoría de las granjas, así como la resistencia del patógeno a los desinfectantes comunes, son factores de riesgo para la introducción de *Renibacterium salmoninarum* a las granjas trutícolas.

La información obtenida en el presente estudio hace evidente que en las granjas participantes existen medidas que ayudan a controlar el ingreso de agentes infecciosos a sus estanques, medidas tales como el uso de agua de manantial se observa en el 100% de las granjas encuestadas, así como el uso de concentrados comerciales para la alimentación de sus peces y el hecho de que el 97% de las mismas obtiene a sus peces dentro del territorio nacional. Sin embargo también fueron detectados factores de riesgo, tales como la falta de una estrategia de bioseguridad bien establecida, ya que el 64% no hace uso de ningún tipo de desinfectante en sus equipos y artes de pesca y que, tan sólo el 60% realiza algún tipo de tratamiento preventivo a sus peces, siendo estas actividades consideradas de riesgo para la introducción de la bacteria en cuestión.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo contribuyen al conocimiento de la situación sanitaria de los principales municipios productores de la trucha arco iris a nivel estatal, permitiendo establecer estrategias de prevención y control de esta bacteria y la enfermedad que provoca en las granjas trutícolas.

SUGERENCIAS

Los programas de Vigilancia Epidemiológica en la sanidad acuícola nacional, recomendados por la SAGARPA y llevados a cabo por los Comités de Sanidad Acuícola de los estados trutícolas deben seguirse llevando a cabo.

Este tipo de estudios epidemiológicos, deben ser llevados a cabo en las principales entidades federales productoras de trucha arco iris, para conocer el estatus sanitario de la truticultura regional y nacional.

Es necesario hacer estudios en peces silvestres sobre la presencia del agente bacteriano *Renibacterium salmoninarum*.

Es necesario concientizar a los productores sobre la renibacteriosis y su impacto económico en la producción de trucha, con el fin de que mejoren o implementen medidas de bioseguridad preventivas para evitar la entrada de este agente así como de otras enfermedades transmisibles de los peces.

BIBLIOGRAFÍA

- Austin B, Embley TM, Goodfellow M. (1983): Selective isolation of *Renibacterium salmoninarum*. FEMS Microbiol Lett, 17(1-3):111-114.
- Bardach JE, Ryther JH, Mc Larney WO. (1986): Acuicultura. AGT Editor, México DF.
- Balfry SK, Albright LJ, Evelyn TPT. (1996): Horizontal transfer of *Renibacterium salmoninarum* among farmed salmonids via the fecal-oral route. Dis. Aquat. Org., 25(1-2):63-69.
- Blanco CMC. (1995): La trucha. Cría Industrial. 2ª ed., Mundi-Prensa. España.
- Bernabé G. (1991): Acuicultura, Omega S.A., Barcelona, España.
- Brown L. (ed) (2000): Acuicultura para veterinarios. Acribia, España.
- Bruno DW, Munro ALS. (1986): Haematological assessment of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and Atlantic salmon *Salmo salar* L, infected with *Renibacterium salmoninarum*. J. Fish. Dis., 9(3):195-204.
- Caballero MJ. (1992): Sanidad acuícola, Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L., FONDEPESCA.
- Cifuentes L JL, Torres-García P, Frías MM. (1997): El Océano y sus Recursos. Acuicultura, Fondo de Cultura Económica, México, D.F.

Collera ZO, García JFA. (2006): Glucósidos Terpenoides, en: Química de la Flora Mexicana. Investigaciones en el Instituto de Química de la UNAM Editado por Alfonso Romo de Vivar Romo., 148-149, S y G editores, S.A de C.V, México D.F.

Chase DM, Pascho RJ. (1998): Development of a nested polymerase chain reaction for amplification of a sequence of the p57 gene of *Renibacterium salmoninarum* that provides a highly sensitive method for detection of the bacterium in salmonid kidney. *Dis. Aquat. Org.*, 34(3):223-229.

de Kinkelin P, Michel CH, Ghittino P. (1991): Tratado de las enfermedades de los peces. Acribia, Zaragoza, España.

Drummond SS. (1988): Cría de la Trucha. Acribia, Zaragoza, España.

Erwin PR. (1980): Manual de las enfermedades de los peces. Acribia. España.

Espinosa de los Monteros J, Laborta U. (1988): Patología en acuicultura. Mundi Prensa, España.

Evelyn TPT, Ketcheson JE, Prospero-Porta L. (1984): Further evidence for the presence of *Renibacterium salmoninarum* in salmonid eggs and the failure of povidone-iodine to reduce the intra-ovum infection rate in water-hardened eggs. *J. Fish Dis.* 7(3):173-182.

