

Evaluación de la respuesta clínico-patológica e inmune humoral en crías de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) infectadas experimentalmente con el virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV)

Evaluation of the clinical-pathological and humoral immune response in rainbow trout fry (*Oncorhynchus mykiss*) experimentally infected with Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV)

LF Vega^a, R Montes de Oca^a, B Valladares^a, S Martínez-Castañeda^a, U Alonso^a, R Enríquez^b, C Ortega^{a*}

^aCentro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, México.

^bLaboratorio de Biotecnología Acuática, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Chile.

SUMMARY

The aim of this study was to assess the relationship between the clinical-pathologic process in rainbow trout fry (*Oncorhynchus mykiss*) infected with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and the immunoglobulin M (IgM) levels in blood serum. Parameters were evaluated up to 45 days post infection (dpi) in fish intraperitoneally inoculated (IP) with 1×10^4 TCDI of IPNV, with *minimal essential medium* (MEM) and in the control group. Infected fish showed classical signs of infectious pancreatic necrosis (IPN) disease since day 19 pi, reaching 70% of accumulated mortality, and the survivor fish showed emaciation and IgM blood serum levels which progressively increased up to its maximum peak at day 31 pi; the most significant histopathological changes were the increase in melanomacrophage centers in the kidney, pancreatic necrosis and catarrhal enteritis. Viral isolation was possible only in the infected fish starting at day 3 pi up to day 45 ($P > 0.5$). The results suggest that even though the fish infected with IPNV can develop a humoral immune response characterized by the increase in IgM levels, this is insufficient to develop protection because while IgM levels are increasing, so does the viral title accompanied by clinical signs and histopathological injuries that are typical of the disease.

Palabras clave: IPNV, IgM, virus, respuesta inmune.

Key words: IPNV, IgM, virus, immune response.

INTRODUCCIÓN

El virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV), virus prototipo de la familia *Birnaviridae*, ocasiona una enfermedad sistémica aguda altamente contagiosa, usualmente letal para salmónidos jóvenes menores a 1.500 grados/día.

Los animales que sobreviven a brotes de enfermedad o que se infectan de forma subclínica se convierten en portadores, perpetuando el riesgo de infección (Wolf 1988, Rodríguez y col 2001). En México, la presencia de IPNV fue confirmada en crías de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) importadas como ovas ojo desde Norteamérica, creando una situación de emergencia para la producción de trucha en el país (Ortega y col 2002).

El cuadro clínico patológico típico de la enfermedad se presenta en crías de primera alimentación, caracterizado por mortalidad súbita y elevada, natación lenta y errática, hiperpigmentación cutánea, severa distensión abdominal, presencia de pseudofecas, exoftalmia y branquias pálidas

(McKnight y Roberts 1976, Wolf 1998). A la necropsia, la cavidad celómica suele presentar ascitis, páncreas y grasa abdominal presentan petequias multifocales, y en general los órganos internos muestran coloración pálida (Roberts y Pearson 2005, Smail y col 2006).

El desarrollo de una respuesta inmune específica contra IPNV a través de la producción de anticuerpos neutralizantes específicos de tipo IgM contra las proteínas virales VP2 y VP3 ha sido demostrada en peces inmunizados con virus inactivo y durante la infección con virus activo (Jarp y col 1996). Imajoh y col (2005) observaron nivel máximo de anticuerpos neutralizantes a 21 dpi, en aparente asociación con la disminución del título viral; sin embargo, un título alto de anticuerpos no siempre garantiza disminución de la carga viral, y en peces que actúan como portadores se ha observado que el virus continúa replicándose ante la incapacidad de los anticuerpos para controlar la infección (Yamamoto 1975). Esta situación aparentemente está influida por factores como la edad de los peces, temperatura, forma de presentación y el tipo de antígeno (Ogut 2004, Park y Reno 2005, Ortega y Enríquez 2007). No obstante, poco se conoce sobre la relación existente entre la manifestación clínico-patológica y el nivel de respuesta inmunitaria ocasionada por la infección. Este trabajo tiene por objetivo determinar el nivel de anticuerpos

específicos (IgM) y describir el cuadro clínico y lesiones histopatológicas desarrolladas por crías de trucha arco iris sometidas a una infección experimental.

MATERIALES Y MÉTODOS

Virus. Para el estudio se utilizó el virus obtenido en México el año 2000, tipificado como VR-299 (Ortega y col 2002); el virus fue replicado a 15 °C en botella de 25 cm³ conteniendo células CHSE-214 (*Chinook salmon embryo*) propagadas en *minimal essential Medium* (MEM) suplementado con 2% de suero fetal bovino (SFB), adicionado con 10.000 UI/mL de penicilina G sódica y 100 µL de sulfato de estreptomicina por mL (Gibco®, USA). Después de expresar efecto citopático (CPE), la botella se congeló y descongeló en dos ocasiones, el contenido se cosechó y centrifugó a 559 x g durante 10 min a 4 °C. El título viral se determinó por el método de Reed y Muench (1938), y finalmente se calculó la dosis infectiva en cultivo de tejido a un título de 1x10⁴ TCID₅₀/mL.

