



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS  
Y RECURSOS NATURALES

“CARACTERIZACIÓN PATOLÓGICA DE UNA ENFERMEDAD HEMORRÁGICA  
EN CARPA COMÚN (*Cyprinus carpio carpio*) E IDENTIFICACIÓN DEL  
AGENTE ETIOLÓGICO”.

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

PRESENTA:

LETICIA CAÑAS LÓPEZ

COMITÉ DE TUTORES:

Dr. César Ortega Santana (Tutor Académico)

Dr. Raúl C. Fajardo Muñoz (Tutor Adjunto)

Dr. Juan Carlos Vázquez Chagoyán (Tutor Adjunto)

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, Febrero 2023

## ÍNDICE

DEDICATORIAS.....	i
AGRADECIMIENTO.....	ii
ÍNDICE.....	iii
ÍNDICE DE CUADROS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Familia Rabdoviridae.....	3
2.1.1 Estructura y organización de los Rabdovirus.....	4
2.1.2 Taxonomía de los Rabdovirus.....	5
2.1.3 Ciclo de Replicación de los Rabdovirus.....	6
2.2 Rabdovirus de Peces.....	8
2.2.1 Rabdovirus de Peces miembros del género Novirhabdovirus...	9
2.2.1.1 Virus de la Septicemia Hemorrágica Viral (VHS).....	9
2.2.1.2 Hirame Novirhabdovirus (HIRRV).....	10
2.2.1.3 Virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV).....	10
2.2.1.4 Snakehead Norvirhabdovirus (SHRV).....	11
2.2.2 Rabdovirus de Peces miembros del género Perhabdovirus.....	11
2.2.2.1 Perch Rabdovirus (PRV).....	11
2.2.3 Rabdovirus de Peces miembros del género Sprivivirus.....	12
2.2.3.1 Virus de la Viremia Primaveral de la Carpa (SVCV).....	12
2.2.3.1.a Distribución de SVCV.....	13
2.2.3.1.b Caracterización del Genoma de SVCV.....	14
2.2.3.1.c Patología y Signología reportada en la enfermedad de la Viremia Primaveral de la Carpa (SVC).....	14
2.2.3.1.d Hallazgos Histopatológicos reportados en Carpa Común infectada con el SVCV .....	15
2.2.3.1.e Transmisión de SVCV.....	16
2.3 Respuesta inmune de la carpa frente a la infección de SVCV.....	16
2.4 Periodo de incubación de los Rabdovirus de peces.....	17
2.5 Parámetros de sensibilidad de SVCV.....	18
2.6 La Carpa ( <i>Cyprinus spp.</i> ).....	19
2.6.1 Carpa Común ( <i>Cyprinus carpio carpio</i> ).....	21
2.7 Antecedentes sanitarios en carpas de México.....	23
III. JUSTIFICACIÓN.....	25
IV. HIPÓTESIS.....	26
V. OBJETIVOS.....	26
5.1 Objetivo general .....	26
5.2 Objetivos específicos.....	26
VI. MATERIAL y MÉTODOS.....	27
6.1 Organismos Vivos.....	27

6.1.1 Obtención de muestras.....	27
6.1.2 Aislamiento Viral.....	28
6.1.3 Confirmación del aislamiento viral.....	28
6.2 Titulación viral .....	28
6.3 Microscopía electrónica.....	29
6.4 Extracción de RNA y obtención de cDNA.....	29
6.5 Reacción de PCR para detección de SVCV.....	29
6.6 Análisis de secuenciación genómica.....	30
6.7 Análisis Histopatológico.....	30
VII.RESULTADOS.....	31
7.1 Registro de signos clínicos.....	31
7.2 Descripción histológica de Tejidos.....	32
7.3 Aislamiento inicial de SVCV.....	35
7.4 Crecimiento viral en diferentes líneas celulares, tiempo de supervivencia y resistencia al medio ambiente.....	35
7.5 Titulación viral.....	37
7.6 Análisis de microscopia electrónica.....	38
7.7 Reacción de RT-PCR para detección de SVCV.....	38
7.8 Artículo publicado, Revista MVZ Córdoba.....	39
VIII. DISCUSIÓN.....	41
IX. CONCLUSIONES.....	45
X. RECOMENDACIONES.....	45
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
XII. ANEXOS.....	57
12.1 Secuencia del primer SVC R4 (SVC R4).....	57
12.2 Secuencia del primer SVC R2 (VPC R2).....	58
12.3 Secuencia del primer SVC F1 (VPC F1).....	59

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Rabdovirus de teleósteos reconocidos por el Comité Internacional sobre la Taxonomía de virus.....	8
Cuadro 2. Porcentaje de infección y mortalidad por afección de SVCV, según edad del pez.....	12
Cuadro 3. Especies acuáticas susceptibles a la infección por SVCV de forma natural (ciprínidos y no ciprínidos) e infectados experimentalmente.....	13
Cuadro 4. Secuencias completas de seis genomas de SVCV.....	14
Cuadro 5. Parámetros de sensibilidad de SVCV ante soluciones y activos.....	18
Cuadro 6. Principales especies de carpa ( <i>Cyprinus spp.</i> ), presentes actualmente en México.....	19
Cuadro 7. Situaciones que conllevan a la introducción de Ciprínidos a nuevos hábitats.....	22
Cuadro 8. Lesiones observadas en órganos internos de <i>Cyprinus carpio carpio</i> , (muestra en estudio) y descripción histopatológica.....	32

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Virión de Rabdovirus.....	3
Figura 2. Estructura de un Rabdovirus y organización del genoma.....	5
Figura 3. Esquema representativo de infección y replicación de un Rabdovirus.....	6
Figura 4. Anatomía de la Carpa común ( <i>Cyprinus carpio carpio</i> ).....	22
Figura 5. Lesiones macroscópicas en carpa común ( <i>Cyprinus carpio carpio</i> ).....	31
Figura 6. Placas de dos pocillos con células EPC, inoculadas con el aislado de SVCV obtenido en 2015.....	35
Figura 7. Placa de seis pocillos con células BF-2, CHSE-214 y RTG, inoculadas con el aislado de SVCV obtenido en 2015.....	36
Figura 8. Gráfica de resultados para el crecimiento viral registrado en las líneas celulares empleadas para el estudio de SVCV aislado de Carpa Común en 2015.....	36
Figura 9. Gráfica titulación viral en tres submuestras del aislado de SVCV conservado a tres diferentes temperaturas.....	37
Figura 10. Microfotografía electrónica en células EPC a 8 hpi.....	38

## RESUMEN

En octubre de 2015 ingresó al Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), una muestra compuesta por 15 peces de aproximadamente 250 grs de carpa común (*Cyprinus carpio carpio*), provenientes de la laguna de Tecocomulco, en el estado de Hidalgo. El motivo era un estudio de rutina, sin reporte previo de enfermedad ni mortalidad de alguna de las especies que habitan el cuerpo de agua, por parte de las instancias remitentes.

Durante la necropsia de los animales, se tomaron preparaciones húmedas de la piel, aletas y branquias para diagnosticar la presencia de parásitos, descartando hallazgos que fuesen letales para los peces, además se encontraron en poca cantidad. Al estudio sobre signos clínicos sobresalientes, destacó la presencia de áreas de necrosis superficial de piel con pérdida de escamas, exoftalmia, branquias pálidas, distensión abdominal, hemorragias diversas en aletas, mandíbula y diversas zonas del cuerpo. También, se detalló el aspecto, coloración y el contenido de los órganos internos, donde se observó ascitis sero-hemorrágica, formación severa de adherencias pleurales entre los órganos abdominales, además de esplenomegalia. Se continuó con la recolección de fragmentos de tejido de algunos órganos como bazo, hígado y riñón para el aislamiento de agentes bacterianos en medios convencionales, pero las improntas realizadas no evidenciaron presencia de bacterias.

Para aislamiento viral, aproximadamente un ml de fragmentos de bazo y riñón de los peces con hemorragias y adherencias fueron depositados en tubos Falcón de 15 ml conteniendo 9 ml de medio L-15 (Medium LEIBOVITZ'S Cat 11415-064, GIBCO BRL), las muestras fueron maceradas, centrifugadas y filtradas en membrana de 0.22 micras ( $\mu\text{m}$ ) para inoculación posterior en una monocapa de células EPC (Epitelioma papuloso de la carpa), con  $\geq 90\%$  de confluencia e incubados a 20°C.