Evelyn TPT (1988): Bacterial kidney disease in British Columbia, Canada: comments on its epizootiology and on methods for its control on fish farms in: *Aqua NOR 87*. Trondheim International Conference. Norske

Fiskeoppdretteres Foreign-Fiskeoppdretternes Salgslag A/L Trondheim, Norway, 51-57.

Evelyn TPT, Prosperi-Porta L, Ketcheson JE. (1990): Two new techniques for obtaining consistent results when growing *Renibacterium salmoninarum* on KDM-2 culture medium. Dis. Aquat. Org., 9(3):209-212.

Evelyn TPT. (1993): Bacterial Kidney Disease, en Bacterial Diseases of Fish. Editado por Inglis V, Roberts RJ, Bromage NR., 177-195, Oxford: Blackwell.

FAO (1981): Cría de peces de agua dulce. Cómo mejorar el estanque. Serie mejores cultivos. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma 1981.

Fraser DI, Munro PD, Smail DA. (2006): Disinfection guide version IV Practical steps to prevent the introduction and the transmission of diseases of fish. Fisheries Research Services, Escocia.

Goodfellow M, Embley TM, Austin B. (1985): Numerical taxonomy and emended description of *Renibacterium salmoninarum*. J. Gen. Microbiol., 131(10): 2739-2752.

Grayson TH, Atienzar FA, Alexander SM, Cooper LF, Galpin ML. (2000): Molecular diversity of *Renibacterium salmoninarum* isolates determined by randomly amplified polyphormic DNA analysis. Appl. Environ. Microbiol., 66(1):435-438.

Grayson TH, Cooper LF, Wrathmell AB, Roper J, Eveden AJ, Gilpin ML. (2002): Host responses to *Renibacterium salmoninarum* and specific components of

the pathogen reveal the mechanisms of immune suppression and activation. Immunology., 106(2):273-283.

Guevara PA, Vergara DF. (1999): Manual de Producción Trutícola para los Sistemas de Cultivo del Estado de México, Tesis de Licenciatura, F.M.V.Z. U.A.E.M., Toluca, México.

Halaihel N, Vendrell D, Ruíz-Zarzuela I, de Blas I, Alonso JL, Gironés O, Pérez T, Muzquiz JL. (2008): A new real time PCR-based assay for diagnosing *Renibacterium salmoninarum* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and comparison with other techniques. J. Microbiol. Methods., 76(1):75-80.

Hirvelä-Koski V. (2004): *Renibacterium salmoninarum*: effect of hypochlorite treatment, and survival in water. Dis Aqua. Org., 59(1):27-33.

Hirvelä-Koski V, Pohjanvirta T, Koski P, Sukura A. (2006): Atypical growth of *Renibacterium salmoninarum* in subclinical infections. J. Fish. Dis., 29(1):21-29.

Inglis V, Roberts, RJ, Bromage NR. (1993): Bacterial diseases of Fish. Blackwell. Oxford, pp. 177-195.

Jansson E, Linberg L, Säker E, Aspán A. (2008). Diagnosis of bacterial kidney disease by detection o *Renibacterium salmoninarum* by real time PCR. J. Fish. Dis., 31(10):755-763.

Jaramillo ACJ, Martínez MJJ. (2010): Epidemiología veterinaria. Manuel Moderno. D. F., México.

Jiménez FG. (1986): Parásitos y enfermedades del bagre. Facultad de Ciencias Biológicas, U. A. N. L. FONDEPESCA.

Jiménez FG, Galviz SL. (1990): Manual de introducción a la sanidad piscícola. Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. FONDEPESCA.

Juárez PR y Palomo MGG. (1987): Acuicultura. Bases Biológicas del cultivo de organismos acuáticos, 2ª Ed.; Continental, México.

Klontz GW. (1991): Producción de trucha arco iris en granjas familiares. El Pedregal, Silver Cup, Toluca, México.

Lázaro E, Chávez M. (1985): Manual de usos. Sustancias desinfectantes y drogas de utilidad en las piscifactorías. AGT, México.

Ley General de Pesca y Acuicultura Sustentables. Diario Oficial de la Federación, 24 de julio de 2007. Texto vigente, última reforma Diario Oficial de la Federación 07 de junio de 2012.

Ley Orgánica de la Administración Pública Federal. Diario Oficial de la Federación, 29 de diciembre de 1976.