Peces. Crías de trucha arco iris de 500 unidades térmicas acumuladas (UTA), 4,5 cm de longitud y 1,5 g de peso obtenidas de una piscicultura libre de IPNV fueron mantenidas en adaptación en estanques de fibra de vidrio de 200 L de agua en recirculación con los siguientes parámetros fisicoquímicos: temperatura 17 °C, dureza 200 mg/L, alcalinidad 120 mg/L, oxígeno 8,0 ppm, amonio 0,1 ppm, nitratos 0,01 ppm y pH 7,5. Previo al experimento, se realizó un estudio sanitario para descartar que los peces fuesen portadores de agentes infecciosos, particularmente confirmar su condición sanitaria de libres de IPNV (OIE 2005).

Grupos experimentales. Los peces fueron distribuidos en tres grupos de 300 individuos cada uno y luego de ser anestesiados con 100 mg/L de *p*-aminobenzoate ([BZ-20] Veterquímica®, Santiago de Chile), el grupo I (GI) fue inoculado por vía intraperitoneal (IP) con 0,2 mL de solución viral a concentración de 1x10⁴ TCID₅₀/mL. El grupo II (GII) fue únicamente inoculado con MEM con 2% de SFB; mientras que el grupo III (GIII) no fue inoculado. Los peces fueron sometidos a las mismas condiciones de manejo, mantenidos en constante aireación y alimentados con dieta comercial en proporción de 1% de biomasa (Pedregal® Toluca, México); los signos clínicos y mortalidad se registraron diariamente; el agua de los estanques sufrió una tasa de recambio de 25% por semana.

Recuperación de muestras. A los 0, 3, 5, 7, 10, 15, 31 y 45 dpi quince peces de cada grupo fueron sacrificados por sobredosis de anestesia con 100 mg/L de *p*-aminobenzoate (Veterquímica, Santiago de Chile). Luego de su decapitación, la sangre fue colectada en viales de 0,5 mL y centrifugada a 358 x g a 4 °C durante 30 min; el suero obtenido se congeló a -70 °C hasta su uso. Para el reaislamiento

viral, aproximadamente 1 mL de pool de tejido renal, esplénico y ciegos pilóricos se depositó en tubo Falcon, conteniendo 9 mL de MEM con 2% de SFB (proporción 1:9 peso/volumen). La muestra se maceró y centrifugó a 559xg por 15 min a 10 °C y el sobrenadante obtenido fue conservado a 4 °C hasta su uso.

Aislamiento e identificación de IPNV. Células CHSE-214 en MEM con 10% de SFB fueron sembradas en placas de poliestireno de 24 pocillos (NunClon®) y al tener un 90% de confluencia se inocularon con 100 µL del sobrenadante diluido 1:10 y 1:100. Después de permitir la adsorción por una hora a 15 °C, las células recibieron un mL de MEM con 2% de SFB y se incubaron a 15 °C durante 7 días; las células que manifestaron efecto citopático (CPE) fueron sometidas a inmunofluorescencia indirecta (IFAT) específica para IPNV mediante el Kit IPNV-FluoroTest Indirecto (Bios Chile, Ingeniería Genética S.A. Chile). Para el análisis histopatológico, peces decapitados se colocaron en formol al 10% tamponado a pH 7,0 y posteriormente se procesaron para tinción de hematoxilina y eosina (H-E). Para evaluar las lesiones en riñón, hígado, intestino y páncreas se utilizó la escala: 0 = ausencia de lesión, 1 = lesión leve, 2 = lesión moderada y 3 = lesión severa.

Detección de IgM. Placas de ELISA fondo plano de 96 pocillos (NunClon®) fueron cubiertas con 100 µL de una solución viral con 1X10⁴ UPF en solución amortiguadora de carbonato y bicarbonato de sodio pH 9,6. La placa se incubó durante 12 h a 4 °C y se lavó con solución amortiguadora Trisma base, cloruro de sodio y Tween 20 pH 7,3; posteriormente, se bloquearon los sitios de unión inespecíficos mediante incubación en una solución de albúmina sérica bovina (Sigma) al 1% (p/v) por 2 h a 22 °C; la placa se lavó en tres ocasiones y finalmente se adicionaron 100 µL de diluciones del suero y se incubó por 12 h a 4 °C. Se retiró el excedente y la placa se lavó cinco veces antes de agregar en cada pozo 100 µL de IgM antisalmón elaborada en ratón (Donada por la Dra. Alexandra Adams del Institute of Aquaculture, University of Stirling, Escocia), se incubó por 60 min a 22 °C, después de lo cual el excedente se retiró y nuevamente la placa fue lavada para finalmente adicionar el anticuerpo secundario IgG antirratón marcado con peroxidasa a una dilución de 1:10.000, incubándose nuevamente durante 60 min a 22 °C. Después de cinco lavados, a cada pocillo se agregaron 100µL del cromógeno en una solución amortiguadora Trizma base (Sigma-Aldrich; México), cloruro de Sodio (J.T. Baker, Estado de México, México), timerosal (Merck, Naucalpan, Estado de México, México), tween 20 (Merck, Naucalpan, Estado de México, México), albúmina sérica bovina al 1%, pH de 7,3, y se incubó por 10 min a 22 °C. La reacción fue detenida por adición de solución de ácido sulfhídrico (Merck, Naucalpan, Estado de México, México) 2M y se efectuó la lectura en lector de ELISA modelo 680 (Bio-Rad Laboratorios, California, USA) a 450 nm.

