

APARTADO 2.3.

ENFERMEDADES DE LOS PECES

CAPÍTULO 2.3.0.

INFORMACIÓN GENERAL

A. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

1. Evaluación del estado sanitario de la unidad epidemiológica

1.1. Tipos de muestras que deben utilizarse para las pruebas

El tipo de muestra y la cantidad de muestras que deben recogerse dependen de la enfermedad o agente patógeno, del tamaño de los animales y del objetivo de la prueba (es decir, si se trata del diagnóstico de una enfermedad manifiesta, la detección de peces portadores subclínicos de agentes patógenos o una vigilancia específica para demostrar la ausencia de una enfermedad determinada). En la *Guía de la OIE para la Vigilancia Sanitaria de los Animales Acuáticos* (2009) y en el Capítulo 1.3 del Código Sanitario de la OIE para los Animales Acuáticos se ofrece información sobre el diseño y la evaluación de los sistemas de vigilancia para animales acuáticos, y en los capítulos de este *Manual Acuático* dedicados a cada enfermedad se ofrecen detalles sobre los requisitos de las muestras.

1.2. Especificaciones en función de la población de peces

En la *Guía de la OIE para la Vigilancia Sanitaria de los Animales Acuáticos* (2009) y en el Capítulo 1.4 del código Sanitario de la OIE para los Animales Acuáticos se ofrecen datos generales. Los detalles concretos sobre los requisitos de las muestras para cada enfermedad de la lista de la OIE se ofrecen en cada uno de los capítulos correspondientes de este *Manual Acuático*. En ausencia de pruebas que indiquen lo contrario, el diseño de un sistema de vigilancia para demostrar la ausencia de enfermedad en un país, zona o compartimiento precisa un nivel mínimo de muestras adecuado para una prevalencia supuesta del 2% utilizando una prueba que se considere sensible al 100%, y para mantener el esa ausencia de enfermedad, debe realizarse un muestreo adecuado para una prevalencia supuesta del 5 al 10%.

1.3. Especificaciones en función del estado clínico

En el caso de infección clínica, además de alevines o vísceras enteras, otros órganos que también deben tomarse son el riñón anterior, el bazo y el corazón o el encéfalo para la mayoría de pruebas de detección de virus (branquias e intestino cuando se pretenda detectar el herpesvirus koi), piel o músculo cuando se pretenda diagnosticar el síndrome ulcerante epizoótico, y piel y aletas para detectar *Gyrodactylus salaris*. Las muestras de diez peces clínicamente enfermos deben ser suficientes para la/s prueba/s de detección de agentes patógenos en cada unidad epidemiológica. Para detectar portadores subclínicos de virus o para la vigilancia específica en la que se exija una gran cantidad de muestras, las muestras pueden combinarse formando muestras compuestas como se indica en cada capítulo específico del *Manual Acuático*.

1.4. Especificaciones en función del tamaño de los peces

1.4.1. Para las enfermedades de la lista, excepto la herpesvirosis de la carpa koi y la encefalopatía y retinopatía virales

Alevines y alevines con saco vitelino: se obtiene el pez entero pero se retira el saco vitelino si lo hay.

Peces de entre 4 y 6 cm: se extraen las vísceras enteras, incluido el riñón. Puede obtenerse un trozo de encéfalo tras separar la cabeza a nivel del borde posterior del opérculo y presionando lateralmente.

Peces de más de 6 cm: se extrae el riñón, el bazo y el corazón o el encéfalo y/o los tejidos adecuados para el agente patógeno específico que se desee detectar (consúltense los detalles en los capítulos sobre cada enfermedad en este *Manual Acuático*).

Peces adultos: se extrae el líquido ovárico, el esperma y/o los tejidos adecuados para el agente patógeno específico que se desee detectar (consúltense los detalles en los capítulos sobre cada enfermedad en este *Manual Acuático*).

1.4.2. Para el síndrome ulcerante epizoótico (SUE)

Cualquier tamaño de pez: riñón, hígado, tejido muscular (para detalles específicos véase el Capítulo 2.3.2. Síndrome ulcerante epizoótico).

1.4.3. Para *Gyrodactylussalaris*

Cualquier tamaño de pez: piel y aletas (para detalles específicos véase el Capítulo 2.3.3. Girodactilosis [*Gyrodactylussalaris*]).

1.4.4. Para la herpesvirosis de la carpa Koi (HVK)

Peces de entre 4 cm y adultos: se extraen las branquias, el riñón, el bazo, el encéfalo y tejidos intestinales en función de la prueba utilizada (para detalles específicos véase el Capítulo 2.3.6. Herpesvirosis de la carpa Koi).

1.4.5. Para la encefalopatía y retinopatía virales (ERV)

Peces de entre 2 y 4 cm: se toma la cabeza entera.

Peces de entre 4 cm y adultos: se toma el encéfalo y posiblemente los ojos y la medula espinal (para detalles específicos véase el Capítulo 2.3.11. Encefalopatía y retinopatía virales).

2. Procesado general de las muestras

2.1. Examen macroscópico

En el caso de las enfermedades de la lista de la OIE, el examen macroscópico se utiliza principalmente para detectar signos clínicos del síndrome ulcerante epizoótico o *Gyrodactylus salaris*, pero va seguido de un examen microscópico de preparaciones histológicas para el primero, o de preparaciones húmedas de raspados de piel/aletas para el segundo.