Las muestras con efecto citopático positivo (CPE), sugestivo de infección viral fueron confirmadas mediante RT-PCR específico para virus de la viremia primaveral de la carpa. Ya que por los signos clínicos que presentaron los peces y los hallazgos nulos realizados frente a parásitos y bacterias, se trataba de una enfermedad no antes diagnosticada dentro del país. Y posteriormente confirmadas empleando los cebadores y recomendaciones que se mencionan en el manual de la OIE, esperando una amplificación de 714 pb. El producto de amplificación se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y fue sometido a una prueba semi-anidada diseñada para amplificar un producto de de 606 pb. Ambos productos obtenidos fueron purificados mediante el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA). Posteriormente fueron mandadas a Macrogen Korea (Seoul, Rep. of Korea), para su secuenciación. Las secuencias obtenidas se ingresaron a Blast NCBI y se obtuvo una similitud de 96-97%, respecto al gen de la proteína G del virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV). Para el análisis

por comparación con otras secuencias depositadas en el GenBank, se usó un fragmento de 426 pb de la muestra Carp-1. Generando un cladograma.

La placa de cultivo celular que mostro CPE después de ser inoculada con el virus aislado, fue muestra para buscar el agente infeccioso a través de microscopia electrónica. Confirmando la presencia viriones con típica forma de bala que distingue a la Familia *Rabdoviridae*.

Las lesiones halladas en distintos órganos internos, se describieron histológicamente para su comparación con las reportadas en estudios de la enfermedad de SVCV por diversos autores.

Palabras clave: Rabdovirus, *Cyprinus carpio carpio*, hemorragias.

## ABSTRACT

In October 2015, a group of 15 common carp fish (*Cyprinus carpio carpio*) as remitted from the Tecocomulco lagoon, Hidalgo State, Mx. To the Center for research and advanced Studies in animal Health (Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, CIESA). A routine study was conducted. Samples arrived with no report of disease, or mortality from any of the inhabitant species of the lagoon.

During necropsy, humid preparations were taken from skin, fins and gills, and search for parasites, however parasitosis was discarded since parasite counts were very low and potential lethal findings were observed. Main clinical signs found were áreas of necrosis on skin and scales loss, exophthalmia, pale gills, abdominal distension, diverse hemorrhages in fins, jaws and other parts of the body. Internally, sero-hemorrhagic ascites, Bacteriological analysis was conducted in tissue fragments of liver, kidney and spleen with negative results.

Spleen and kidney from fish showing hemorrhages and internal organs adhesions were studied for virus presence. Tissue fragments were place in 9ml L-15 medium (Leibovitz's médium), and macerated, then samples were centrifuged and supernatant filtered through 0.22  $\mu$ m filters, and filtered solution was used to inoculate 90% confluence CPE (Carp Papulosus Epitheliome) monolayer cell culture and incubated at 20° C.

Samples showing positive cytopathic effect (CPE), were analyzed for the presence of the virus from spring viral carp viremia (SVCV) through reverse transcription polymerase chain reaction rtPCR. Then the test was repeated using the rtPCR primers recommended by the EIO diagnostic manual, where a 714 pb band is expected and confirmed in a 1.5% agarose gel electrophoresis. PCR product was further analyzed though a semi-nester PCR designed to aplify a 606 bp DNA band. PCR products were purified using the Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega, USA). Then, cleaned amplicons were sent for sequencing by Macrogen Korea (Seoul, Rep of Korea). Sequences reported by Macrogen were blasted (Blast BCBI), finding a 96-97% identity with respect to the virus of the SVCV G protein. A cladogram was built using Genbank previously reported sequences and a 426 bp (Carp-1) sequence found in the present report.

Histopathologic findings from the analysis of tissue samples collected from different fish internal organs showing lesions, showed similarities to previously SVCV lesions reported by several authors.

In conclusión, considering clinical lesions found in fish histopathological findings, CPE observed in cell culture, shape of virus observed by Electron microscopy from CPE samples and that DNA sequencing obtained from rtPCR from CPE samples matches the sequence of viral G protein gene of SVCV, the present study demonstrates that infection found in the fish remitted from the Tecocomulco lagoon,

Hidalgo State, Mx. to the Center for Research and advanced Studies an Animal Health in October 2015, was caused by SVCV virus.

## 1. INTRODUCCION

La carpa es un pez de la familia *Cyprinidae*, que por su resistencia y capacidad de adaptación a distintos ambientes son el grupo de peces más producidos en el mundo; la lista de los 10 principales países productores está conformado por naciones asiáticas, destacando China, India y Bangladesh (DOF, 2018; Miao y Wang 2020).

Las carpas se consideran especies muy resistentes a diversas condiciones adversas y a las enfermedades (Arredondo y Lozano, 2003). Sin embargo, al igual que cualquier especie animal, pueden ser afectadas por enfermedades muy características, causadas por bacterias y virus (Fernando, 1991, Jeney y Jeney, 1995, Arredondo y Lozano, 2003).

Entre las enfermedades causadas por virus en carpas, destaca la Viremia Primavera de la Carpa o SVCV, por sus siglas en inglés de Spring Viral Carp Virus, provocada por un Rabdovirus. Es una enfermedad incluida en lista de enfermedades de declaración obligatoria para la Oficina Internacional de Salud Animal (OIE), que se caracteriza por causar alta mortalidad en peces de cultivo y silvestres (Fijan, *et al.*, 1971, Kiuchi and Roy 1984, Anhe, 1978). Sin embargo, existen distintos Rabdovirus que tienen alta relación con SVCV, por lo que no todos causan la viremia primavera de la carpa. Debido a esto, es necesario hacer una descripción y caracterización de todo aquel aislamiento viral obtenido de carpas para poder confirmar o descartar esta enfermedad de gran importancia para la producción de ciprínidos (OIE, 2015c).

En la literatura se han descrito distintos protocolos de clasificación para la Familia *Rabdoviridae*, que incluye a virus que se relacionan morfológica y genéticamente (Fijan, *et al.*, 1971, Lu *et al.*, 1991, Xiao *et al.*, 2014), y que en general, causan enfermedades severas en plantas y animales, incluyendo al ser humano. Actualmente, la genotipificación de los Rabdovirus incluye a 40 géneros: Almendravirus, Alphanemrhavirus, Alphapaprhavirus, Alpharicinhavirus, Arurhavirus, Barhavirus, Caligrhavirus, Curiovirus, Ephemerovirus, Hapavirus, Ledantavirus, Lostrhavirus, Mousrhavirus, Merhavirus, Lissavirus, Perhadbovirus, Ohlshavirus, Sawgrhavirus, Sigmavirus, Sprivivirus, Sripuvirus, Sunrhavirus, Tibrovirus, Tupavirus, Vesiculovirus, Zarhavirus, Alphanucleorhabdovirus, Betanucleorhabdovirus, Cytorhabdovirus, Dichorhabdovirus, Gammanucleorhabdovirus, Varicosavirus y Norvirhabdovirus. El virus de la Viremia Primavera de la Carpa está incluido dentro del género Sprivivirus (<http://www.ictvonline.org/index.asp>).

En México, la carpa se introdujo en 1889, y desde entonces se han realizado muchas importaciones; su cultivo se realiza principalmente bajo un sistema de producción extensivo que dio lugar a un importante desarrollo de la acuicultura en el país (FAO, 2002; CONAPESCA, 2017), brindando nutrición principalmente a poblaciones de zonas desprotegidas (Frerichs, 1989). Sin embargo, en el país

otras especies de peces y camarones han recobrado mayor interés por considerarse productos de mayor calidad nutricional (Ortega y Valladares, 2015).