Méndez M, Rodríguez R, Ruíz J, Morales-Adame D, Castillo F, Hernández-Castillo FD, Aguilar CN. (2012): Antibacterial activity of plant extracts obtained with alternative organics solvents against food-borne pathogen bacteria. *Industrial Crops and Products*, 37(1):445-450.

Murray AG, Smith RJ, Stagg RM. (2002): Shipping and the spread of infectious salmon anemia in Scottish aquaculture. *Emerg Infect Dis.*, 8(1):1-5.

Noga EJ. (2000): Fish Disease. Diagnosis and Treatment. Iowa State Press. Blackwell Publishing Professional, Iowa, USA.

Norma Oficial Mexicana NOM-010-PESC-1993. Que establece los Requisitos Sanitarios para la Importación de Organismos Acuáticos Vivos en cualesquiera de sus fases de desarrollo, destinados a la Acuicultura u Ornato, en el Territorio Nacional.

Norma Oficial Mexicana NOM-011-PESC-1993. Para regular la Aplicación de Cuarentenas a Efecto de Prevenir la Introducción y Dispersión de Enfermedades Certificables y Notificables, en la Importación de Organismos Acuáticos vivos en cualesquiera de sus fases desarrollo, destinados a la Acuicultura y Ornato en los Estados Unidos Mexicanos.

Oficina Internacional de Epizootias (OIE) (2003): Código Sanitario Internacional para los Animales Acuáticos. 6ª edición. Office International des Epizooties, Francia.

Oficina Internacional de Epizootias (OIE) (2006): Lista de enfermedades de la OIE en vigor en el 2006, Francia. <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-la-lista-de-la-oie-2006>, (12 de febrero de 2013).

Oficina Internacional de Epizootias (OIE) (2010): Methods of aquaculture establishments, en: Aquatic animals health standards commission. Office International des Epizooties, Francia.

- Ortega C. (1998): Algunos factores que influyen en la presentación de enfermedades en peces de cultivo. Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico., 1(2):7-9.
- Ortega C. (2003): Procesos de desinfección de unidades acuícolas. Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico., 2(22):4.
- Palomares ME. (2009): Aislamiento e identificación de bacterias notificables pero no certificables en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) de granjas comerciales en los Estados Unidos Mexicanos. Tesis de licenciatura, FMVZ, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México.
- Pedersen K, Skall, HF, Lassen-Nielsen AM, Nielsen TF, Herriksen NH. (2008): Surveillance of health status on eight marine rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), farms in Denmark in 2006. J. Fish Dis., 31(9):659-667.
- Peeler EJ, Thrush MA. (2009): Assessment of exotic fish disease introduction and establishment in the United Kingdom via live fish transporters. Dis Aquat Org., 83(2):85-95.
- Peralta EL, Frías MT. (1987): Manual sobre la técnica inmunoenzimática ELISA. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. La Habana, Cuba.
- Prieto A, Auró de O A, Fernández A, Pérez BM. (2005): El empleo de la medicina natural en el control de enfermedades de organismos acuáticos y potencialidades de uso en Cuba y México. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas., 8(1):38-49.

- Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico (PRONALSA) (2001): manual de enfermedades de los peces. Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico., 3(15):4.
- Randall WM, Ching CW, Albregts SR. (1995): Comparison of diagnostic test for bacterial kidney disease in juvenile steel head trout (*Oncorhynchus mykiss*). J. Vet. Diagn. Invest., 7(4):494-499.
- Reno PW (1998): Factors involved in the dissemination of the disease of fish populations. J. Aqua. Anim. Health, 10(2):160-171.
- Reinchenbach-Klinke HH. (1980): Enfermedades de los Peces. 2ª ed., Acribia. Zaragoza, España.
- Rubin RR. (1982): La piscifactoría. 5ª ed., Continental, México.
- Roberts. (1981): Patología de los peces. Mundi-Prensa, España.
- Rodríguez GM. (1998): Presentación. Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico., 1(1):1.
- Rodríguez GM, Cortés GA. (2003): Reseña histórica de la truiticultura en México el zarco 50 años. UAM-X-CONAPESCA. Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico., 1(21):2-5.
- Rodríguez GM. (2003): Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico y prevención de enfermedades en organismos acuáticos a nivel nacional. Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico., 1(21):1.

Ruane NM, Murray AG, Geoghegan F, Raynara RS. (2009): Modeling the initiation and spread of Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) in the Irish salmon farming industry: The role of inputs. *Ecol. Model.*, 220(9-10):1369-1374.

Sadler J, Goodwin A. (2007): Disease prevention on fish farms. Southern Regional Aquaculture Center, (4073).