2.2. Examen virológico

2.2.1. Transporte y tratamiento de las muestras con antibiótico

Se depositan muestras compuestas de órganos o de líquidos ováricos en viales estériles y se guardan a 4°C o sobre hielo hasta que se extrae el virus en el laboratorio. Lo ideal es llevar a cabo la extracción del virus en un plazo de 24 horas tras recoger los peces, pero también es aceptable un plazo de 48 horas si la temperatura se mantiene a 0°C–4°C, o plazos más largos en el caso de muestras de enfermedades clínicas que se hayan congelado a -80°C. Sin embargo, debe evitarse la congelación de muestras destinadas a la detección de portadores subclínicos.

Las muestras de órganos también pueden transportarse al laboratorio introduciéndolas en viales que contengan medio de cultivo celular o solución salina equilibrada de Hank (HBSS) con antibióticos que supriman el crecimiento de contaminantes bacterianos (un volumen de órgano en al menos cinco volúmenes de líquido de transporte). Las concentraciones de antibiótico adecuadas son: gentamicina (1000 µg ml⁻¹) o penicilina (800 Unidades Internacionales [IU] ml⁻¹) y estreptomycin (800 µg ml⁻¹). Al medio de transporte también pueden añadirse compuestos antifúngicos como Mycostatin® o Fungizone®, a una concentración final de 400 IU ml⁻¹. Puede añadirse suero o albúmina (5–10%) para estabilizar el virus si el transporte va a durar más de 12 horas.

2.2.2. Extracción de virus

Este procedimiento debe llevarse a cabo a temperaturas inferiores a los 15°C (preferiblemente a 0 a 10°C)

- Se decanta el medio suplementado con antibiótico para separarlo de la muestra de órganos.

- Se homogeneizan las muestras de órganos compuestas en medio de transporte a una dilución final de 1/10 con un mortero o un homogeneizador eléctrico hasta obtener una pasta.
- Se centrifuga el homogenado en una centrífuga a 2–5°C a 2.000-4.000 **g** durante 15 minutos, se recoge el sobrenadante y se trata durante cuatro horas a 15°C o bien durante toda la noche a 4°C con antibióticos, como gentamicina 1 mg ml⁻¹. Si el envío de la muestra se ha llevado a cabo en un medio de transporte (es decir, con exposición a antibióticos) el tratamiento del sobrenadante con antibióticos puede omitirse. El tratamiento con antibióticos hace innecesaria la filtración por filtros de membrana.
- De igual forma, las muestras de líquido ovárico pueden tratarse con antibióticos para controlar la contaminación microbiana, pero no deben diluirse más de cinco veces en el medio que contiene HBSS y antibiótico.
- Las muestras de líquido ovárico deben centrifugarse como los homogenados de órganos, y sus sobrenadantes deben utilizarse directamente en pasos posteriores.

2.2.3. Tratamiento para neutralizar virus enzoóticos

Los peces a menudo son portadores subclínicos de virus endémicos, como birnavirus (por ejemplo, el de la necrosis pancreática infecciosa [VNPI]), que inducen un efecto citopático en cultivos celulares susceptibles y, por tanto, complican el aislamiento y la identificación de los agentes patógenos en cuestión. En este tipo de situaciones, la infectividad de los virus enzoóticos debe neutralizarse antes de llevar a cabo pruebas de detección de virus de la lista del *Código Sanitario de Animales Acuáticos*. Sin embargo, cuando es importante determinar si está presente uno de los virus enzoóticos, las muestras deben analizarse en presencia y en ausencia de anticuerpos neutralizantes (NAb).

Para neutralizar los birnavirus acuáticos, se mezclan volúmenes iguales (200 µl) de una solución de uno o más NAb contra los serotipos de birnavirus autóctonos con el sobrenadante a analizar. Se deja que la mezcla reaccione durante 1 hora a 15°C o durante toda la noche a 4°C antes de inocularla en monocapas celulares susceptibles. El título de la solución de NAb utilizada debe ser de al menos 2000 en una prueba de reducción del 50% de placas frente a los serotipos víricos presentes en la zona geográfica en cuestión.

Cuando las muestras proceden de un país, región o población o unidad de producción de peces considerados libres de infecciones víricas enzoóticas, este tratamiento del homogenado de órganos debe omitirse.

Este enfoque también puede utilizarse para neutralizar otros virus enzoóticos de la zona analizada.

2.3. Examen parasitario

En el Capítulo 2.3.3. Girodactilosis (*Gyrodactylus salaris*) se ofrecen detalles concretos.

2.4. Examen fúngico

En el Capítulo 2.3.2. Síndrome ulcerante epizoótico se ofrecen detalles concretos.

B. MATERIALES Y PRODUCTOS BIOLÓGICOS NECESARIOS PARA EL AISLAMIENTO Y LA IDENTIFICACIÓN DE AGENTES PATÓGENOS DE LOS PECES

1. Virus de los peces

1.1. Líneas celulares de peces

Las siguientes líneas celulares de peces se utilizan para detectar los agentes patógenos víricos mencionados en el *Manual Acuático*:

Epitelioma papuloso de carpa (EPC)
 Alevines de mojarra de oreja azul (BF-2)
 Piscardo (FHM)
 Gónadas de trucha arco iris (RTG-2)
 Embrión de salmón real (CHSE-214)
 Riñón cefálico de salmón (SHK-1)
 Riñón de salmón del Atlántico (ASK)

Aleta de ronco (GF)
Aleta de carpa Koi (KF-1)
Encéfalo de carpa (CCB)

Channa striata (SSN-1)

1.2. Medios de cultivo

El medio mínimo esencial de Eagle (EMEM) tradicional con sal de Earle suplementado con suero fetal bovino al 10% (FBS), agentes antimicrobianos y L-glutamina 2 mM es el más utilizado en los cultivos de células de peces.