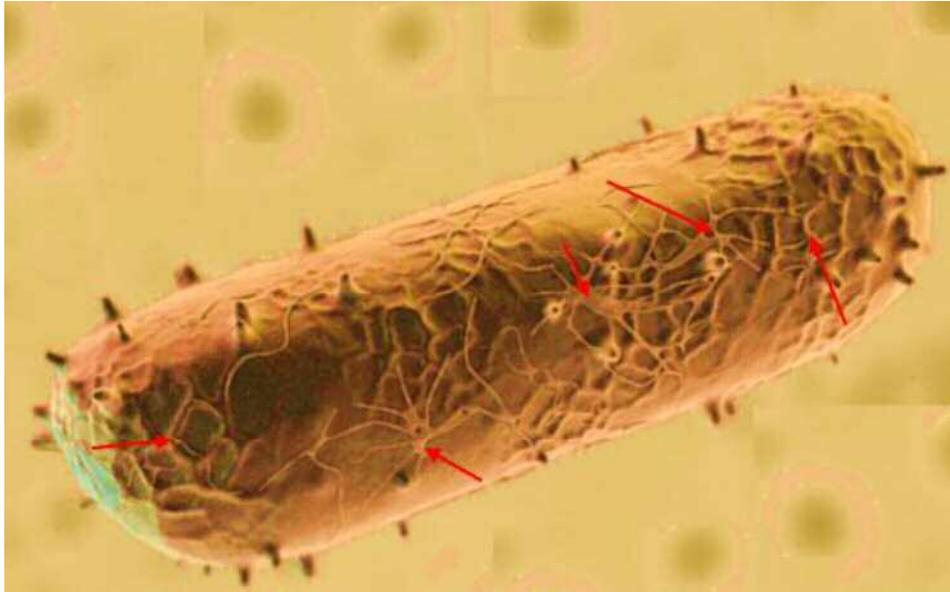
Sanitariamente hablando, a la fecha no se ha reconocido la presencia de agentes virales en carpas de México, aunque si se ha informado de sospechas no confirmadas. Tomando en consideración la constante introducción de carpas desde países donde SVCV ha sido detectado, cabe la posibilidad de que el virus haya ingresado al país a través de peces portadores.

En este trabajo se presentan resultados de un estudio de diagnóstico sanitario integral que permitieron realizar la confirmación de SVCV en carpas del país, a través de un estudio clínico-patológico en peces que sufrieron una enfermedad septicémica en la Laguna de Tecocomulco, un cuerpo de agua natural del Estado de Hidalgo en el centro de México. Así mismo se estudiaron las características de replicación y supervivencia del virus.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Familia *Rabdoviridae*

Los virus de la Familia *Rabdoviridae* presentan una morfología típica en forma de bala; son virus con cadena de ARN sencilla con polaridad negativa (ssARN), el cual constituye aproximadamente el 2% de la partícula viral. Las medidas del virión son de aproximadamente 80 a 180 nm de longitud por 60 a 90 nm de diámetro, posee nucleocápside interior de simetría helicoidal que mide alrededor de 50 nm de diámetro (Murphy, 1996).



**Figura 1. Virión de Rhabdovirus.** Típica forma de bala, se muestran las glicoproteínas como picos superficiales, que favorecen la entrada a la célula huésped mediante su unión a receptores específicos. En fotografía microscópica es característico observar presencia de estrías (flechas rojas) (Behera and Swain 2012).

La palabra Rhabdovirus se deriva del griego ῥάβδος "rhabdos", que significa "varilla" y del latino *vīrus* "virus", que significa "veneno" (Wildy, 1971). El término "Rhabdovirus" fue sugerido por primera ocasión en el año de 1966 por Melnick y Mc Coombs; posteriormente, en 1970 el Comité Internacional de Taxonomía de Virus recomendó la adopción del término Rhabdovirus (Murphy, 1996).

Los miembros de esta familia viral pueden infectar una amplia gama de hospederos (Anhe *et. al.*, 2002; Dietzchold *et. al.*, 1996; Brown, 1987). Debido a las enfermedades que causan en humanos, estos virus se consideran un problema de salud pública y también representan riesgos para la industria agropecuaria al ocasionar grandes pérdidas económicas, por afectar a animales domésticos y de vida silvestre, peces y plantas (Jackson *et. al.*, 1987).

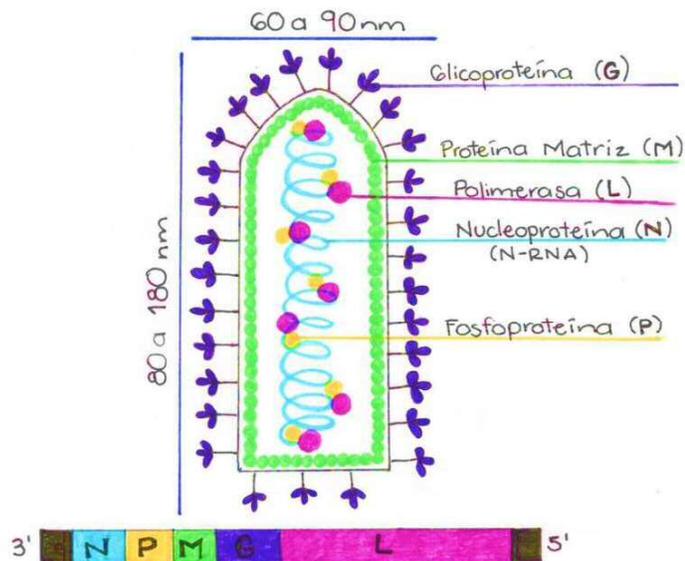
### 2.1.1 Estructura y organización de los Rabdovirus

El genoma de los Rhabdovirus típicamente codifica para cinco proteínas, una de éstas, que es la ARN-polimerasa dependiente de ARN, convierte todo el genoma en cinco ARN mensajeros (ARNm), cada uno de los cuales codifica una proteína que forma parte de la partícula del virus (Figura 2). Las cinco proteínas localizadas de exterior a interior del virión se ordenan de la manera que a continuación se describe (Figura 2), y cumplen con las siguientes características y funciones:

1. *La glicoproteína (G)*: Es la parte más externa del virión y forma una espina en la superficie a manera de trímeros, y es la que se fija a los receptores celulares que desencadenan la endocitosis viral. Es la única de las proteínas del virus que está glicosilada.

Esta proteína G, es una proteína inmunógena, actúa como el antígeno más importante para determinar las propiedades serológicas de los Rabdovirus. Es la responsable de bajar el pH del cual depende la actividad de fusión de membranas (Rigaut *et. al.*, 1991; Schlegel *et.al.*, 1982), tanto en mamíferos como en peces (Estepa *et al.*, 1996).

2. *La proteína matriz (M)*: es una proteína multifuncional periférica de la membrana, representa un papel sumamente importante en el ensamblaje viral y en la extrusión viral. Actúa como proteína reguladora con actividad estimulante de la replicación (Finke *et.al.*, 2003).
3. *La fosfoproteína (P)*: participa en la transcripción y replicación del virus.
4. *La ARN polimerasa viral dependiente de ARN (L)*: interactúa con las proteínas P y N para lograr la transcripción y replicación del virus (Anhe, 1985). Ejerce tres actividades enzimáticas: transcriptasa/replicasa, metilasa y polimerasa (Anhe, 2002).
5. *La nucleoproteína (N)*: es la principal proteína estructural, que cubre y protege al genoma de ARN, de las nucleasas. Forma la estructura helicoidal de la nucleocápside (Dietzgen *et al.*, 2011).



**Figura 2. Estructura de un Rhabdovirus y organización del genoma.** El SVCV codifica cinco proteínas estructurales: glicoproteína (G), proteína matriz (M), fosfoproteína (F), polimerasa (L) y la nucleoproteína (N). Los Rhabdovirus son virus ARN monocatenarios con sentido negativo, en el orden 3'-(leader), N, P, M, G, L, (trailer) (Howatson, 1970; Wagner, 1975).