Análisis de datos. Los valores de datos correspondientes a los signos clínicos, mortalidad, lesiones histopatológicas y aislamiento viral fueron analizados por medio de frecuencias presentadas en tablas y gráficas. El nivel de IgM (DO) se evaluó a través de análisis de varianza y comparación de medias utilizando el software estadístico *GraphPad Prism 5*.

RESULTADOS

SIGNOS CLÍNICOS

La signología clínica típicamente asociada a la infección por IPNV únicamente estuvo presente en peces del grupo GI (figuras 1a-d), en los que el oscurecimiento de piel se manifestó inicialmente en el 25% de la población a los 2 dpi, disminuyendo paulatinamente hasta los 9 días; sin embargo, el oscurecimiento afectó al 100% entre 20 a

27 dpi, sólo observándose en 5% a 32 dpi. Por su parte, en el GII el oscurecimiento sólo se manifestó en 5% de los peces entre los días 1 a 5; peces de GIII no manifestaron cambio de color. El abultamiento abdominal en peces infectados (GI) se inició a 5 dpi en el 10% de la población y luego de alcanzar un ligero incremento a los 6 dpi se mantuvo en 5% hasta los 20 dpi en que notablemente se incrementó hasta alcanzar el 50% entre 25 y 30 dpi. La presencia de pseudofecas se detectó en los peces infectados a 6 dpi en el 10% de la población, con gradual incremento hasta alcanzar un pico máximo de 50% entre los 25 a 29 dpi; por su parte, la descoordinación comenzó a los 19 dpi en el 5% de la población, con punto máximo de 50% a 25 dpi, siendo únicamente evidente en el 3% de la población a 32 dpi.

En los primeros dos dpi en los tres grupos de peces se observó una mortalidad baja que no presentó diferencias entre grupos ($P > 0,05$). Sin embargo, los peces infectados

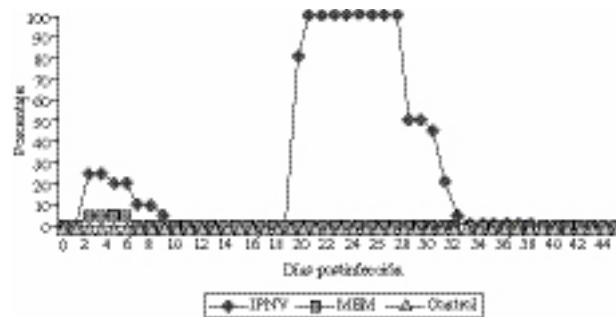


Figura 1a. Porcentaje de crías de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) que mostró cambio de coloración durante la infección con IPNV.

Percentage of rainbow trout fry (*Oncorhynchus mykiss*) showing colour change when infected with IPNV.

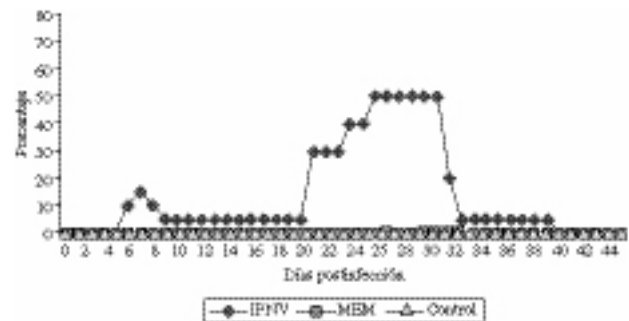


Figura 1b. Porcentaje de crías de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) con manifestación de abultamiento abdominal durante la infección con IPNV.

Percentage of rainbow trout fry (*Oncorhynchus mykiss*) showing abdominal bulging when infected with IPNV.

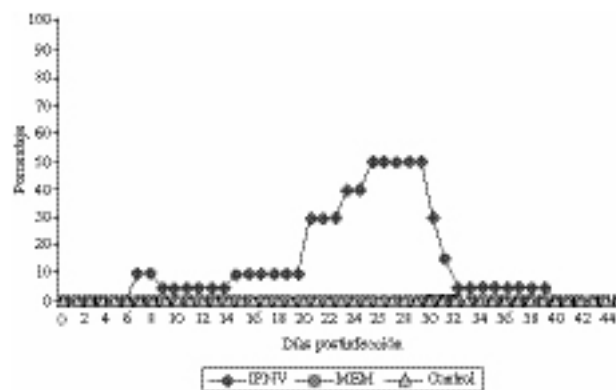


Figura 1c. Porcentaje de crías de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) con presencia de falsas heces durante la infección con IPNV.

Percentage of rainbow trout fry (*Oncorhynchus mykiss*) showing pseudofaeces when infected with IPNV.

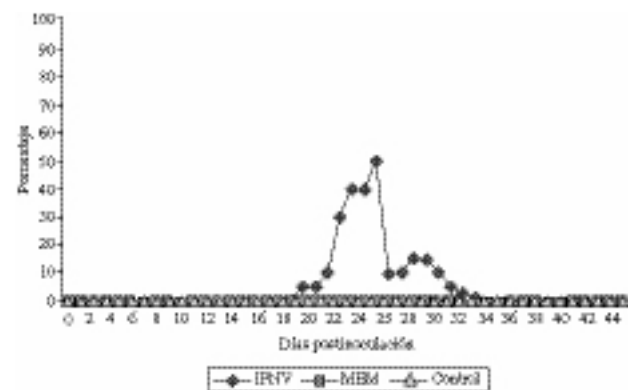


Figura 1d. Porcentaje de crías de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) que mostraron incoordinación durante la infección con IPNV.