SAGARPA. (2003): Anuario estadístico de acuicultura y pesca. CONAPESCA. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación. México.

SAGARPA. (2004): Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca. CONAPESCA. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México.

SAGARPA. (2005): Quinto Informe de Labores de la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México, D.F., 96, 137.

SAGARPA. (2010): Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca. CONAPESCA. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México.

SAGARPA. (2011): Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca. CONAPESCA. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México.

Salgado-Miranda C, Palomares E, Jurado M, Marín A, Vega F & Soriano-Vargas E. (2010): Isolation and distribution of bacterial flora in farmed rainbow trout from México. *J. Aquat. Anim. Health*, 22(4):244-247.

Sanders JE, Fryer JL. (1980): *Renibacterium salmoninarum* gen. nov., sp. nov., the causative agent of bacterial kidney disease in salmonid fishes. *Int. J. Sys. Bacteriol.*, 30(2):496-502.

Starliper CE, Teska JD. (1995): Relevance of *Renibacterium salmoninarum* in an asymptomatic carrier population of brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchell). *J. Fish Dis.*, 18(5):384-387.

SENASICA (2012a): La Dirección General de Salud Animal en la historia. <http://www.senasica.gob.mx/?id=523> (19 de julio de 2012).

SENASICA (2012b): La Dirección General de Salud Animal: Actividades. <http://www.senasica.gob.mx/?id=526> (19 de julio de 2012).

SENASICA (2012c): Sanidad Acuícola y Pesquera. <http://www.senasica.gob.mx/?id=1120> (7 de junio de 2012).

Sheperd J, Bromage N. (eds) (1999): *Intensive fish farming*, Blackwell scientific publications, Oxford, England.

Torgersen Y, Håstein T. (1995): Disinfection in Aquaculture. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 14(2):419-434.

Vega CLF. (2001): Aislamiento e identificación de bacterias a partir de peces en unidades productoras de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en el

estado de México. Tesis de licenciatura, FMVZ, Universidad autónoma del Estado de México, Toluca, México.

Wiens GD, Kaattari SL. (1999): Bacterial kidney disease (*Renibacterium salmoninarum*). Fish Diseases and Disorders. Viral, Bacterial and Fungal Infections. CABI Publishing. London.


Wiens GD. (2006): Bacterial kidney disease. CAB International. Wallingford, United Kingdom. <http://www.cabicompendium.org/ac>, (12 de febrero de 2013).

Wood JW, Wallis J. (1955): Kidney disease in adult Chinook salmon and its transmission by feeding to young Chinook salmon. Fish Commission of Oregon. Research Briefs, 6(2):32-40.

Wolke RE. (1975): Pathology of bacterial and fungal disease affecting fish, en: The pathology of fishes. Editado por Ribelin WE, Migaki G., 33-116, University of Wisconsin Press, Madison, Wisconsin.