### 2.1.2 Taxonomía de los Rhabdovirus

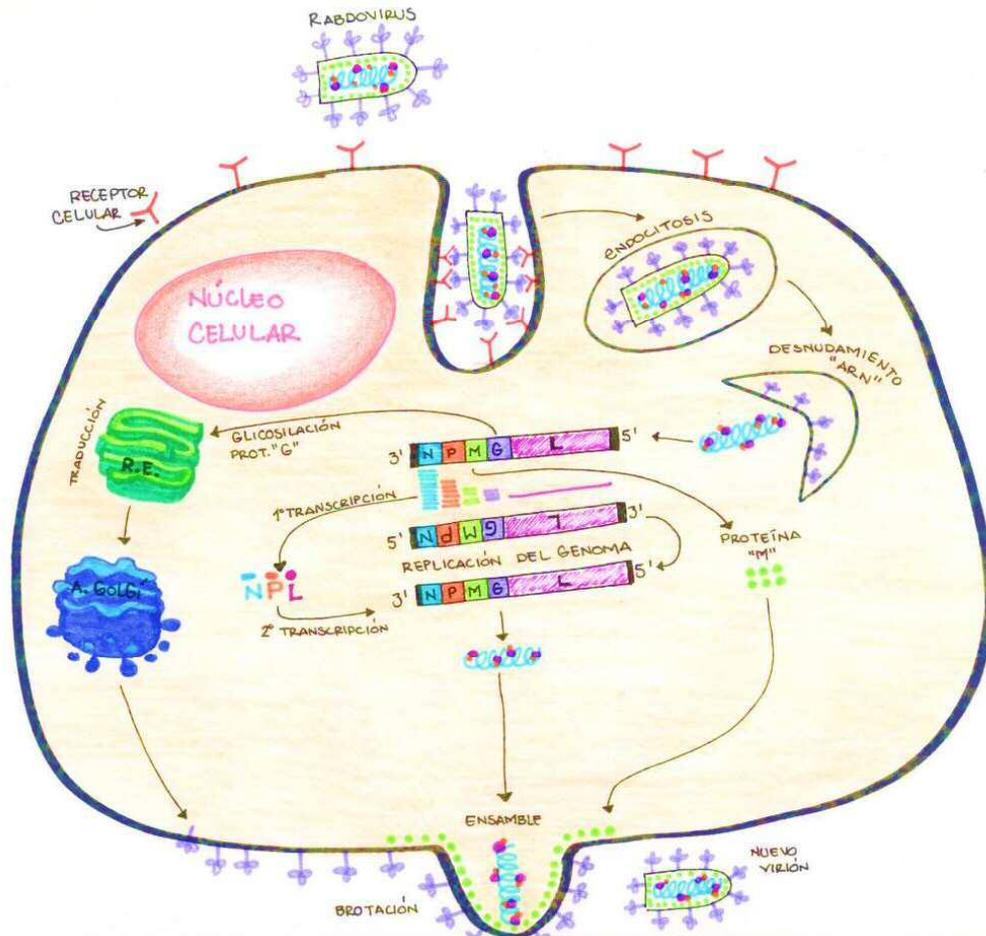
Esta Familia incluye tres subfamilias, 40 géneros y 246 especies. La subfamilia *Alpharhabdovirinae* incluye 26 géneros: Almendravirus, Alphanemrhavirus, Alphapaprhavirus, Alpharicinrhavirus, Arurhavirus, Barhavirus, Caligrhavirus, Curiovirus, Ephemerovirus, Hapavirus, Ledantavirus, Lostrhavirus, Mousrhavirus, Merhavirus, Lissavirus, Perhadbovirus, Ohlshavirus, Sawgrhavirus, Sigmavirus, Sprivivirus, Sripuvirus, Sunrhavirus, Tibrovirus, Tupavirus, Vesiculovirus, Zarhavirus. Dentro de la subfamilia *Betarhabdovirinae* se encuentran 6 géneros: Alphanucleorhabdovirus, Betanucleorhabdovirus, Cytorhabdovirus, Dichorhabdovirus, Gammanucleorhabdovirus, Varicosavirus. La subfamilia *Gammarrhabdoviridae* incluye un solo género e infecta a peces, Norvirhabdovirus publicadas en ICTV en 2022 (<http://www.ictvonline.org/index.asp>). Algunos de los ejemplos más importantes de esta familia, son el virus de la rabia en seres humanos, así como en animales terrestres, que ocasionan casi el 100% de mortalidad (Dietzschold *et al.*, 1996), y el virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV) que causa una enfermedad hemorrágica grave en peces ciprínidos (Ahne *et al.*, 2002).

Los viriones de la Familia *Rhabdoviridae* en general se relacionan en términos tanto de características morfológicas, como genéticas, ocasionando alta mortalidad y morbilidad (Walker *et al.*, 2000; Warrilow *et al.*, 2002). El uso de pruebas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a base de enfoques y análisis de secuencias, ha dado lugar a la adición de nuevos géneros a la familia *Rhabdoviridae* (Amelia *et al.*, 2002; Kuzmin *et al.*, 2003; Mork *et al.*, 2004).

### 2.1.3 Ciclo de replicación de los Rabdovirus

Cuando un virión de tipo *Rhabdoviridae* infeccioso encuentra una célula huésped susceptible, el resultado más frecuente es una serie de eventos que termina en la liberación de los nuevos viriones de la progenie y con la muerte de la célula. La multiplicación de los Rabdovirus ocurre dentro del citoplasma de la célula huésped, donde a menudo se forman cuerpos de inclusión intracitoplásmicos, también llamados "cuerpos de Negri", así denominados porque en 1903 el médico italiano, Adelchi Negri describió esta lesión (Shope *et.al*, 1987). La temperatura óptima para la replicación del virus y la actividad transcriptasa asociada al virión es de entre 20° y 25° C (Roy *et.al.*, 1978).

El proceso de infección de los Rabdovirus (Figura 3), es una serie de eventos en el siguiente orden: fijación y adsorción, penetración, liberación, transcripción (1° y 2°), traducción, replicación, ensamblaje y brotación (Wagner *et al.*, 1963).



**Figura 3. Esquema representativo de infección y replicación de un Rabdovirus.** La adsorción de los Rabdovirus depende de la presencia del receptor específico en la superficie celular, que permite la unión y penetración del virión hacia la célula, desencadenando los subsecuentes eventos que permitan la replicación viral. Cada evento no es necesariamente un precursor de los posteriores, sino que pueden ocurrir simultáneamente (Wagner *et al.*, 1963; Rose *et.al.*, 2000; Barr *et.al.*, 2002).

1. *Fijación y Adsorción*; La partícula viral inicia su ciclo de replicación por la unión de los trímeros de la glicoproteína (G) a los receptores de superficie de la célula huésped.
2. *Penetración*; el virión entra a la célula mediante endocitosis mediada por receptores, un evento dependiente de la energía generada por la célula, que requiere una temperatura fisiológica para la supervivencia del virus.
3. *Liberación del genoma viral*; la acidificación del endosoma (pH 5.7 a 6.1), altera la conformación de la glicoproteína (G), permitiendo la fusión de la membrana viral con la membrana endosomal y así la liberación de la nucleoproteína en el citoplasma celular.
4. *Transcripción 1°*; durante la transcripción el complejo RdRp (RNA-dependent RNA polymerase) transcribe el ARN viral en cinco ARNm de forma secuencial y en gradiente (genes proximales a 3' se transcriben con mayor abundancia que los genes distales), estos son traducidos por ribosomas de la célula huésped para producir proteínas virales funcionales que se requieren para la replicación del genoma (Banerjee *et. al.*, 1990; Barr *et al.*, 2002). Tan pronto como estas transcripciones se traducen en proteínas pueden comenzar la replicación.

\*Los ARNm del Rabdovirus están encapsidados y metilados en el extremo 5' y poliadenilados en el 3', sin embargo, el ARN líder no lo está (Rose *et.al.*, 2000).

5. *Glicosilación de la proteína G (postraducción)*; una vez obtenido el ARNm de la proteína G mediante la transcripción, viaja a través de vesículas y se inserta en la membrana del retículo endoplásmico (RE) para su traducción y por continuidad es movida hacia el aparato de Golgi donde se glicosila. Una vez ya glicosilada se inserta en una porción de la membrana citoplásmica, actuando como señal para que la proteína M ya traducida se acople en la región de la membrana citoplásmica donde se encuentra la proteína G.
6. *Replicación*; se sintetiza un antígenoma (+ssARN) complementario de longitud completa y sirve como "plantilla" para la síntesis de genomas de sentido negativo de longitud completa (Banerjee *et.al.*, 1990; Wunner, 1991; Finke *et al.*, 2003).
7. *Transcripción 2ª*; los nuevos genomas pueden utilizarse como plantilla para la transcripción o ensamblarse en nuevas partículas infecciosas. Tanto el genoma como el antígenoma están encapsidados con la proteína N (ARN-N), que junto con las proteínas P y L forman el complejo de Ribonucleoproteína (RNP), este es usado en rondas subsecuentes de transcripción, replicación o ensamblado en nuevos viriones (Wunner, 1991; Rose *et.al.*, 2000; Barr *et. al.*, 2002).
8. *Ensamblaje*; una vez que se llevó a cabo la transcripción, traducción y replicación, la formación de núcleo-cápsides nuevas es inmediata. Una

vez conformada la núcleo-cápside, viaja hacia la región de la membrana citoplasmática donde ya se encuentran las proteínas G y M, listas para acoplarse y formar nuevos viriones. El ensamble ocurre mediante el reconocimiento mutuo de secuencias de aminoácidos en las proteínas involucradas “N, G y M”.