Percentage of rainbow trout fry (*Oncorhynchus mykiss*) showing incoordination when infected with IPNV.

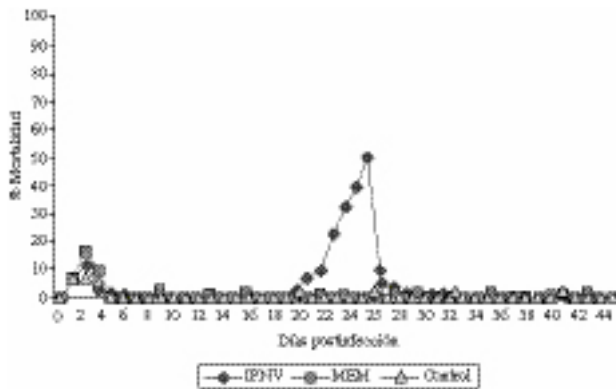


Figura 2. Mortalidad de crías de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) infectadas experimentalmente con IPNV.

Mortality of rainbow trout fry (*Oncorhynchus mykiss*) when infected with IPNV.

con IPNV presentaron una mortalidad acumulada de 70% con un pico máximo de 51,02% a los 25 dpi, mientras que en GII la mortalidad fue de 20% y de 13,33% en peces del grupo control ($P < 0,01$) (figura 2).

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE IPNV

IPNV no fue identificado en muestras obtenidas de peces de los grupos GII y GIII; en cambio, en peces infectados (GI) el aislamiento fue posible en todos los tiempos de muestreo, a excepción de muestras correspondientes a 0 dpi (datos no mostrados). Pese a que el título viral no fue calculado, el virus se multiplicó en los peces inoculados; las muestras obtenidas a 3 dpi expresaron CPE en células a 7 dpi; por su parte, las muestras correspondientes a 5 y 7 dpi manifestaron CPE 5 días después de su inoculación en línea celular. La manifestación fue más rápida en las muestras de peces obtenidas a los 10 dpi, donde el CPE se presentó 3 días después de su inoculación, mientras que en células inoculadas con las muestras obtenidas a 15 y 31 dpi el CPE ocurrió a 2 días postinoculación. Por su parte, las muestras obtenidas a los 45 dpi produjeron CPE hasta el día 6 postinoculación.

HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS

Durante el periodo experimental los órganos internos de peces de los grupos GII y GIII no presentaron cambios patológicos, situación similar a muestras correspondientes al día 0 en peces de GI; sin embargo, a partir de 3 dpi el número de centros de melanomacrófagos en riñón de GI manifestó un incremento gradual en muestreos posteriores (figura 3a), mientras que la principal lesión en hígado fue necrosis multifocal leve a moderada. El intestino anterior y ciegos pilóricos presentaron severa infiltración de células mononucleares con engrosamiento de vellosidades y enteritis catarral (figura 3b), de mayor severidad a partir del día 25 pi. En páncreas se observó

ligera infiltración de células mononucleares y alrededor de los 15 dpi se presentó necrosis de páncreas exocrino, con remanentes de estructura de sostén, tejido adiposo y endocrino (figuras 3c y 3d).

NIVEL DE INMUNOGLOBULINA M (IgM)

Los peces del grupo GI presentaron un promedio de 0,132 densidad óptica (DO) de IgM al día 3 pi, nivel que se incrementó a 0,255 DO a los 5 dpi y disminuyó a 0,176 a los 7 dpi; sin embargo, a partir de este tiempo el nivel se incrementó en forma gradual, alcanzando un punto máximo de 0,573 DO a 31 dpi con tendencia descendente posterior. Por su parte, los grupos GII y GIII no mostraron presencia de IgM en ningún tiempo de la fase experimental (figura 4), indicando desarrollo de una respuesta específica en los peces infectados.

DISCUSIÓN

En peces la coloración oscura de la piel es inducida por hormonas estimuladoras de melanóforos y generalmente se considera un signo de estado de salud deficiente por acompañarse de baja tasa de crecimiento y mortalidad, sumado al incremento de cortisol en el suero sanguíneo como indicador de estrés (Ruane y Komen 2003). En el presente estudio, el oscurecimiento descrito previamente en peces infectados por IPNV (McKnight y Roberts 1976) estuvo únicamente presente en los grupos de peces inoculados, siendo la primera manifestación clínica de IPN en peces de GI, en los que el estrés acumulado por la infección indujo hasta un 100% de manifestación en el periodo que también mostró mayor mortalidad; mientras que en peces de GII el proceso únicamente se manifestó durante la primera semana postinoculación con MEM, relacionado al estrés provocado por el manejo e inoculación (Swanson y col 1982), a diferencia del grupo GIII que únicamente fue sometido a anestesia por inmersión.