ANEXO A


FORMATO: HISTORIA CLÍNICA, DI-SAC-01

	Anexo: Historia Clínica DI-SAC-01 Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Centro de Investigación y Estudios avanzados en Salud Animal Departamento de Sanidad Acuicola	Versión Vigente No. 00 Fecha: 03/06/09
Versión vigente No. <input type="text" value="06"/> Fecha: <input type="text" value="24/05/10"/>	FECHA (dd/mm/aa) _____ No. DE CASO _____	
DATOS GENERALES		
NOMBRE DE LA GRANJA _____		FECHA DE INICIO _____
UBICACIÓN _____		
NOMBRE DEL PROPIETARIO _____		
TELÉFONO _____		
DATOS GEOGRÁFICOS		
SUPERFICIE OCUPADA _____		
DATOS DEL PERSONAL		
NOMBRE DEL ENCARGADO _____		No. DE TRABAJADORES _____
HA RECIBIDO CURSOS EN SANIDAD ACUÍCOLA _____		
DATOS POBLACIONALES		
TIPO DE CULTIVO: INTENSIVO _____ SEMIINTENSIVO _____ EXTENSIVO _____		
ESPECIES EXISTENTES _____		
CANTIDAD DE: HUEVO EMBRIONADO _____ ALEVINES _____ CRÍA _____ JUVENILES _____		
ADULTOS _____ REPRODUCTORES _____ TOTAL DE LA POBLACIÓN _____		
MANEJO DE REGISTROS DE PECES POR ESTANQUE: SI _____ NO _____		
PROCEDENCIA DE ESPECÍMENES _____ FECHA DE ÚLTIMA INTRODUCCIÓN _____		
DATOS DE INSTALACIONES		
TIPO DE ESTANQUES: RUSTICA _____ MAMPOSTEADO _____ CONCRETO _____ FIBRA DE VIDRIO _____ TOTAL _____		
DENSIDAD DE ANIMALES _____		
CASETA DE INCUBACION SI _____ NO _____ CAPACIDAD _____		
ABASTECIMIENTO DE AGUA _____ VOLUMEN _____		
DATOS DE ALIMENTACIÓN		
TIPO DE ALIMENTO: CONCENTRADO _____ MEDICADO _____ OTRO _____ MARCA DEL ALIMENTO _____		
TABLA DE ALIMENTACIÓN _____ SUMINISTRO: MANUAL _____ ALIMENTADORES _____		
VECES POR DÍA _____ LUGAR DE ALMACENAMIENTO _____		
DATOS SANITARIOS		
USO DE TAPETES SANITARIOS: SI _____ NO _____ PRODUCTO _____		
APLICAN TRATAMIENTOS PREVENTIVOS: SI _____ NO _____		
CUÁLES _____		
ENFERMEDADES Y MORTALIDAD: HUEVO _____ ALEVINES _____ CRÍA _____ JUVENILES _____		
ADULTOS _____ REPRODUCTORES _____ FECHA DE INICIO _____ TRATAMIENTO _____		
CUAL _____ FECHA DE INICIO _____ FECHA DE TÉRMINO _____		
MUESTRAS REMITIDAS AL LABORATORIO		
ESPECIE _____		
No. DE CRIAS _____	CONDICIONES _____	
No. DE JUVENILES _____	CONDICIONES _____	
No. DE ADULTOS _____	CONDICIONES _____	
No. DE REPRODUCTORES _____	CONDICIONES _____	
OBSERVACIONES: _____		
ANÁLISIS SOLICITADOS:	<input type="checkbox"/> AT <input type="checkbox"/> PT <input type="checkbox"/> BT <input type="checkbox"/> HT <input type="checkbox"/> VR	
ENCUESTADO		
NOMBRE: _____	FIRMA: _____	TELÉFONO: _____
ENCUESTADOR		
NOMBRE: _____	FIRMA: _____	



ANEXO B

FORMATO: TOMA DE MUESTRAS, DI-SAC-02

	<p>Anexo: Toma de muestras DI-SAC-02</p> <p>Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal Departamento de Sanidad Acuicola</p>	<p>Version Vigente No. 00</p> <p>Fecha: 03/06/09</p>
---	--	--

Version vigente No.	06	Fecha:	24/05/10
---------------------	----	--------	----------

FECHA (dd/mm/aa): _____ ESTANQUE: _____
NOMBRE DEL TÉCNICO: _____ IDENTIFICACION O CANTIDAD: _____
OBSERVACIONES: _____ ORGANISMOS: VIVOS ___ MUERTOS ___
TARAR: _____

No.	LONGITUD TOTAL (cm)	PESO (g)
1	_____	_____
2	_____	_____
3	_____	_____
4	_____	_____
5	_____	_____
6	_____	_____
7	_____	_____
8	_____	_____
9	_____	_____
10	_____	_____

REPORTE DE LECTURA DE LAS PREPARACIONES EN FRESCO



PIEL: _____

BRANQUIAS: _____

CONTENIDO INTESTINAL: _____

OTRO: _____

No. DE TUBOS VIROLOGÍA _____

	Página 1 de 1	
---	---------------	---

ANEXO C

INSTRUCTIVO DEL KIT DE ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO PARA ELISA BKD *Renibacterium salmoninarum* (BIOS Chile®).

Materiales incluidos

Reactivos

- **Solución de lavado (25x):** Frasco con 60 ml de solución amortiguadora-salina a pH 7.5. Contiene 0.02% de Timerosal. En caso de producirse cristalización, se debe entibiar a 37 °C hasta la disolución de los cristales.
- **Solución de extracción (2x):** Frasco con 60 ml de una solución amortiguadora a pH 8.0 para la maceración del tejido. Contiene 0.2% de azida de sodio.
- **Solución de extracción de fluido celómico (2x):** Frasco con 60 ml de una solución amortiguadora a pH 8.0 para la dilución del fluido celómico. Contiene 0.02% de Timerosal.
- **Conjugado (10x):** Frasco con 1.1 ml de anticuerpo monoclonal específico para *Renibacterium salmoninarum* conjugado con peroxidasa. Contiene 0.02% de Timerosal.
- **Solución de dilución del conjugado:** Frasco con 12 ml de una solución protéica opalescente para la dilución del conjugado.
- **Substrato A:** Frasco con 6.5 mL de Tetrametilbencidina (TMB). El TMB es un reactivo muy sensible y no debe ser utilizado si presenta aspecto turbio o precipitado azul.
- **Substrato B:** Frasco con 6.5 ml de peróxido de hidrógeno.
- **Control positivo:** Frasco con 1.5 ml de una suspensión de *Renibacterium salmoninarum*. Contiene 0.02% de Timerosal.
- **Control negativo:** Frasco con 1.5 ml de solución salina.
- **Ácido sulfúrico (H₂SO₄) 3N:** Frasco con 6.5 ml de solución. En caso de contacto de la piel con el ácido, lave la zona de inmediato con abundante agua.