9. *Brotación*; los nuevos viriones emergen de la célula a través de gemación, listos para infectar otra célula susceptible. (Warrell, 2004; Basic *et al.*, 2009).

## 2.2 Rabdovirus de peces

Dentro de familia *Rhabdoviridae*, existe un interesante y económicamente importante grupo de virus que infectan peces, tanto en vida silvestre como en condiciones de cultivo, donde la mortalidad regularmente es alta (McAllister, 1979; Betts *et al.*, 2003).

Históricamente, los Rabdovirus que afectan peces se consideraban miembros de los géneros *Vesiculovirus* y *Lyssavirus*, basándose principalmente en sus perfiles proteicos observados en electroforesis en gel. Sin embargo, actualmente se reconoce que los peces pueden ser afectados por tres géneros de la familia (Cuadro 1), a saber: *Novirhabdovirus*, *Perhabdovirus* y *Sprivivirus* (Stone *et al.*, 2013).

Género	Virus	Enfermedad que ocasiona	Especie afectada
<b>Novirhabdovirus</b>	Hirame rhabdovirus		Platija, grayling, varios.
	IHNV	Virus de la necrosis hematopoyética infecciosa	Salmónidos
	Snakehead virus		Snakehead y Pescado de aguas cálidas de Asia sudoriental
	VHSV	Virus de la septicemia hemorrágica viral	Salmónidos, otros
<b>Perhabdovirus</b>	Anguillid Rabdovirus		Anguilas
	Perch rhabdovirus		Perca, varios
	Sea trout rhabdovirus		Trucha de mar
<b>Sprivivirus</b>	Pike fry rhabdovirus	Enfermedad roja	Lucio, varios
	SVCV (Spring Viraemia of Carp Virus)	Virus de la viremia primaveral de la carpa	Ciprínidos, otros

**Cuadro 1. Rabdovirus de teleósteos reconocidos por el Comité Internacional sobre la Taxonomía de Virus** (Stone *et al.*, 2013; ICTV, 2017).

Los virus que infectan a peces y que pertenecen a uno de los tres géneros existentes dentro de la familia *Rhabdoviridae* han sido clasificados serológicamente; sin embargo, preferentemente la distinción entre especies se basa en la divergencia de la secuencia de nucleótidos y en la separación filogenética de los virus (ICTV, 2017). Comparaciones directas entre genes de la familia *Rhabdoviridae* han demostrado el grado de conservación de las proteínas que conforman el genoma, en el orden N>M>G>P>L (Bourh *et al.*, 1993).

La divergencia de secuencia de nucleótidos tiene como regla que >17%, indica especies separadas dentro del mismo género y que aislados que son idénticos en 85%, se consideran de la misma especie.

### **2.2.1 Rabdovirus de peces miembros del género *Novirhabdovirus***

La principal diferencia entre *Novirhabdovirus* y los demás *Rhabdovirus* es la presencia del gen NV entre la proteína G y la proteína L (Wagner, 1975; Kurath *et al.*, 1997). La proteína NV, que no es estructural, es indispensable para la replicación eficiente de los *Novirhabdovirus*. No se conoce con exactitud la función de esta proteína, pues no aparece en el virión maduro, sin embargo, si está presente en las células infectadas (Kim *et al.*, 2011; Ammayappan *et al.*, 2011). Algunas investigaciones informan que, aunque esta proteína no es necesaria para la replicación, su presencia mejora substancialmente la multiplicación de los *Novirhabdovirus* (Biacchessi *et al.*, 2000).

#### **2.2.1.1 Virus de la Septicemia Hemorrágica Viral (VHS)**

Se le reconoce como uno de los principales patógenos de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), especialmente en Europa donde es el responsable de graves pérdidas económicas. Se trata de una enfermedad de notificación obligatoria ante la OIE.

En salmónidos, esta enfermedad se caracteriza por la manifestación de exoftalmia, palidez branquial (Wolf, 1988), dificultad para nadar y desorientación (Smail, 1999), obscurecimiento de la piel, hemorragias alrededor de la cabeza y base de aletas, también en órganos internos (Snow *et al.*, 1999), donde se aprecia necrosis en hígado y corazón (Brudeshet *et al.*, 2005).

Esta enfermedad fue descrita por primera vez en 1938 por Schäperclaus, sin embargo, el primer aislamiento del virus se logró hasta la década de los años 60's (Jensen, 1965). Anteriormente el VHSV solo se había aislado de salmónidos de agua dulce (Wizigmann *et al.*, 1980), pero en la actualidad se ha aislado de un gran número de especies marinas, cultivadas (lenguado y rodaballo) y en peces de vida libre (sardina, caballa, fletan negro, bacalao y arenque). Por tanto, esta enfermedad ha ampliado sus áreas geográficas de localización entre aguas europeas hasta las costas del Atlántico Norte (Anhe *et al.*, 1985; King *et al.*, 2001; Dixon *et al.*, 2003), algunas costas de Norteamérica (Hedrick *et al.*, 2003) y Japón (Takano *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 2002).

### **2.2.1.2 Hirame *Novirhabdovirus* (HIRRV)**

Este Rabdovirus de peces, se encuentra ampliamente distribuido en Japón y hasta la fecha no hay reportes de haber sido encontrado fuera de ese país. Fue aislado por primera vez de *Paralichthys olivaceus*, “especie comúnmente conocido como Flounder japonés” (Kimura *et al.*, 1986), junto con otras especies como son *Plecoglossus altivelis*, *Milio macrocephalus*, *Sebastes inermis* (Sano *et al.*, 1987; Yoshimizu *et al.* 1987).

En la década de los años 90`s, Nishizawa *et al.*, realizaron estudios para la caracterización molecular de este virus, mediante la secuenciación de los genes de la fosfoproteína y de la proteína matriz, y comparando las secuencias con secuencias del virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV) y el virus de la septicemia hemorrágica viral VHSV. Sus estudios concluyeron en que HIRRV está más estrechamente relacionado con IHNV (Kimura *et al.*, 1986). Sin embargo, los estudios filogenéticos publicados y las comparaciones de secuencias, colocan claramente al HIRRV dentro género *Novirhabdovirus* (Kurath *et al.*, 1997).

### **2.2.1.3 Virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV)**

El IHNV, es el agente causal de una enfermedad sistémica aguda que ocasiona alta mortalidad en salmónidos jóvenes tanto en cultivo como vida libre. Fue aislado por primera ocasión en Washington en la década de los años 50`s, del salmón rojo (*Oncorhynchus nerka*) cultivado (Rucker *et al.*, 1953; McAllister 1979). Pero fue hasta la década de los años 70`s que se propagó a Europa, Japón, Estados Unidos, Corea, Taiwán y China, a través de peces y huevos infectados que fueron comercializados (Bovo *et al.*, 1987, Laurencin, 1987, Sano *et al.*, 1977).

En los años ochenta, se identificaron seis ARNm de este virus (Kurath *et al.*, 1985). Más tarde se demostró que el sexto ARNm de IHNV correspondía a la proteína no estructural única que se sintetiza en células infectadas, pero se excluye de los viriones maduros (Schütze *et al.*, 1996, Kurath *et al.*, 1985). Esta proteína está identificada como la principal característica del género *Novirhabdovirus*.

La biología molecular e inmunología sobre IHNV está bien caracterizada (Bootland *et al.*, 1999; Wolf, 1988). La cepa tipo de IHNV es la cepa del Western Regional Aquaculture Center (WRAC) disponible en la American Type Culture Collection (ATCC VR-1392) (Morzunov *et al.*, 1995; Winton *et al.*, 2002). Los análisis filogenéticos basados en secuencias de nucleótidos del gen G clasifican esta cepa en cinco genogrupos principales “U, M, L, E y J” (Garver *et al.*, 2006), según la zona geográfica donde se han reportado (Cieslak *et al.*, 2017; Enzmann *et al.*, 2005; Johansson *et al.*, 2009; Kolodziejek *et al.*, 2008).