El abultamiento abdominal, una característica común en casos clínicos de IPN que es atribuida a necrosis del páncreas exocrino, intestino anterior e hígado, dilatación de estómago y ascitis (Roberts y Pearson 2005, Smail y col 2006), sólo se manifestó en los peces infectados, en mayor porcentaje a partir de los 20 dpi, coincidiendo con la máxima manifestación de otros signos clínicos de la enfermedad y mayor mortalidad; no obstante, al inicio de la infección el abultamiento también se presentó en un bajo porcentaje de la población como supuesto signo agudo de la enfermedad (Roberts y Pearson 2005). Sin embargo, esta última condición también podría encontrar relación con lo referido por Swanson y col (1982), quienes observaron que la dilatación abdominal por el acumulo de fluido proteico también puede ocurrir en peces que únicamente han sido inoculados con MEM, lo cual podría estar influido por la preparación del medio utilizado. Tomando en cuenta que en el estudio los peces de GII no

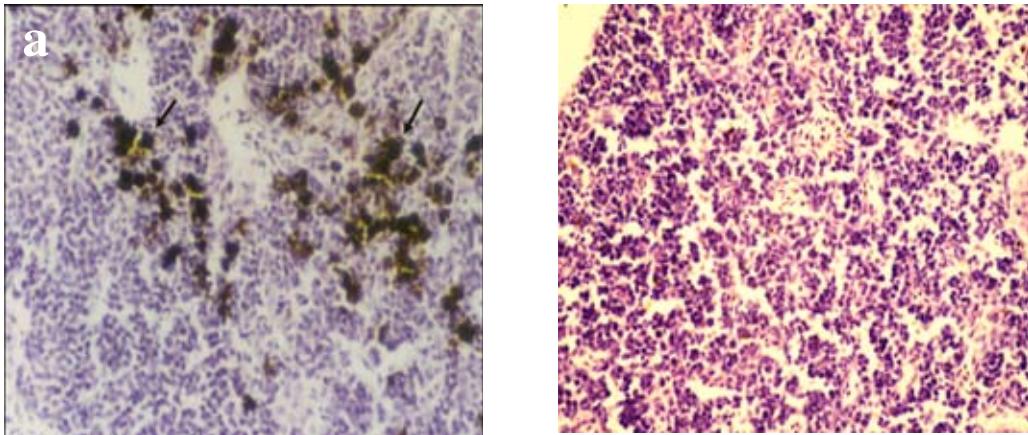


Figura 3a. Izquierda, riñón de cría de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) infectada experimentalmente con el virus de la necrosis pancreática infecciosa de 31 días postinfección. Se observa moderado aumento de células melanomacrofágicas (flecha). Derecha, control. 400X.

Left, kidney of rainbow trout fry (*Oncorhynchus mykiss*) infected with IPNV. At 31 dpi an important number of melanomacrophage cells are noticed (arrow). Right control. 400X.

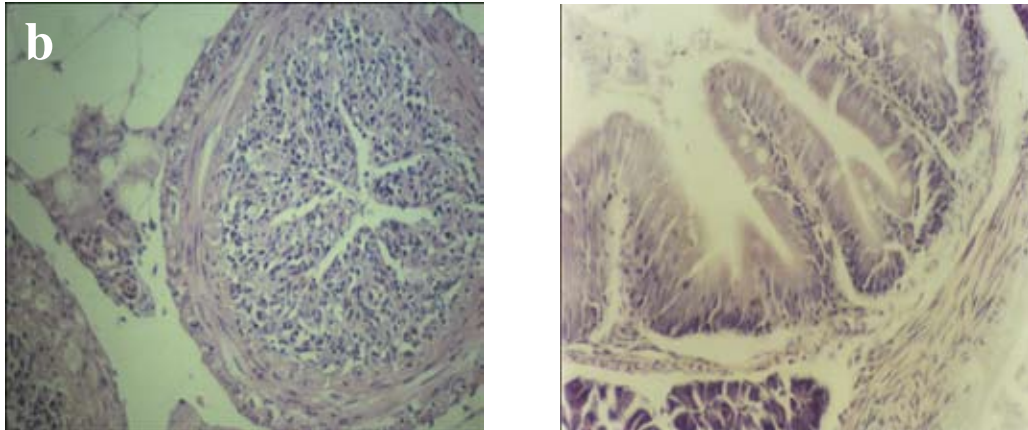


Figura 3b. Izquierda, ciego pilórico de cría de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) infectada experimentalmente con el virus de la necrosis pancreática infecciosa a 15 días postinfección. Se observa severa infiltración de células mononucleares y necrosis de tejido pancreático aledaño. Derecha, control. 400X.

Left, pyloric caecal of rainbow trout fry (*Oncorhynchus mykiss*) infected with IPNV. At 15 dpi a moderate caliciform cell hyperplasia is observed (arrow) with mononuclear cell infiltration (asterisk). Right, control. 400X.