Sin embargo, el medio de Stoker, que es una forma modificada del anterior y está formado por una concentración doble de ciertos aminoácidos y vitaminas, se recomienda en concreto para potenciar el crecimiento celular, utilizando las mismas suplementaciones que antes + un 10% de fosfato de triptosa.

Estos medios están tamponados con bicarbonato sódico, tris-hidroximetil aminometano (Tris) 0,16 M, HCl, o, preferiblemente, ácido N-2-hidroxietil-piperacina-N-2-etanosulfónico (HEPES) 0,02 M. La utilización de bicarbonato sódico solo se restringe a los cultivos celulares preparados en recipientes muy bien cerrados.

Como alternativa, para ciertas líneas celulares, como SHK-1, se recomienda el medio de Leibovitz (L15) suplementado con FBS (al 5% o 10%), L-glutamina (4 mM) y gentamicina (50 µg ml⁻¹).

Para el crecimiento celular, el contenido en FBS del medio suele ser del 10%, mientras que para el aislamiento de virus o la producción de virus puede reducirse al 2%. De forma similar, el pH del medio de cultivo para el crecimiento celular es de 7,3-7,4 y se ajusta a 7,6 para la producción de virus o las pruebas de detección de virus.

La composición de las mezclas de agentes antimicrobianos más utilizados es penicilina (100 IU ml⁻¹) y dihidroestreptomocina (100 µg ml⁻¹). Se añade micostatina (50 IU ml⁻¹) si es probable que se produzca contaminación fúngica. Pueden utilizarse otros agentes antimicrobianos o concentraciones de los mismos según considere el técnico, en función de la sensibilidad a los antimicrobianos de las cepas bacterianas o fúngicas con las que se encuentre.

1.3. Controles positivos para virus y preparación del antígeno

1.3.1. Nomenclatura de los virus

- Virus de la necrosis hematopoyética epizootica (VNHE)
- Virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (VNHI)
- Virus de la anemia infecciosa del salmón (VAIS)
- Herpesvirus Koi (HVK)
- virus de *Oncorhynchus masou* (VOM)
- Iridovirus de la dorada japonesa (IVDJ)
- Virus de la viremia primaveral de la carpa (VVPC)
- Virus de la septicemia hemorrágica viral (VSHV)
- Virus de la encefalopatía y retinopatía virales (VERV) también denominado virus de la necrosis nerviosa viral (VNNV).

1.3.2. Producción de virus

Para la producción *in Vitro* de la mayoría de cultivos madre de estos virus, deben inocularse cultivos de monocapas celulares (consúltense los apartados pertinentes de este *Manual Acuático*) en recipientes de cultivo tisular adecuados (por ejemplo, frascos de plástico) con multiplicidades de infección (m.d.i.) bastante bajas, es decir, de 10⁻² a 10⁻³ unidades formadoras de placas (UFP) por célula.

Las temperaturas preferibles para la propagación del virus son las siguientes:

- 15°C para VNHI, VSHV, VOM y VERV (genotipo BFNNV) y VAIS
- 20°C para VVPC, HVK y VERV (genotipos BFNNV, SJNNV y TPNNV)

- 22°C para VNHE
- 25°C para IVDJ y VERV (genotipos RGNNV y SJNNV)
- 30°C para VERV (genotipo RGNNV)

1.3.3. Conservación y almacenaje de cultivos víricos madre

- Se centrifugan los cultivos celulares a 2-5°C y a 2.000-4.000 **g** durante 15 minutos y a continuación se diluyen los sobrenadantes que contienen el virus para obtener títulos víricos de una media de 10⁶ UFP ml⁻¹.
- Se dispensan las suspensiones víricas resultantes en viales estériles a razón de 0,3–0,5 ml cada uno.
- Se congela y guarda cada serie de suspensiones madre víricas estándar a -80°C o en nitrógeno líquido, y se comprueba el título de cada suspensión vírica madre a intervalos periódicos si no se ha utilizado desde la última comprobación.

Liofilización: se pueden guardar inóculos de cepas víricas estándar durante largos periodos (décadas) liofilizándolas. Para ello, suspensiones víricas en medio de cultivo celular suplementado con un 10% de suero fetal bovino se mezclan (v/v) con un volumen igual de medio crioprotector (como hidrolizado de lactoalbúmina al 20% en agua destilada) antes del procesado. Se sella o tapa al vacío y se guarda a 4°C, en la oscuridad.

2. Técnicas

2.1. Serología

2.1.1. Producción de antisueros y anticuerpos policlonales de conejo contra virus de peces

Existen varias formas de generar en conejos anticuerpos contra virus de peces. Sin embargo, el título y la especificidad están influidos por el programa de inoculación que se utilice. Para producir antisueros que vayan a ser utilizados en los procedimientos de aislamiento y/o identificación de virus descritos más adelante puede utilizarse los siguientes protocolos de inmunización.

2.1.1.1 Antisueros contra el virus de la necrosis pancreática infecciosa

Inyección intravenosa de 50–100 µg de virus purificado el día 0, seguida de un recordatorio idéntico el día 21, y sangrado 5-7 días después. Los conejos pueden volver a ser utilizados si no se sangran por completo.

2.1.1.2 Antisueros contra otros virus

Los protocolos de inmunización alternan una inyección intramuscular o intradérmica con futuros recordatorios por vía intravenosa:

Día 0: Inyección principal, 500–1.000 µg de virus purificado se mezclan (v/v) con adyuvante (incompleto de Freund u otros¹ adyuvantes que se consideran más aceptables) administrando un volumen total de 1,2 ml. Este antígeno se administra al conejo como inyecciones intradérmicas en varios puntos (2 puntos a cada lado) una vez el animal ha sido rasurado.