Insumos

- Doce tiras de 8 pocillos de poliestireno de alta calidad, sensibilizados con un anticuerpo monoclonal purificado específico de *Renibacterium salmoninarum*.
- Placa soporte para las tiras.
- Sellos autoadhesivos para las placas.
- Folleto instructivo.

Materiales no incluidos

- Pipetas.
- Puntas desechables.
- Material para preparar o diluir soluciones.
- Estufa de temperatura regulada.
- Agitador y lavador de placas
- Lector de placas para ELISA.

Precauciones

- Utilizar sólo para el diagnóstico veterinario *in vitro*.
- El control positivo es una suspensión de *Renibacterium salmoninaru* inactivada, sin capacidad para infectar peces. Tome las precauciones de no contaminar otras soluciones que se utilicen en el ensayo de ELISA para evitar falsos positivos.
- Siempre considere que la reproducibilidad de los resultados depende de la precisión del pipeteo, de la exactitud de los tiempos y temperatura de incubación, del correcto lavado de los pocillos y de la homogeneización de las soluciones.
- Todos los reactivos deben mantenerse entre 2 y 8 °C, sin embargo cuando van a ser utilizados deben encontrarse a temperatura ambiente (18 a 25 °C).
- No mezcle reactivos de lotes distintos.
- Mantenga siempre la placa en su sobre, sellado para protegerla de la humedad. Antes de abrir el sobre permita que alcance la temperatura ambiente.
- Los recipientes usados para los reactivos deben estar limpios y libres de detergentes.
- Se deben usar puntas de pipeta diferentes para cada muestra, los controles y los reactivos. Evite tocar la pared del pocillo para no contaminar las soluciones.
- No utilice objetos metálicos que puedan entrar en contacto con las soluciones.
- No utilice el kit después de la fecha de expiración.

Preparación de la muestra

• **Muestra de tejido.**

Antes de procesar las muestras de tejido, diluya la solución de extracción (2x) con igual volumen de agua destilada. Por ejemplo, si necesita 20 ml de esta solución, mezcle 10 mL de la solución con 10 ml de agua destilada.

Para preparar el extracto de riñón de peces, tome un trozo de aproximadamente 1 gramo de tejido y transféralo a una bolsa plástica conjuntamente con 2 ml de la Solución de extracción. Si la cantidad de tejido es menor, use la misma proporción de 1:2 (peso tejido:volumen de solución). Selle la bolsa y macere el tejido con la ayuda de la mano, de una cuchara u otro objeto similar. Es importante sellar bien la bolsa para evitar contaminación cruzada entre muestras. Posteriormente abra la bolsa y transfiera todo el contenido de la muestra a un tubo Eppendorf con la ayuda de una pipeta Pasteur. En caso de usar una pipeta automática, corte la parte de la punta con una tijera limpia para permitir el paso del líquido conjuntamente con trozos de tejido. Centrifuge el tubo a 1.000g por 2 minutos a temperatura ambiente y del sobrenadante tome 100 µl y agréguelo al pocillo correspondiente.

Con peces grandes es posible realizar el mismo procedimiento pero dividiendo el riñón en un tercio anterior, uno medio y uno posterior, para así preparar los extractos correspondientes a cada trozo renal en la forma descrita anteriormente.

• **Fluido celómico**

Antes de procesar las muestras de fluido celómico, diluya la solución de dilución de fluido celómico 2x con igual

Detección de Renibacterium salmoninarum en trucha arco iris (Oncorhynchus mykiss) en granjas comerciales del estado de México

volumen de agua destilada. Por ejemplo, si necesita 20 ml de esta solución, mezcle 10 ml de la solución 2x con 10 ml de agua destilada.