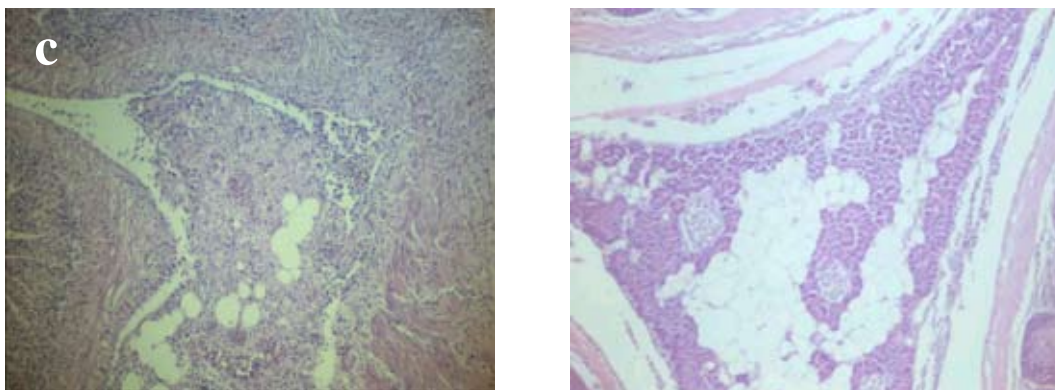


Figura 3c. Izquierda, páncreas de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) infectada experimentalmente con el virus de la necrosis pancreática infecciosa a 15 días postinfección. Se observa severa destrucción de células pancreáticas e infiltración de células mononucleares tanto en páncreas como en ciego pilórico aledaño. Derecha, control. 400X.

Left, pancreas of rainbow trout fry (*Oncorhynchus mykiss*) infected with IPNV. At 15 dpi an important destruction of pancreatic tissue is observed, besides mononuclear cells infiltration in pancreas and pyloric caecal is observed too. Right, control. 400X.

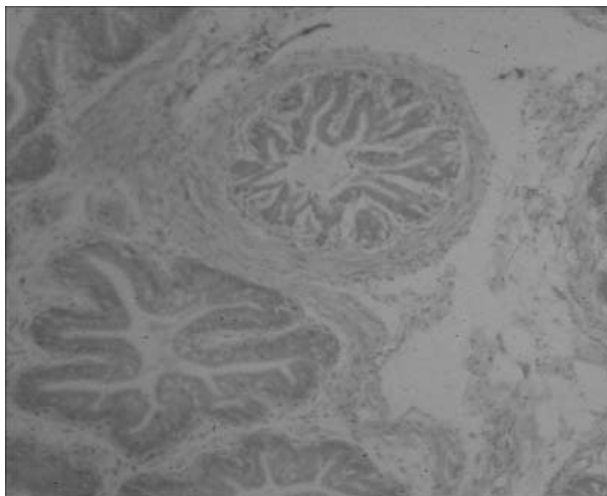


Figura 3d. Páncreas de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) infectada experimentalmente con el virus de la necrosis pancreática infecciosa a 15 días postinfección. Se observa severa necrosis del tejido pancreático y adiposo distribuido entre ciegos pilóricos.

Pancreas of rainbow trout fry (*Oncorhynchus mykiss*) infected with IPNV. At 45 dpi a severe pancreatic and adipose necrosis is observed between pyloric caeca.

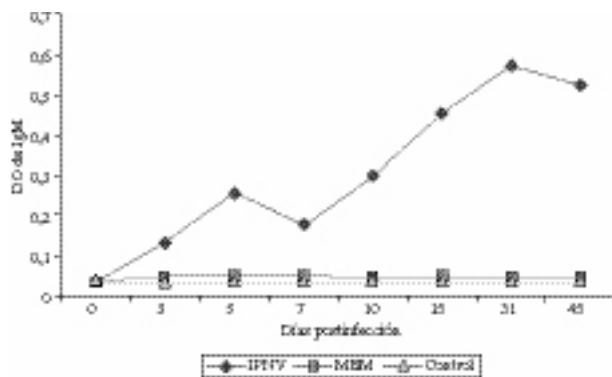


Figura 4. Nivel promedio de inmunoglobulina M (IgM) en crías de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) infectadas con IPNV.

IgM average level in rainbow trout fry (*Oncorhynchus mykiss*) when infected with IPNV.

manifestaron abultamiento abdominal, su ocurrencia en los peces infectados indicaría efecto viral.

La presencia de pseudofecas, únicamente evidente en el grupo GI, es atribuida directamente a la enteritis catarral aguda derivada de necrosis y desprendimiento del epitelio intestinal, provocados por la replicación de IPNV en células epiteliales (Roberts y Pearson 2005, Smail y col 2006). Al respecto, McKnight y Roberts (1976) mencionan que peces que sufren descamación de mucosa intestinal severa mueren más rápido que los que padecen un proceso patológico menos grave al que pueden sobrevivir durante períodos más largos; basado en lo anterior, la enteritis catarral podría ser la principal causa de muerte en los peces infectados. Por otra parte, la descoordinación

natatoria o natación errática, que es una manifestación tardía del cuadro clínico de IPN, asociada a daños del sistema nervioso central (Frantsi y Savan 1971) fue evidente justo antes de la muerte de los peces infectados.

Los signos clínicos descritos en este trabajo presentan relación con la mortalidad obtenida en los peces infectados; sin embargo, la mortalidad ante casos de infección natural y experimental con IPNV es muy variable, pudiendo ser desde una infección subclínica hasta cuadros de 90% de mortalidad (Wolf 1988, Ortega y Enríquez 2007). En el presente estudio, los signos clínicos propios de IPNV y su confirmación por aislamiento viral indican que 70% de la mortalidad observada en GI correspondió a efectos directos del virus inoculado; resultados similares han sido descritos por Frantsi y Savan (1971), en truchas de arroyo (*Salvelinus fontinalis*), y por Jorgensen y col (2003) en smolts de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) infectados con IPNV serotipo Sp (10^5 TCID₅₀), donde la mortalidad se inició a 7 dpi alcanzando un 75% a los 33 dpi. En el presente trabajo, usando un inóculo de 10^4 TCID₅₀, se obtuvo máxima mortalidad alrededor de los 25 dpi asociada a título alto de virus replicante, ya que células inoculadas con estas muestras mostraron CPE a 2 dpi; en este sentido, además de la dosis infectiva y las cepas utilizadas, las diferencias reportadas pueden estar asociadas a factores como el estado de inmunidad de los peces y condiciones ambientales (Ortega y Enríquez 2007).