Día 21: Se toma una muestra de unos 2 ml de sangre y se comprueba su reactividad (neutralización, fluorescencia); se vuelve a inyectar por vía intravenosa la misma cantidad de virus purificado que en la inyección principal, pero sin adyuvante. Antes de la segunda inyección intravenosa, el conejo debe ser tratado con prometazina (12 mg por vía intramuscular) para prevenir una posible respuesta anafiláctica.

Día 28: Se toma una muestra de sangre, se comprueba la reactividad del suero y se sangra o vuelve a inyectar el conejo en función de los resultados.

En el caso de los rabdovirus, este procedimiento de inmunización está bien adaptado a la producción de antisueros que se utilizan en la inmunofluorescencia y en el enzimoimmunoanálisis. No obstante, un método más eficiente de producción de antisueros neutralizantes es la inyección intravenosa regular sin

1 La utilización de los adyuvantes completos de Freund puede estar restringida en contextos de bienestar animal. Los adyuvantes sintéticos alternativos son el dimicolato de trehalosa o el monofosfato lípido A.

adyuvante (0,2 ml) cada 3-4 días (dos veces a la semana). Pueden ser necesarias incluso 15 inyecciones; 1 semana después de la última inyección, debe recogerse y analizarse una muestra de suero.

2.1.3. Procesado y almacenaje de sueros inmunes

Tras la coagulación de la sangre, se recoge y centrifuga el suero a 20 °C y se calienta durante 30 minutos a 56°C. Se filtra el suero resultante inactivado por calor por un filtro de membrana (de 450 nm de tamaño de poro) y se guarda temporalmente a 4°C durante el tiempo necesario para comprobar su reactividad y especificidad y para comprobar que estas propiedades no resulten afectadas por las condiciones de conservación (por ejemplo, la congelación o la liofilización). Los sueros estériles de conejo pueden guardarse durante al menos 2 meses a 4°C sin riesgo de que se alteren sus propiedades. Se distribuyen (normalmente en pequeños volúmenes) y se congelan a -20°C o se liofilizan.

Pueden extraerse inmunoglobulinas (Ig) de antisueros mediante métodos convencionales adecuados para la purificación de Ig. La unión selectiva a la proteína A constituye un método fiable y eficaz. La concentración de soluciones de Ig se ajusta a los valores exigidos para la posterior preparación o almacenaje de conjugado.

Conservación de Ig: Se mezcla una solución de Ig con una concentración de 2 mg/litro con glicerol estéril puro (v/v) y se guarda a -20°C. También pueden prepararse soluciones de Ig con una concentración superior, utilizando también glicerol.

2.1.4. Anticuerpos monoclonales de ratón

A lo largo de los últimos años se han generado anticuerpos monoclonales (MAb) contra la mayoría de virus de peces. Algunos de estos, aisladamente o en forma de dos o tres MAb asociados, han dado lugar a reactivos biológicos adecuados para la identificación de grupos de virus (NPI, SHV, NHI). Otros MAb, tomados individualmente o como componentes de conjuntos de Ab, permiten una tipificación precisa de VSHV y VNHI. Estos MAb pueden obtenerse en los Laboratorios de Referencia de la lista que aparece al final de este *Manual Acuático*.

Teóricamente, los IgG monoclonales de ratón pueden procesarse y guardarse igual que los IgG policlonales. Sin embargo, la reactividad de ciertos MAb puede quedar perjudicada por procesos como los enzimáticos, el marcaje con sustancias radiactivas o la liofilización. Por tanto, es necesario analizar cómo influyen en distintos MAb las condiciones en las que se utilizarán.

2.2. Microscopía directa

Las muestras para el examen mediante microscopía directa de frotis o improntas de tejidos deben examinarse cuanto antes tras la recogida. Siempre que sea posible deben utilizarse ejemplares vivos, o frescos, refrigerados a 4°C o fijados con formalina tamponada al 10% cuando no se disponga de ejemplares vivos. Si se dispone de un laboratorio de campo adecuado, debe utilizarse para procesar y examinar las muestras cerca del lugar donde se han recogido.

2.3. Técnicas histológicas

2.3.1. Fijación e inclusión de tejidos

Para la histología solo deben tomarse muestras de ejemplares vivos o moribundos de peces con lesiones clínicas. Los tejidos retirados se fijan de inmediato en formalina tamponada al 10%. Se utilizan al menos diez volúmenes de fijador por cada volumen de muestra de tejido y se deja fijar durante al menos 24 horas. Tras retirar el fijador, las muestras de tejido se deshidratan en concentraciones crecientes de etanol, se aclaran en un agente miscible en cera, como el xileno, y a continuación se incluye en parafina mediante los protocolos estándar.

2.3.2. Corte y tinción de tejidos

Se realizan cortes de unos 5 µm de espesor a partir del bloque. Se monta cada corte sobre un porta, se retira la cera con agente miscible en cera, como el xileno o 'Clearene®', y se rehidrata.

Para los exámenes de la mayoría de enfermedades, los cortes a continuación pueden teñirse con hematoxilina y eosina (H/E), mediante el siguiente procedimiento:

Retirada de la cera

1. Se sumergen los portas en 'Clearene®' para retirar la cera, durante un mínimo de 2 minutos.
2. Se repite el paso 1 en xileno o 'Clearene'.
3. Se sumergen en alcohol al 1005 para retirar el disolvente, durante un mínimo de 2 minutos.
4. Se repite el paso 3 en alcohol al 100% limpio.