#### **2.2.1.4 Snakehead *Novirhabdovirus* (SHRV)**

Este virus fue aislado de *Channa striata*, una especie de pez con cabeza de serpiente. La enfermedad se caracterizó por ulceraciones necróticas y afectó a peces silvestres y cultivados en el sureste de Asia. Aunque varias especies de peces fueron infectadas experimentalmente, prevaleció más en cultivos de peces *Channa striata* (Kasornchandra *et al.*, 1991).

SHRV se identificó como Rabdovirus mediante estudios de microscopía electrónica. La caracterización se obtuvo mediante perfiles proteicos y neutralización cruzada. El análisis filogenético confirmó su estrecha relación con VSHV (Kasornchandra *et al.*, 1991; Johnson *et al.*, 1999).

SHRV puede replicarse a temperaturas de hasta 35°C (rango óptimo 28°-31°C) en células EPC (*Epitelioma Papulosum Cyprini*), a diferencia de otros *Norvirhabdovirus* que solo se replican a temperatura inferior de 20°C (Johnson *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2000). La secuencia del genoma completo de SHRV es de 11, 550 pb (acceso en el GenBank AF147498 y NC\_000903) (Johnson *et al.*, 2000).

#### **2.2.2 Rabdovirus de peces dentro del género *Perhabdovirus***

Al igual que otros virus de peces, el rango de temperatura de replicación de los *Perhavirus* es menor que el de Rabdovirus de mamíferos, lo que refleja la naturaleza poiquilotérmica acuática de la especie huésped.

##### **2.2.2.1 Perch *Rhabdovirus* (PRV)**

Esta enfermedad se notificó por vez primera en Irlanda en 1986 en la trucha marrón (*Salmo trutta*) silvestre. Entre los peces afectados por esta enfermedad la mayoría presentaba un comportamiento de natación anormal y enrojecimiento en la base de las aletas, con hemorragias internas. Al examen histopatológico se encontraron áreas de necrosis en el hígado, bazo y riñón (Betts *et al.* 2003).

Como en toda enfermedad, el diagnóstico se basa en signos clínicos, cambios histopatológicos y estudios complementarios. Para la confirmación del diagnóstico, es indispensable el aislamiento del virus para la identificación serológica y secuenciación del genoma (Talbi *et al.* 2011, Galinier *et al.* 2012, ICTV 2013, Gadd *et al.* 2013, Stone *et al.* 2013).

Aunque el rango natural de hospederos de PRV no ha sido completamente definido, se sabe que infecta principalmente a la perca, lobina (*Micropterus salmonides*), grayling (*Thymallus thymallus*) y lucio (*Esox lucius*) (Galinier *et al.* 2012; ICTV, 2013; Pozet *et al.*, 2005; Betts *et al.*, 2003).

### 2.2.3 Rabdovirus de peces dentro del género *Sprivirus*

Este género se conforma con dos miembros, de los cuales el más importante y representativo es el virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV).

#### 2.2.3.1 Virus de la Viremia Primaveral de la Carpa (SVCV)

El nombre es descriptivo de una viremia que afecta principalmente a la carpa común (*Cyprinus carpio carpio*), donde los peces más susceptibles a la infección suelen ser animales de un año de edad o menores (Cuadro 2). En países europeos, la enfermedad ocurre especialmente durante la primavera, cuando la temperatura del agua tiende a aumentar por encima de los 20°C, que favorece que el virus logre infectar y se replique con gran velocidad (Anhe, 1978, Anhe *et al.* 2002).

Etapa del pez	Porcentaje de infección	Porcentaje de mortalidad
Pez recién nacido	>80%	>60%
Pez de 3-5 cm	55-70%	40-55%
Juveniles	40-50%	30-40%
Adultos	<30%	<25%

**Cuadro 2. Porcentaje de infección y mortalidad por afección de SVCV, según edad del pez** (Adel *et al.*, 2008).

Anteriormente, SVCV se incluía en el género Vesiculovirus (King *et al.*, 2011), pero en 2013, se postuló la creación de un nuevo género dentro de la misma familia (Stone *et al.*, 2013). El nuevo género nombrado *Sprivirus* (Misk *et al.*, 2015; ICTV, 2014; Stone *et al.*, 2013), se deriva de la traducción en idioma inglés de la enfermedad Viremia Primaveral de la carpa “Spring Viraemia of Carp Virus”, convirtiéndola en su miembro más representativo e importante (Stone *et al.*, 2013; Adams *et al.*, 2014).

La propuesta de separar al SVCV del género Vesiculovirus para crear al género *Sprivirus*, se basó en su huésped principal que son peces de agua dulce del orden *Cypriniformes*, aunado a que el rango de temperatura reportado para la replicación del virus en peces es menor que la registrada en mamíferos. Por último, la separación ecológica, que se apoya en el análisis filogenético (Adams *et al.*, 2014).

Como se describe en el Cuadro 3, diversos estudios han reportado que el SVCV infecta de forma natural a la carpa común (*Cyprinus carpio carpio*), además de otros ciprínidos (Sano *et al.*, 2011). Sin embargo, investigaciones han demostrado que, de manera experimental y natural, también infecta a un gran número de especies marinas (Haenen *et al.*, 1993; Johnson *et al.*, 1999; Sanders *et al.*, 2003; Jeremic *et al.*, 2006; Cipriano *et al.*, 2011; Vicenova *et al.*, 2011; Misk *et al.*, 2015).

ESPECIES AFECTADAS DE FORMA NATURAL POR SVCV		ESPECIES INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE CON SVCV
CÍPRINIDOS	NO CÍPRINIDOS	
Carpa común ( <i>Cyprinus carpio carpio</i> ). Fijan <i>et al.</i> , 1971.	Trucha arcoíris ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) Jeremic <i>et al.</i> , 2006.	Rutilo ( <i>Rutilus rutilus</i> ), Haenen y Davidse, 1993.
Carpa Koi ( <i>Cyprinus carpio koi</i> ). Goodwin, 2002.	Lobina ( <i>Mycropterus salmoides</i> ) Cipriano <i>et al.</i> , 2011.	Pez cebra ( <i>Danio Rerio</i> ), Sanders <i>et al.</i> , 2003.
Carpa herbácea ( <i>Ctenopharyngodon idella</i> ) Goodwin, 1975.	Gusano ( <i>Lepomis macrochirus</i> ) Cipriano <i>et al.</i> , 2011.	Lucio norte ( <i>Esox lucius</i> ), Ahne, 1985b.
Goldfish ( <i>Carassius auratus</i> ) Anhe, 1973.	Esturion siberiano ( <i>Ascipenser baerii</i> ) Vicenova <i>et al.</i> , 2011.	Guppy ( <i>Lebistes reticulatus</i> ), Bachman y Ahne, 1974.
Orfe ( <i>Leuciscus idus</i> ) Dixon <i>et al.</i> , 1994.	Lucio ( <i>Esox lucius</i> ) Vicenova <i>et al.</i> , 2011.	Pez globo, Bachman y Ahne, 1974.
Tenca ( <i>Tinca tinca</i> ) Ahne, 1982.	Camarones peneidos, Johnson <i>et al.</i> , 1999	Lechon blanco ( <i>Catostomus commersoni</i> ) Misk <i>et al.</i> , 2015.
Esmeralda (Notropis atherinoides) Cipriano <i>et al.</i> , 2011.		

**Cuadro 3. Especies acuáticas susceptibles a la infección por SVCV de forma natural (ciprínidos y no ciprínidos) e infectados experimentalmente.**

### 2.2.3.1. a Distribución de SVCV

El primer aislamiento de “*Rhabdovirus carpio*” se notificó en la ex-Yugoslavia (Fijan *et al.*, 1971), y posteriormente se propagó a Francia (Tuffery, 1972; Fijan, 1976), Checoslovaquia (Macura *et al.*, 1973), Alemania Occidental (Bachmann *et al.*, 1973) y a la antigua Unión Soviética (Rudikov *et al.*, 1975). También se ha reportado en la mayoría de los países europeos (Ahne *et al.*, 2002) y asiáticos, Corea (Oh *et al.*, 2001), China (Gao *et al.*, 2004). Así como en el Medio Oriente (Perelberg *et al.*, 2003; Soliman *et al.*, 2004; Dikkeboom *et al.*, 2004). En el continente americano únicamente se ha descrito en Brasil en pez dorado silvestre, y en los Estados Unidos y en Canadá únicamente en peces silvestres de los grandes lagos, no en peces de granja (Garver *et al.*, 2007). En otros países de Latinoamérica y México no se ha informado, aunque se debe reconocer la falta de servicios de diagnóstico enfocados a la piscicultura de los países.