Los melanomacrófagos son células pigmentarias presentes en tejido hematopoyético de bazo, riñón y áreas periportales del hígado que contienen inclusiones de melanina, hemosiderina y lipofuscina, capaces de ingerir agentes microbianos o desechos metabólicos (Press y Evensen 1999); su proliferación acompañada de restos de desechos celulares es evidente en peces infectados con IPNV (Swanson y col 1982), por lo que en el presente estudio su incremento progresivo en riñón de peces inoculados podría relacionarse a la infección viral (Lerner y Thomas 2002) y estrés prolongado. Asimismo, las lesiones pancreáticas características de la enfermedad se iniciaron a partir de los 3 dpi con moderada disociación de acinos pancreáticos; sin embargo, durante el periodo de mayor mortalidad también se observaron lesiones pancreáticas más graves y extensas, manifestando vacuolización y necrosis difusa de páncreas exocrino. Datos similares se han descrito previamente por Swanson y col (1982) en truchas de arroyo inoculadas o en brotes naturales de IPN en la misma especie.

IPNV pudo ser aislado e identificado únicamente de órganos de peces del grupo GI a partir de los 3 dpi, donde el CPE fue manifiesto a los 7 dpi en línea celular asociado a poca carga viral; en cambio, las muestras obtenidas de peces de entre 5 y 31 dpi presentaron multiplicación más rápida en la línea celular, siendo nuevamente más lenta en órganos de peces de 45 dpi, donde el CPE se manifestó a los 6 dpi. Estos resultados concuerdan con lo informado

por Swanson y col (1982) en trucha de arroyo, que entre 5 y 25 dpi presentaron mayor concentración viral en ciegos pilóricos y tejido renal. Considerando que el ciclo de replicación de IPNV se cumple en aproximadamente 20 h, es poco probable que el aislamiento realizado a los 3 dpi corresponda al virus inoculado, mientras que el CPE tardío obtenido a los 45 dpi podría deberse a una disminución del título viral en los órganos de los peces para entrar al estado de portador (Imajoh y col 2005).

IPNV o sus productos pueden inducir la producción de anticuerpos específicos de tipo IgM; sin embargo, el nivel de la respuesta es variable y su participación en el control de la infección también es incierta al ser procesos influidos por la temperatura del agua, forma de presentación del antígeno o tipo de vacuna (Ortega y Enríquez 2007). Imajoh y col (2005) reportan que después de la infección la presencia de anticuerpos específicos contra IPNV puede detectarse a los 6 dpi, mientras que en otros casos aparecen después de 12 semanas pi (Frost y Ness 1997). En el presente estudio únicamente los peces inoculados con IPNV desarrollaron una repuesta humoral específica, máxima a los 31 dpi; el resultado muestra relación con observaciones de Imajoh y col (2005) en truchas arco iris que generaron máximo nivel de anticuerpos neutralizantes a 21 dpi y descenso paulatino hasta 90 dpi. Sin embargo, en este estudio, el incremento de IgM se registró en forma más temprana a lo reportado por otros autores, lo cual podría estar asociado a activación de algunas células productoras de anticuerpos para inducir una pronta respuesta humoral (Frost y Ness 1997); en este sentido Lockhart y col (2004) evidenciaron que los peces más susceptibles a infección viral desarrollan una respuesta de defensa más rápida que los animales menos susceptibles. Asimismo, es poco probable que la respuesta se deba a previa estimulación para generar anticuerpos contra el virus, ya que previo al estudio los peces fueron analizados para descartarlos como portadores, y además la misma respuesta también habría sido manifiesta en los grupos GII y GIII.

Los resultados obtenidos indican que junto con la replicación de IPNV y la manifestación de signos clínicos propios de la infección, también se presentó un incremento del nivel de IgM como desarrollo de una respuesta inmune específica, aparentemente incapaz de ejercer un estado de protección. Al respecto, Ogut (2004) reportó coexistencia de alto título viral y de anticuerpos, como aparentemente ha ocurrido en el presente estudio; sin embargo, no se informó la respuesta clínico-patológica en los animales infectados; en este sentido, quedan por determinarse los mecanismos por los cuales el virus puede coexistir con los anticuerpos y con el sistema inmune en general para permitir o impedir el desarrollo del cuadro clínico asociado a la infección (Ortega y Enríquez 2007), o si bien esto último es una condición influida por las características del agente.

Considerando que la respuesta inmune inespecífica actúa como la primera barrera de protección contra la infección viral poco influida por la temperatura, los resultados encaminan también a proponer estudios para determinar la relación existente entre el nivel de anticuerpos y la expresión de moléculas de actividad antiviral inespecífica inducida por interferón tipo I (IFN-I) y con el desarrollo de la infección inducida por cepas de IPNV de características distintas.