Tinción

5. Se lavan bajo el chorro de agua del grifo (RTW) durante 2–5 minutos. Los portas deben estar transparentes, no turbios.
6. Se sumergen en una solución de hematoxilina durante 3 minutos
7. Se vuelven azules bajo el RTW durante 5–10 minutos (o carbonato de litio saturado); no pueden volverse excesivamente azules.
8. Se sumergen en ácido/alcohol durante un máximo de 10 segundos.
9. Se lavan en RTW (o carbonato de litio) hasta que están azules.
10. Se comprueba al microscopio si el citoplasma está transparente y los núcleos azules.
11. Se sumergen en eosina acuosa durante 3 minutos.
12. Se lavan bien en RTW para diferenciar la eosina.

Deshidratación, lavado y montaje

13. Se lavan bien en alcohol al 70% pero no durante demasiado tiempo, puesto que este elimina la eosina.
14. Se sumergen en alcohol al 100% durante 1–2 minutos.
15. Se repite el paso 14 en alcohol limpio.
16. Se sumergen en alcohol/Clearene 50/50 durante 1–2 minutos.
17. Se sumergen en Clearene.
18. Se repite con un baño de Clearene limpio, los portas deben estar transparentes.
19. Se montan en medio de montaje DPX (distiereno, plastificante y xileno) y se dejan secar.

Para observar granulomas e hifas fúngicas, como ocurre en el síndrome ulcerante epizoótico, puede utilizarse una tinción fúngica general, como la de Grocott-Gomori, en lugar de H/E.

2.3.3 Preparación de portas para la inmunohistoquímica

Es importante observar que una fijación prolongada puede enmascarar los antígenos de interés. Por tanto, se recomienda aplicar una fijación mínima garantizando al mismo tiempo una conservación óptima (24-48 horas). La fijación se puede reducir más cuando se utilizan trozos pequeños de tejido. Sin embargo, se recomienda incorporar un paso de recuperación de antígeno (incluido en el protocolo que se indica a continuación) siempre que sea posible. A continuación, se indica un protocolo estándar de inmunohistoquímica que se usa de forma sistemática en laboratorios de histología, pero debido a posibles variaciones entre anticuerpos y a los kits de detección comerciales, es probable que cada cual tenga que optimizar la técnica en función de sus propios objetivos. Dichos objetivos incluirían factores como la determinación del título óptimo de anticuerpos, que es la dilución más alta que da lugar a la tinción específica más intensa y al mismo tiempo menor tinción "de fondo" inespecífica. Además, es posible que cada cual tenga que plantearse la posibilidad de corregir la duración de la incubación del reactivo.

1. Se llevan a cabo los pasos 1–5 del apartado 2.3 2.
2. Se enjuagan los portas en dos cambios de Tween 20 al 0,2% en PBS durante 2 minutos.
3. Se lleva a cabo la recuperación del antígeno colocando los portas en una cubeta Coplin de plástico que contenga tampón citrato de sodio y se coloca sobre una rejilla de una vaporera situada dentro de una olla a presión.
4. Se calienta la olla a presión con calor intenso hasta que el indicador de salida de vapor indique que se ha alcanzado la presión máxima.

5. Se reduce la temperatura y se deja sobre un calentaplatos unos 10 minutos manteniendo la presión.
6. Se retira del calentaplatos y se deja enfriar y evaporar unos 20-30 minutos en una campana de gases antes de abrirla.
7. Se extra la cubeta Coplin de la olla a presión y se sustituye el tampón citrato de sodio por agua de grifo tibia seguida de agua de grifo fría y agua destilada. Esto sirve para enfriar los portas progresivamente.
8. Si es necesario, se lleva a cabo un bloqueo de la actividad biotina/avidina endógena (a) se incuban los portas durante 15-20 minutos en avidina al 0,005% en PBS (b) se enjuaga en PBS y a continuación (c) se incuban en biotina al 0,005% en PBS durante 15-20 minutos. Como alternativa, se utiliza un sistema de bloqueo comercial de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Esto normalmente se lleva a cabo en tejidos que contienen altos niveles de biotina, como el hígado, el riñón o el bazo.
9. Se enjuagan los portas brevemente en agua de grifo.
10. Se enjuagan los portas en Tween 20 al 0,2% en PBS durante 2 minutos.
11. Se inclinan para retirar el reactivo y se secan alrededor del corte de tejido asegurando que el corte se mantenga húmedo.
12. Se incuban con anticuerpo primario a 25°C durante 30 minutos con una rotación orbital suave si se dispone de ella.
13. Se enjuagan los portas en Tween 20 al 0,2% en PBS de una botella de lavado.
14. Se inclinan para retirar el reactivo y se secan alrededor del corte de tejido asegurando que el corte se mantenga húmedo
15. Se incuban con anticuerpo secundario biotinilado a 25°C durante 10 minutos con una rotación orbital suave si se dispone de ella.
16. Se enjuagan los portas en Tween 20 al 0,2% en PBS de una botella de lavado.
17. Se inhibe la actividad peroxidasa endógena colocando los portas en peróxido de hidrógeno al 0,3% en PBS con azida sódica al 0,1% durante 10-15 minutos a temperatura ambiente.
18. Se enjuagan los portas en Tween 20 al 0,2% en PBS de una botella de lavado.
19. Se incuban con el complejo comercial preferido de detección de estreptavidina marcada con peroxidasa a 25°C durante 10 minutos con una rotación orbital suave si se dispone de ella.
20. Se enjuagan los portas en Tween 20 al 0,2% en PBS de una botella de lavado.
21. Se aplica cromógeno DAB a los portas y se desarrolla el producto de la reacción realizando un seguimiento al microscopio durante el tiempo óptimo. La duración variará en función del producto de DAB utilizado.
22. Se detiene la reacción colocando los portas en agua de grifo.
23. Se lleva a cabo una potenciación cromógena (opcional) colocando los portas en sulfato de cobre al 0,5% en PBS durante 1-5 minutos a 25°C con una rotación orbital suave.
24. Se enjuagan en agua destilada.
25. Se aplica una tinción de contraste con hematoxilina de Harris durante 2-3 minutos.
26. Se enjuagan con agua.
27. Se deshidratan, se aclaran y se montan.