Para preparar la muestra tome 1 ml de fluido celómico y agregue 1 ml de la solución de dilución de fluido celómico (previamente diluida). Centrifuge a 1.000g por 10 minutos y utilice 100 µl del sobrenadante para el ensayo de ELISA.

Procedimiento

1. Diluya la solución de lavado que se encuentra concentrada 25 veces (25x). Si va a utilizar dos tiras de 8 pocillos (16 pocillos), prepare 10 ml de solución de lavado tomando 4 ml de la solución concentrada y agregando 96 mL de agua destilada. Agite bien antes de usar.
2. Antes de realizar el ensayo deberá diluir el conjugado. Para ello tome un volumen adecuado según el número de pocillos que utilizará, y siempre considere 1 ó 2 pocillos extras. Por ejemplo, si usa 10 pocillos tome un volumen de 110 µl de conjugado y dilúyalo con 990 µl de la solución de conjugado, y manténgalo a temperatura ambiente.
3. Cada vez que realice el ensayo, incluya 2 pocillos para el control positivo y 3 pocillos para el control negativo.
4. Agregue 100 µl de cada extracto de tejido centrifugado a los correspondientes pocillos, y selle la placa con el sello autoadhesivo para impedir la evaporación de los reactivos. Incube por 60 minutos a 37 ± 1 °C.
5. Elimine el contenido de los pocillos y lave la placa con solución de lavado diluida (1x) usando aproximadamente 350 µl por pocillo. Elimine la solución después de cada lavado. Se recomienda lavar 6 veces con equipos lavadores automáticos y 4 veces si lo hace de forma manual.
6. Después del último lavado ponga la placa invertida y golpéela suavemente sobre papel absorbente. No permita que la placa se seque.
7. Agregue a cada pocillo 100 µl del conjugado previamente diluido como se indicó en el punto 2. Selle la placa de la misma forma que en el punto 4 e incúbela por 30 minutos a 37 ± 1 °C.
8. Lave la placa con la solución de lavado de manera similar a la descrita en los puntos 5 y 6
9. Revelado: agregue a cada pocillo 50 µl de substrato A y luego 50 µl de Substrato B. si desea, se pueden mezclar los substratos A y B en partes iguales en un recipiente limpio y luego agregar 100 µl de la mezcla a cada pocillo. Prepare la mezcla de substratos justo antes de usar, ajustando las cantidades según el número de tiras indicadas a continuación.

Número de pocillos	Substrato A (TMB)	Substrato B (H ₂ O ₂)
8	0.6 ml	0.6 ml
16	1.0 ml	1.0 ml
24	1.4 ml	1.4 ml
48	2.6 ml	2.6 ml
96	5.0 ml	5.0 ml

Incube La placa en obscuridad absoluta durante 30 minutos exactos y a temperatura ambiente.

10. Detenga La reacción agregando μl de $(\text{H}_2\text{SO}_4)_3\text{N}$ a cada pocillo. Los pocillos positivos inicialmente de color azul intenso, se tornarán amarillos, los pocillos negativos, incoloros o levemente azulados permanecerán incoloros o presentarán una leve coloración amarilla.

Es necesario detener la reacción, ya que si se permite que la reacción enzimática continúe por un período adicional de tiempo, todos los pocillos se colorearán.

Lectura

La placa puede ser leída visualmente o con un lector de placas manual o automático.

- Lectura inmediata en forma visual: los pocillos correspondientes a muestras positivas serán de color amarillo y podrán ser fácilmente diferenciados de los pocillos negativos, los que serán incoloros o presentarán una leve coloración amarilla.
- Lectura con un lector de placas de ELISA: Lea la placa con un lector manual o automático para placas de ELISA usando un filtro de 450nm. Se recomienda un lector de placas con capacidad de lectura de 2 o más unidades de absorbancia.

Cálculo del cut off

Cut off= promedio control negativo + 0.260

Ejemplo del cálculo:

- Promedio de control negativo (n=3) = 0.086
- Promedio del control positivo (n=3) = 2.700
- Cut off = 0.086+0.260 = 0.346

Interpretación de resultados

Si la razón control positivo/control negativo es menor que 10, se invalida el ensayo.

Una muestra será positiva cuando su absorbancia sea mayor que el valor del cut off.

Una muestra será negativa cuando su absorbancia sea menor que el valor del cut off. Si la absorbancia de una muestra está en el valor del cut off \pm 10%, repita el ensayo en duplicado. Si la lectura persiste en esta zona, considere la muestra sospechosa para BKD.