Además de su aislamiento de peces, en 1999 en Hawaii, se informó de un primer aislamiento de SVCV en camarones, un huésped invertebrado. Los camarones afectados provenían de estanques mixtos que contenían también una población de peces (Johnson *et al.*, 1999).

Países como Dinamarca, Finlandia, Irlanda, Suecia, algunas regiones de Inglaterra, Irlanda del Norte, Isla de Man, Jersey y Guernsey son consideradas libres de SVCV (Emmenegger *et al.*, 2016), y por lo general mantienen

programas de prevención basados en las recomendaciones descritas en el Código Sanitario de animales acuáticos de la OIE (OIE, 2015c).

### 2.2.3.1.b Caracterización del Genoma de SVCV

La historia de la caracterización del genoma del SVCV comienza en 1984 (Kiuchi *et al.*, 1984; Roy *et al.*, 1984), con la publicación de la secuencia completa del gen M y los primeros 70 nucleótidos (3' end) del genoma; seguido de la secuenciación parcial del gen L (Bjorklund *et al.*, 1995).

En 1999 se publicó la secuencia completa del gen de la glicoproteína de un Rabdovirus aislado en camarones enfermos en Hawaii, la cual contiene el 99% de identidad comparada con el SVCV (Lu *et al.*, 1991).

En el cuadro 4, se muestran 6 cepas depositadas en el GenBank, y que han sido secuenciadas por completo (Xiao, *et al.*, 2014).

Secuencia Completa del genoma	Número de acceso en el Gen Bank	Origen geográfico	Tamaño del genoma (pb)
Fijian	AJ318079	Europa	11,019
Björklund	NC_002803	Europa	11,019
SVCV-A1	DQ097384	China	11,100
SVCV-A2	DQ491000	China	10,990
SVCV-C1	EU177782	China	11,047
SVCV-265	KJ513477	China	11,029

**Cuadro 4. Secuencias completas de seis genomas de SVCV** identificados y depositados en el GenBank, con número de acceso, clasificados por su origen geográfico europeo o asiático (Xiao *et al.*, 2014).

### 2.2.3.1.c Patología y signología clínica de la Viremia Primavera de la Carpa (SVC)

La Viremia Primavera de la Carpa es una enfermedad muy importante en la producción piscícola multinacional por causar alta morbilidad y mortalidad. Además de las pérdidas económicas, ocasiona serios impactos negativos en las poblaciones de peces nativos que son sustento de zonas de escasos recursos; puede propagarse internacionalmente a través de peces vivos y/o sus productos o subproductos (Anhe *et al.* 2002; OIE, 2015c). Debido a lo anterior, se considera una enfermedad de notificación obligatoria ante la OIE (OIE, 2015c), ya que como en el caso de otras enfermedades, los peces con infección clínica o asintomática pueden transportar el virus y perpetuar así la infección (Wolf, 1988; Ahne *et al.*, 2002).

Los signos clínicos de la SVC no son específicos o exclusivos de esta enfermedad. Generalmente, la superficie corporal del pez con infección activa tiende a presentar una coloración más oscura; las branquias se observan pálidas

y el movimiento opercular lento. Se presenta también pérdida de equilibrio y los peces no reaccionan oportunamente a los estímulos (Fijan, 1976; Anhe, 1978; Wolf, 1988; Ahne *et al.*, 2002).

Entre los signos que más se han reportados se encuentra la distensión abdominal, exoftalmia, inflamación o edema del conducto anal y hemorragias petequiales de piel, branquias y ojos (Fijan, 1976; Anhe 1978, Anhe *et al.* 2002). Una de las lesiones internas más características en casos agudos son las hemorragias en la vejiga natatoria (Fijan, 1976; Anhe 1978; Wolf, 1988; Ahne *et al.*, 2002).

Los animales clínicamente afectados presentan un fluido seroso en la cavidad abdominal, que puede estar mezclado con sangre o material necrótico y se observan hemorragias focales y/o petequias en el músculo y tejido adiposo (Fijan, 1976; Anhe 1978; Wolf, 1988; Ahne *et al.*, 2002). El bazo generalmente está inflamado, con una textura gruesa-rugosa, existe inflamación cardíaca y pericarditis (Soliman *et al.*, 2008).

Las infecciones secundarias ya sea por bacterias y/o parásitos suelen influir en la signología, en el cuadro clínico y en el índice de mortalidad de los peces infectados (Anhe *et al.*, 2002; Yuan *et al.* 2012).

Durante una infección experimental de SVCV en carpa común, el hematocrito (Jeney *et al.*, 1990) demostró un marcado aumento de neutrófilos circulantes, monocitos, eosinófilos y basófilos. El plasma presentó bajos niveles de calcio, fosfato inorgánico, fosfatasa alcalina, proteína total y colesterol; con notable aumento en bilirrubina total (Rehullka, 1996).

#### **2.2.3.1.d Hallazgos histopatológicos en Carpa Común infectada con el SVCV.**

Microscópicamente, en los órganos principales se ha observan lesiones asociadas a un proceso septicémico. El riñón presenta daños tanto en tejido hematopoyético como excretor; tales como degeneración tubular hialina y vacuolización con formación de cilindros que obstruyen túbulos renales; nefritis intersticial y áreas de necrosis multifocal (Negele, 1977). Los vasos sanguíneos de hígado presentan perivasculitis necrotizante que avanza a necrosis con infiltración linfocitaria e histiocitos; hiperemia y degeneración con áreas de necrosis multifocal. El bazo muestra hiperemia y/o hemorragias con hiperplasia de centros reticuloendoteliales y melanomacrófagos agrandados; pancreatitis con necrosis multifocal. Intestino con enteritis e inflamación perivascular y necrosis con desprendimiento del epitelio. En corazón se observa pericarditis, endocarditis y miocarditis con necrosis miocárdica focal. En la vejiga natatoria se aprecia erosión epitelial, ulceración con áreas de hiperplasia y displasia, hemorragias en submucosa y vasos sanguíneos dilatados.

### **2.2.3.1.e Transmisión de SVCV**

La transmisión de SVCV ocurre de manera horizontal por contacto directo o a través del agua o fómites (Goodwin *et al.*, 2004). La transmisión vertical no se ha comprobado; sin embargo, el virus puede estar presente en los fluidos reproductivos de peces infectados (Bekesi *et.al.*, 1985; Fijan, 1988; Goodwin *et al.*, 2004).

Algunos autores proponen a vectores invertebrados como medio de transmisión de múltiples enfermedades de peces como son la sanguijuela *Piscicola piscicola* y el piojo de agua *Argulus foliaceus* (Ahne, 1978; Ahne, 1985; Pfeil-Putzien, 1978), no excluyendo la participación de algunas aves piscívoras (Sano *et al.*, 2011). SVCV, fue recuperado de la garganta regurgitante de la garza real (*Ardea cinerea*), 120 minutos después de alimentarse con peces infectados (Peters *et.al.*, 1986).

El SVCV ingresa por el epitelio branquial del hospedador, desencadenando una viremia, de esta manera el virus se propaga rápidamente al hígado, riñón, bazo y otros órganos del pez (Dixon, 2008).

En un estudio sobre infección y replicación de SVCV, carpas comunes mantenidas a 13°C fueron desafiadas a través de agua contaminada con SVCV; se reportó como punto de entrada del virus y sitio primario de multiplicación a las branquias, órgano diana donde el SVCV puede ser aislado después de 2 hpi. Posteriormente el virus se disemina a través del torrente sanguíneo causando una viremia secundaria entre los 6 y 11 días postinfección (dpi) (Anhe, 1978). En este tiempo o días más tarde el virus es detectable en riñón, hígado y bazo, con altos títulos que indican que estos órganos representan el tejido objetivo para la replicación viral (Ahne, 1978; Baudouy *et al.*, 1980; Fijan *et al.*, 1971). A partir de los 11 dpi, SVCV es eliminado a través de las heces, y permanece viable por varios días más en el ambiente (Anhe, 1978).