Preparación del reactivo

| | | |
|--------------------------|---------------------------------------|-----------|
| PBS-Tween 20 (0,2%): | Solución salina tamponada con fosfato | 10 litros |
| | Tween 20 | 2 ml |
| Tampón citrato de sodio: | Citrato de tri-sodio (dihidrato) | 2,94g |
| | Agua destilada | 1 litro |
| | Tween 20 | 0,5 ml |

Se mezcla para disolver, se ajusta el pH a 6,0 con HCl 1 N antes de añadir el Tween 20. Se guarda esta solución a temperatura ambiente un máximo de 3 meses o a 4°C si el periodo de almacenaje va a ser superior.

2.4. Microscopía electrónica

La microscopía electrónica (de transmisión o de barrido) es una útil herramienta de investigación para el estudio de las enfermedades de los animales acuáticos. No obstante, estos métodos no se suelen utilizar en el diagnóstico sistemático de las enfermedades de los peces de la lista de la OIE, de modo que en este *Manual Acuático* no están descritos.

2.5. Utilización de técnicas moleculares para análisis y diagnóstico confirmativos

Se han desarrollado técnicas moleculares, como sondas de ácido nucleico y una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para identificar muchos agentes patógenos de los animales acuáticos. Sin embargo, como ocurre con muchas otras técnicas de diagnóstico, la ventaja de la sensibilidad a menudo queda contrarrestada por problemas de interpretación o susceptibilidad a problemas técnicos. Al utilizar la PCR como método de diagnóstico, es importante el diseño de cebadores y sondas, la utilización de controles, y la validación del método de PCR elegido. La PCR puede depender bastante de las condiciones en las que se ejecuta y puede estar muy sujeta a la contaminación del laboratorio por productos de PCR previos, lo cual da lugar a falsos positivos. Así pues, aunque en esta versión del *Manual Acuático* se incluyen varios protocolos de sondas de ácido nucleico y de PCR como métodos de diagnóstico o confirmativos para peces, siempre que ha sido posible se han especificado técnicas bien conocidas (como el aislamiento del virus) como métodos estándar de detección. Siempre que se utilicen estas técnicas moleculares más recientes, deben llevarse a cabo con cautela y prestando especial atención a la utilización de controles positivos y negativos apropiados.

2.5.1. Preparación y tipos de muestras

En el caso de estas técnicas, las muestras deben prepararse para conservar el ácido nucleico del patógeno. Asimismo, las muestras destinadas a análisis con métodos basados en anticuerpos deben conservarse para retener los puntos antigénicos reactivos a los anticuerpos utilizados.

Las muestras destinadas a análisis basados en el ácido nucleico o en anticuerpos deben manipularse y empaquetarse con muchísimo cuidado para minimizar la posible contaminación cruzada entre muestras o que el material se deteriore antes de poder realizar la prueba. Para prevenir la contaminación, deben utilizarse recipientes nuevos (bolsas de plástico o frascos para muestras). Dentro de cada recipiente o contenedor para grupos de muestras debe introducirse una etiqueta impermeable con los datos correspondientes.

Algunos de los métodos adecuados para la conservación y transporte de muestras destinadas a pruebas moleculares o basadas en anticuerpos son los siguientes:

- Ejemplares vivos conservados en hielo o refrigerados: en el caso de los ejemplares que pueden transportarse rápidamente al laboratorio para ser analizados en un plazo de 24 horas, las muestras se introducen en bolsas de muestra envueltas de una cantidad suficiente de hielo húmedo en una caja isotérmica y se envían al laboratorio.
- Ejemplares enteros congelados: se escogen ejemplares vivos según el objetivo del muestreo, se congelan rápidamente en el campo utilizando hielo seco triturado, o se congelan en un laboratorio de campo mediante un congelador mecánico a -20 °C o temperaturas inferiores. Se prepara e introduce la etiqueta en el recipiente con las muestras, se introducen las muestras en una caja isotérmica con una cantidad suficiente de hielo seco, y se envían al laboratorio.
- Muestras conservadas en alcohol: en las zonas donde el almacenaje y el envío de muestras congeladas son problemáticos, puede utilizarse etanol al 90-95% para conservar, guardar y transportar ciertos tipos de muestras. Se preparan para el envío según los métodos descritos anteriormente.
- Tejidos fijados para hibridación *in-situ* e inmunohistoquímica: para este fin, serán adecuados los métodos clásicos de conservación de tejidos. Normalmente la formalina tamponada es una buena opción si posteriormente van a utilizarse sondas moleculares. Para respetar el ADN, la sobre-fijación (de más de 24-48 horas) en particular deberá evitarse.

2.5.2. Conservación del ARN y el ADN en los tejidos

Se corta el tejido realizando un corte de menos de 0,5 cm en una dimensión y se sumerge en 10 volúmenes de RNAlater (por ejemplo, una muestra de 0,5 g requiere unos 5 ml de RNAlater). Los

órganos pequeños, como los riñones, el hígado y el bazo pueden guardarse enteros en RNAlater. Estas muestras pueden guardarse a 4°C durante un mes, a 25°C durante 1 semana o indefinidamente a -20°C o temperaturas inferiores. Los tejidos de archivo tratados con RNAlater se guardan a -20°C o temperaturas inferiores.