Especificidad del ensayo

Los anticuerpos monoclonales utilizados son específicos para *Renibacterium salmoninarum* ATCC y para 4 aislados obtenidos de diferentes centros de cultivo del sur de Chile. Además no presentan reactividad cruzada con patógenos de peces tales como *Yersinia ruckeri*, *Piscicickettsia salmonis*, *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sobria*, *Vibrio anguillarum* y *Escherichia coli*.

ELISA BKD Bios Chile, Santiago de Chile. Número de catálogo # 1430138. www.bioschile.cl

ANEXO D

ENFERMEDADES CERTIFICABLES DE LAS ESPECIES DE ORGANISMOS ACUÁTICOS VIVOS DESTINADOS A LA ACUACULTURA U ORNATO.

SALMÓNIDOS (TRUCHAS Y SALMONES)	
VHS	Septicemia Hemorrágica Viral.
IHN	Necrosis Hematopoyética Infecciosa.
IPN	Necrosis Pancreática Infecciosa.
VEN	Necrosis Eritrocítica Viral.
HVSD.	Enfermedad Viral por Herpes.
Enfermedad del torneo (Whirling disease).	<i>Myxosoma cerebralis</i> .
Ceratomixosis.	<i>Ceratomyxa shasta</i> .
*BKD.	Enfermedad Bacteriana del Riñón. (<i>Renibacterium salmoninarum</i>)

*Agente bacteriano.

Fuente: NOM-010-PESC-1993.

ANEXO E

Resultados de la prueba de ELISA para BKD a partir de muestras de riñón.

CASO	DO ₄₅₀	RESULTADO
1	0.094	Negativo
2	0.096	Negativo
3	0.264	Negativo
4	0.117	Negativo
5	0.076	Negativo
6	0.079	Negativo
7	0.100	Negativo
8	0.210	Negativo
9	0.085	Negativo
10	0.175	Negativo
11	0.057	Negativo
12	0.327	Negativo
13	0.076	Negativo
14	0.093	Negativo
15	0.269	Negativo
16	0.150	Negativo
17	0.068	Negativo
18	0.085	Negativo
19	0.082	Negativo
20	0.183	Negativo
21	0.059	Negativo
22	0.051	Negativo
23	0.130	Negativo
24	0.104	Negativo
25	0.124	Negativo
26	0.109	Negativo
27	0.143	Negativo
28	0.206	Negativo
29	0.078	Negativo
30	0.076	Negativo
31	0.274	Negativo
32	0.098	Negativo

Detección de Renibacterium salmoninarum en trucha arco iris (Oncorhynchus mykiss) en granjas comerciales del estado de México

33	0.103	Negativo
34	0.099	Negativo
35	0.083	Negativo
36	0.453	Negativo
37	0.095	Negativo
38	0.093	Negativo
39	0.131	Negativo
40	0.194	Negativo
41	0.233	Negativo
42	0.170	Negativo
43	0.219	Negativo
44	0.068	Negativo
45	0.068	Negativo
46	0.066	Negativo
47	0.077	Negativo
48	0.060	Negativo
49	0.064	Negativo
50	0.048	Negativo
51	0.078	Negativo
52	0.168	Negativo
53	0.118	Negativo
54	0.050	Negativo
55	0.239	Negativo
56	0.119	Negativo
57	0.054	Negativo
58	0.165	Negativo
59	0.111	Negativo
60	0.191	Negativo
61	0.128	Negativo
62	0.047	Negativo
63	0.251	Negativo
64	0.090	Negativo
65	0.057	Negativo
66	0.113	Negativo
67	0.053	Negativo
68	0.123	Negativo
69	0.066	Negativo
70	0.061	Negativo

*Detección de Renibacterium salmoninarum en trucha arco iris (Oncorhynchus mykiss)
en granjas comerciales del estado de México*

71	0.057	Negativo
72	0.284	Negativo
73	0.082	Negativo
74	0.097	Negativo
75	0.082	Negativo
76	0.071	Negativo
77	0.097	Negativo
78	0.095	Negativo
79	0.072	Negativo
80	0.110	Negativo
81	0.139	Negativo
82	0.289	Negativo
83	0.122	Negativo
84	0.181	Negativo
85	0.094	Negativo
86	0.146	Negativo
87	0.105	Negativo
88	0.157	Negativo
89	0.067	Negativo
90	0.079	Negativo
91	0.102	Negativo
92	0.122	Negativo
93	0.297	Negativo
94	0.093	Negativo
95	0.225	Negativo
96	0.295	Negativo
97	0.291	Negativo
98	0.172	Negativo
99	0.292	Negativo
100	0.123	Negativo