RESUMEN

Se realizó un estudio para obtener información acerca de la relación existente entre el cuadro clínico-patológico desarrollado en crías de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) infectadas con el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) y el nivel de inmunoglobulina M (IgM) en suero sanguíneo. Los parámetros fueron determinados hasta 45 días postinfección (dpi) en peces inoculados por vía intraperitoneal (IP) con 1×10^4 TCDI de IPNV o únicamente inoculados con *Medio Mínimo Esencial* (MEM) y en un grupo control no inoculado. Los peces infectados presentaron los signos característicos de necrosis pancreática (IPN) a partir de 19 dpi, alcanzando una mortalidad acumulada de 70%, con evidente emaciación de animales sobrevivientes; asimismo, el nivel de IgM en suero sanguíneo se incrementó progresivamente hasta alcanzar su punto máximo a 31 dpi; los hallazgos histopatológicos más significativos fueron: incremento de centros de melanomacrófagos en riñón, necrosis pancreática y enteritis catarral. El aislamiento viral fue posible únicamente en peces infectados a partir del día 3 y hasta los 45 dpi ($P > 0,5$). Los resultados observados sugieren que aunque los animales infectados con IPNV pueden desarrollar una respuesta inmune humoral caracterizada por incremento de IgM, ésta es insuficiente para desarrollar protección, ya que al mismo tiempo que se incrementa el nivel de IgM, también aumenta el título viral, acompañado de signos clínicos y lesiones histopatológicas típicas de la enfermedad.

REFERENCIAS

- Frantsi C, M Salvan. 1971. Infectious pancreatic necrosis virus, temperature and age factors in mortality. *J Wildlife Dis* 7, 249-255.
- Frost P, A Ness. 1997. Vaccination of Atlantic salmon with recombinant VP2 of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), added to a multivalent vaccine, suppresses viral replication following IPNV challenge. *Fish Shellfish Immunol* 7, 609-619.
- Imajoh M, T Hirayama, S Oshima. 2005. Frequent occurrence of apoptosis is not associated with pathogenic infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) during persistent infection. *Fish Shellfish Immunol* 18, 163-177.
- Jarp J, T Taksdal, B Tørud. 1996. Infectious Pancreatic Necrosis in Atlantic salmon, *Salmo salar*, in relation to specific antibodies, smoltification, and infection with erythrocytic inclusion body syndrome (EIBS). *Dis Aquat Org* 27, 81-88.
- Jorgensen JB, LH Johansen, K Steiro, A Johansen. 2003. CpG DNA induces protective antiviral immune responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J Virol* 21, 11471-11479.
- Lerner AB, BF Thomas. 2002. Biochemistry of melanin formation. *Physiol Rev* 30, 91-93.
- Lockhart K, SK Gahlawat, D Soto-Mosquera, TJ Bowden, AE Ellis. 2004. IPNV carrier Atlantic salmon growers do not express Mx mRNA and poly I:C induced Mx response does not cure the carrier state. *Fish Shellfish Immunol* 17, 347-352.
- McKnight J, RJ Roberts. 1976. The pathology of Infectious pancreatic necrosis. I. The sequential histopathology of the naturally occurring condition. *Br Vet J* 132, 76-85.

- Ogut H. 2004. Effects of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Serum (RTS) on replication of Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV). *Turk J Vet Anim Sci* 29, 505-510.
- OIE, Oficina Internacional de Epizootias. 2005. Aquatic Animal Health Code (8th ed). Paris, France.
- Ortega C, R Montes de Oca, D Groman, C Yason, B Nicholson, S Blake. 2002. Case report: Viral Infectious Pancreatic Necrosis in Farmed rainbow trout from Mexico. *J Aquat Anim Health* 14, 305-310.
- Ortega C, R Enríquez R. 2007. Factores asociados a la infección celular por el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV). *Arch Med Vet* 39, 7-18.
- Park KC, PW Reno. 2005. Characteristics of inhibition of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) by normal rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* serum. *Dis Aquat Org* 63, 43-52.
- Press CM, Ø Evensen. 1999. The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish Shellfish Immunol* 9, 309-318.
- Reed LJ, H Muench. 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *J Hyg* 3, 493-497.
- Roberts RJ, MD Pearson. 2005. Infectious Pancreatic Necrosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J Fish Dis* 28, 383-389.
- Rodríguez S, M Alonso, S Pérez-Prieto. 2001. Detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) from leukocytes of carrier rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Pathol* 36, 13-46.
- Ruane nm, H Komen. 2003. Measuring cortisol in the water as an indicator of stress caused by increased loading density in common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture* 218, 685-693.
- Smail DA, N Bain, DW Bruno, JA King, F Thompson, DJ Pendrey, S Morrice, CO Cunningham. 2006. Infectious pancreatic necrosis virus in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts in the Shetland Isles, Scotland: virus identification, histopathology, immunohistochemistry and genetic comparison with Scottish mainland isolates. *J Fish Dis* 29, 31-41.
- Swanson RN, JC Carlisle, JH Gillespie. 1982. Pathogenesis of infectious pancreatic necrosis virus infection in brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill), following intraperitoneal injection. *J Fish Dis* 5, 449-460.
- Wolf K. 1988. Infectious Pancreatic Necrosis. In: *Fish Viruses and Fish Disease*. Cornell University Press, Ithaca, NY, USA, Pp 115-157.
- Yamamoto T. 1975. Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) carriers and antibody production in a population of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J Fish Dis* 5, 1343-1347.