2.5.3. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN, se trituran los tejidos en 10 volúmenes de tampón de extracción (NaCl [100 mM], ácido etilendiaminotetraacético [EDTA, 25 mM], a pH 8, y dodecil sulfato de sodio [SDS, 0,5%]) suplementado con proteinasa K (100 µg ml⁻¹). Tras una incubación durante toda la noche a 50°C, se extrae el ADN mediante un protocolo estándar de fenol/cloroformo, y se precipita con etanol. Para aislar el ADN de los tejidos conservados en RNAlater, simplemente se retira el tejido del RNAlater y se trata como si se acabara de tomar la muestra. La mayoría de tejidos se pueden homogeneizar directamente en tampón de lisis o de extracción.

Teniendo en cuenta las limitaciones de tiempo y los riesgos para el personal del laboratorio, los kits comerciales pueden constituir alternativas técnicas satisfactorias. La utilización de kits comerciales debe validarse comparándolos con un protocolo estándar de fenol/cloroformo antes de utilizarse sistemáticamente en laboratorios de diagnóstico.

2.5.4. Extracción de ARN

Para aislar ARN de tejidos conservados en RNAlater, simplemente se retira el tejido del RNAlater y se trata como si se acabara de tomar la muestra. La mayoría de tejidos se pueden homogeneizar directamente en tampón de lisis o de extracción.

Teniendo en cuenta las limitaciones de tiempo y los riesgos para el personal del laboratorio, los kits comerciales pueden constituir alternativas técnicas satisfactorias. La utilización de kits comerciales debe validarse comparándolos con un protocolo estándar de fenol/cloroformo antes de utilizarse sistemáticamente en laboratorios de diagnóstico.

2.5.5. Preparación de portas para la hibridación *in-situ*

Para la hibridación *in-situ* (ISH), deben fijarse los tejidos de peces en formalina tamponada durante unas 24 horas y a continuación incluirse en parafina según métodos histológicos estándar, como se describe en el apartado 3.3. Los cortes deben tener un grosor de 5 µm y se deben depositar sobre portas recubiertos de aminalquilsilano, que a continuación se hornean durante toda la noche en un horno a 40°C. Se retira la cera de los portas sumergiéndolos en xileno durante 10 minutos. Este paso se repite una vez y a continuación se elimina el disolvente sumergiéndolos en dos baños sucesivos de etanol absoluto de 10 minutos cada uno. A continuación, los cortes se rehidratan mediante inmersión en una serie de diluciones de etanol. El protocolo puede exigir un paso de permeabilización de membrana que permita el acceso al ADN diana. Para este fin, los cortes se tratan con proteinasa K (100 µg ml⁻¹) en tampón TE (Tris [50 mM], EDTA [10 mM]), a 37°C durante 30 minutos. Para las pruebas de ISH, es fundamental teñir un porta que se sepa que es positivo y uno que se sepa que es negativo, para eliminar falsos positivos debidos a una tinción inespecífica/tinción en los bordes, y falsos negativos debidos a errores en el protocolo de tinción.

3. Otros tipos de información necesaria

El origen geográfico de las muestras debe definirse mediante el nombre del lugar de recogida junto con sus coordenadas geográficas o su localización en el curso de un río o en una masa de agua. También es indispensable conocer el nombre de la persona que ha recogido la muestra, la empresa, la fecha, el momento, el nombre de la masa de agua y una descripción del lugar. Además, se debe registrar la información que permita una trazabilidad de la muestra desde el lugar donde se recogió hasta el lugar donde se almacenará o el laboratorio donde se analizará, y también en el interior de dichas instalaciones. Las instalaciones donde se guarde deben registrar información sobre el método de conservación, el lugar donde está guardada y la fecha y hora de almacenaje en cada armario o nevera de almacenaje, además de información sobre la temperatura de almacenaje (la cual, preferiblemente, deberá registrarse sin interrupción). Esta información debe poder asociarse a un único código de muestra para todas las muestras. En el caso de los laboratorios, la fecha de recepción, la información sobre el lugar de almacenamiento, la fecha de análisis, los datos del análisis y la fecha del informe deben guardarse para todas las muestras identificadas con un solo código. Estos datos facilitarán mucho la trazabilidad de posibles problemas con la muestra y proporcionarán la garantía de que las muestras se manipularán adecuadamente.

BIBLIOGRAFÍA CLAVE PARA AMPLIAR LA LECTURA

AMEND D., YASUTAKE W. & MEAD R. (1969). A hematopoietic virus disease of rainbow trout and sockeye salmon. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **98**, 796–804.

ARNZEN J.M., RISTOW S.S., HESSON C.P. & LIENTZ J. (1991). Rapid fluorescent antibody test for infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) utilizing monoclonal antibodies to nucleoprotein and glycoprotein. *J. Aquat. Anim. Health*, **3**, 109–113.

AUBERTIN A.M. (1991). Family Iridoviridae. *In: Classification and Nomenclature of Viruses*, Francki R.J., Fauque C.M., Knudson D.L. & Brown F., eds. *Arch. Virol. (Suppl. 2)*. Springer, New York, USA and Vienna, Austria, 132–136.

BOOTLAND L.M. & LEONG J.A. (1992). Staphylococcal coagglutination, a rapid method of identifying infectious hematopoietic necrosis virus. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 6–13.

BOWSER P.R. & PLUMB J.A. (1980). Fish cell lines: establishment of a line from ovaries of channel catfish. *In Vitro*, **16**, 365–368.

DOBOS P. (1991). Family Birnaviridae. *In: Classification and Nomenclature of Viruses*, Francki R.J., Fauque C.M., Knudson D.L. & Brown F., eds. *Arch. Virol. (Suppl. 2)*. Springer, New York, USA and Vienna, Austria, 200–202.

EAGLE H. (1959). Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science*, **130**, 432.

FIJAN N., PETRINEC Z., SULIMANOVIC D. & ZWILLENBERG L.O. (1971). Isolation of the causative agent from the acute form on infectious dropsy of carp. *Vet. Arch. Zagreb*, **41**, 125–138.

FIJAN N., SULIMANOVIC D., BEARZOTTI M., MUZINIC D., ZWILLENBERG L.O., CHILMONCZYK S., VAUTHEROT J.F. & DE KINKELIN P. (1983). Some properties of the *Epitheliomaculosis cyprinini* (EPC) cell line from carp (*Cyprinus carpio*). *Ann. Virol. Institut Pasteur*, **134E**, 207–220.

HEDRICK R.P., McDOWELL T.S., AHNE W., TORHY C. & DE KINKELIN P. (1992). Properties of three iridovirus-like agents associated with systemic infections of fish. *Dis. Aquat. Org.*, **13**, 203–209.

HILL B.J., WILLIAMS R.F., FINLAY J. (1981). Preparation of antisera against fish virus disease agents. *Dev. Biol. Stand.*, **49**, 209–218.

HSU Y.L., MARK ENGELKING H. & LEONG J. (1986). Occurrence of different types of infectious hematopoietic necrosis virus in fish. *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 1353–1361.

HYATT A.D., EATON B.T., HENGSTBERGER S. & RUSSEL G. (1991). Epizootic hematopoietic necrosis virus: detection by ELISA, immuno-histochemistry and electron microscopy. *J. Fish Dis.*, **14**, 605–618.

JENSEN M.H. (1965). Research on the virus of Egtved disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **126**, 422–426.

LANGDON J.S., HUMPHREY J.D., WILLIAMS L.M., HYATT A.D., WESTBURY H.A. (1986). First virus isolation from Australian fish: an iridovirus-like pathogen from redfin perch, *Perca fluviatilis* L. *J. Fish Dis.*, **9**, 263–268.

LANNAN C.N., WINTON J.R., FRYER J.L. (1984). New cell lines. Fish cells: Establishment and characterization of nine cell lines from salmonids. *In Vitro*, **20**, 671–676.

LORENZEN E., CARSTENSEN B. & OLESEN, N.J. (1999). Inter-laboratory comparison of cell lines for susceptibility to three viruses: VHSV, IHNV and IPNV. *Dis. Aquat. Org.*, **37**, 81–88

LORENZEN N., OLESEN N.J. & VESTERGAARD-JORGENSEN P.E. (1988). Production and characterization of monoclonal antibodies to four Egtved virus structural proteins. *Dis. Aquat. Org.*, **4**, 35–42.

MOURTON C., ROMESTAND., DE KINKELIN P., JEFFROY J., LEGOUVELLO R. & PAU B. (1992). A highly sensitive immunoassay for the direct diagnosis of viral haemorrhagic septicaemia, using anti-nucleocapsid monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 2338–2345.

MUNDAY B.L., KWANG J. & MOODY N. (2002) Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *J. Fish Dis.*, **25**, 127–142.

NAKANE P.K. & KAWAOI A. (1974). Peroxidase-labeled antibody, a new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.*, **22**, 1084–1091.

OLESEN N.J., LORENZEN E. & LAPATRA S. (1999). Production of neutralizing antisera against viral haemorrhagic septicaemia (VHS) virus by intravenous infection of rabbits. *J. Aquat. Anim. Health*, **11**, 10–16.

OLESEN N.J. & VESTERGAARD-JORGENSEN P.E. (1992). Comparative susceptibility of three fish cell lines to Egtved virus, the virus of viral haemorrhagic septicaemia. *Dis. Aquat. Org.*, **12**, 235–237.

PANZARIN V., PATARNELLO P., MORI A., RAMPAZZO E., CAPPELLOZZA E., BOVO G. & CATTOLI G., (2010). Development and validation of a real-time TaqMan PCR assay for the detection of betanodavirus in clinical specimens. *Arch. Virol.*, **155**, 1193–1203.

PAUL J. (1976). Media for culturing cells and tissues. *In: Cell and Tissue Culture*, Paul J., ed. Churchill Livingstone, Edinburgh and London, UK, and New York, USA, 91–123.

RISTOW S.S. & ARNZEN J.M. (1989). Development of monoclonal antibodies that recognize a type 2 specific and a common epitope on the nucleoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus. *J. Aquat. Anim. Health*, **1**, 119–125.

ROIZMAN B. (1991). Family Herpesviridae. *In: Classification and Nomenclature of Viruses*, Francki R.J., Fauque C.M., Knudson D.L. & Brown F., eds. *Arch. Virol.* (Suppl. 2). Springer, New York, USA and Vienna, Austria, 103–110.

STOKER M. & MCPHERSON I. (1961). Studies on transformation of hamster cells by polyoma virus *in vitro*. *Virology*, **14**, 359–370.

WALKER P. & SUBASINGHE R.P. (2000). DNA-based Molecular Diagnostic Techniques. Research needs for standardization and validation of the detection of aquatic animal pathogens and diseases. *FAO Fisheries Technical Paper*, n°395, 93 pp.

WOLF K. (1988). *Fish Viruses and Viral Diseases*. Cornell University Press, Ithaca, New York, USA, 476 pp.

WOLF K. & QUIMBY M.C. (1962). Established eurythermic line of fish cell *in vitro*. *Science*, **135**, 1065–1066.

WOLF K. & QUIMBY M.C. (1973). Fish viruses: Buffers and methods for plaquing eight agents under normal atmosphere. *Appl. Microbiol.*, **25**, 659–664.

*
* *