La ubicación y multiplicación de SVCV ocurre en el endotelio de los vasos sanguíneos (especialmente en los capilares sanguíneos, produciendo a menudo vasculitis), probablemente mayormente en riñón (Anhe *et.al.*, 2002). Varios autores sugieren que esto sería la causa más probable de hemorragias internas y externas (Anhe *et al.*, 2002; Sano *et al.*, 2011). Por otra parte, se ha postulado al desequilibrio osmorregulador como la posible causa de muerte, debido a la multiplicación del virus en el tejido renal hematopoyético y excretor (Anhe *et al.*, 2002).

El virus es excretado de peces portadores a través de la orina, las heces y a través de la mucosidad de la piel, así como en exudados de ampollas de la piel o bolsas de escamas edematosas.

## **2.3 Respuesta inmune de la carpa frente a la infección de SVCV**

El sistema inmune de los vertebrados ha co-evolucionado constantemente junto con las estrategias que los virus han desarrollado para evadir las defensas del

huésped. Una de las estrategias más usadas por ciertos virus, bacterias y parásitos para evadir el sistema inmunológico del huésped y poder escapar de las respuestas inmunitarias protectoras humorales y celulares es la variación antígeno/epítipo (Dixon *et.al.*, 1994).

Para los vertebrados poiquilotérmicos, la temperatura es un factor crítico en las interacciones huésped-patógeno (Chen *et.al.*, 2008). Casi todos los aspectos de la fisiología del huésped tales como: la fuerza y velocidad de la respuesta inmune y la replicación del patógeno dependen de la temperatura (Dixon *et.al.*, 1994). Se designa a la temperatura como el principal factor ambiental ante la infección del *Rhabdovirus carpio* (Anhe, 1986).

En la carpa común, durante la infección con SVCV se ha reportado a los 20° C como la temperatura de mayor desarrollo de anticuerpos neutralizantes en 7 días post desafío. Sin embargo, los anticuerpos se ven reducidos si la temperatura desciende a 10° C, donde se observa un retraso a 7 semanas o no se desarrollan por completo (Anhe, 1986; Baudov, 1978). Además de la temperatura, otros factores ambientales como la edad, la dieta, la estacionalidad y el estado reproductivo serán aspectos importantes de estudio para comprender completamente la respuesta inmune ante los Rabdovirus de peces.

La reducción de la inmunidad de la carpa en temperaturas inferiores a 10° C explica las condiciones ambientales asociadas con eventos de mortalidad, así como la detección de anticuerpos neutralizantes después de brotes a temperaturas más bajas (Anhe *et al.*, 1998). Existe un estudio donde la carpa común sobrevivió a 13°C durante la infección experimental con SVCV, desarrollando anticuerpos neutralizantes que persistieron hasta 4 meses después de la infección (Jorgensen *et al.*, 1989, Anhe *et al.*, 1998).

Los Rabdovirus no pueden replicarse en células cebadas con IFN. Sin embargo, pueden interferir directamente con las funciones críticas de los efectos inmunes, incluyendo el sistema interferón para evadir el control inmunológico. También interfiere con los procesos programados de muerte celular (apoptosis) (Chen *et.al.*, 2008).

En 2013, se desarrollaron e identificaron microarrays para el pez cebra enriquecidos para genes asociados a inmunidad, y se identificaron receptores idénticos a los de tipo Toll-like y del ácido retinoico-I (RIG-I) asociados con la infección por SVCV (Encinas *et al.*, 2013). Se encontró que la glicoproteína de SVCV induce autofagia en células EPC, facilitando la replicación. Considerando también que la autofagia promovió la supervivencia de células infectadas con SVCV (Liu *et al.*, 2015).

## **2.4 Periodo de incubación de los Rabdovirus de peces**

Aunque se sabe que el periodo de incubación depende de ciertos factores como la temperatura del agua, edad del pez, la condición nutricional del pez, cantidad de virus presente, entre otras condiciones ambientales (Sano, *et al.*, 2011; Adel,

*et al.*, 2008; Basic, *et al.*, 2009), hasta el momento no se ha documentado con exactitud el periodo de incubación de la infección natural por los Rabdovirus de peces (Basic, *et al.*, 2009).

En diversos estudios experimentales donde SVCV ha sido expuesto por la vía de inmersión, se tienen registros de periodos de incubación que van desde los 7 hasta los 15 dpi, según la especie acuática estudiada (Adel, *et al.*, 2008).

Tomando en cuenta que la temperatura del agua es un parámetro ecológico muy importante, que controla la presencia o ausencia de enfermedad en las infecciones por Rabdovirus de peces, se ha reportado que estos virus se multiplican con facilidad a temperaturas elevadas (Roy, 1979). Sin embargo, algunas investigaciones demuestran que el SVCV está presente en lugares con climas fríos, lo que sugiere una evolución independiente y constante del virus en distintas regiones geográficas (Dikkeboom *et al.*, 2004; Garver *et al.*, 2007; Stone *et al.*, 2003).

## 2.5 Parámetros de sensibilidad de SVCV

Las estrategias de bioseguridad son los mecanismos más eficientes para prevenir la introducción y presencia de SVC. Estas incluyen a normativas internacionales y nacionales, que incluyen la gestión de buenas prácticas de producción en las granjas. Sin embargo, en distintas investigaciones sobre SVCV se han identificado desinfectantes y otros productos químicos y/o físicos que permiten la inactivación del virus (Kirgu *et al.*, 2007; Dixon, 2008; Dixon *et al.*, 2012). Los más destacados se describen en el Cuadro 5.

PARÁMETROS DE SENSIBILIDAD DE SVCV	
Rango de sensibilidad a UV	1.0 (mJ/cm <sup>2</sup> ), Yoshimizu <i>et al.</i> , 2005.
Concentraciones de inactivación de Desinfectantes	<b>Cloro:</b> 36-55 mg/L por 2min y 7.6 mg/L 20 min, para equipos, redes, etc. (Ahne, 1982). <b>Amoniaco cuaternario:</b> 100 ppm por 4 min, para desinfección de estanques, saneamiento de manos y desinfección de superficies de plástico. (Ahne and Held, 1980).
Temperaturas y pH de inactivación para SVCV	45°C por 20 min y 50°C por 5 min (Ahne, 1976). pH 3.0 por 3 h y pH 12.0 por 5-10 min (Ahne, 1976, 1982).
Inactivación del virus	Formalina al 3% por 10 min Cloro (500 ppm) Yodo 0,01% NaOH 2% UV (254 nm) Irradiación Gamma (103 krads) (Kinkelin & Le Berre, 1974; Ahne 1976, 1982).

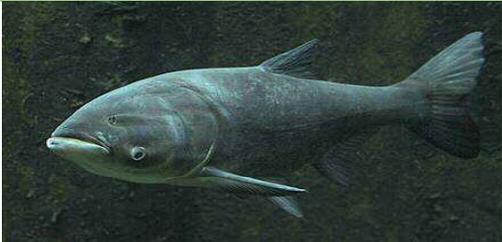
**Cuadro 5. Parámetros de sensibilidad de SVCV ante soluciones y activos.**

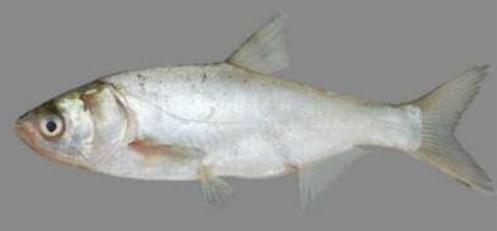
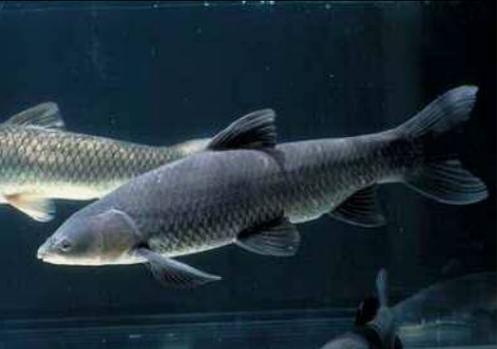
## 2.6 La carpa (*Cyprinus spp.*)

Las carpas (*Cyprinus spp.*) son los peces más ampliamente difundidos en el mundo con excepción de la Antártica. Se introdujeron a México en el año de 1889 (Obregón, 1961, Zambrano y Macías-García, 2000), con el propósito de proveer a poblaciones humanas rurales una fuente de proteína animal accesible en su dieta diaria (DOF, 2012), pero también para crear fuentes de empleos mediante el desarrollo de siembras de carpa. Para cumplir estos objetivos, el gobierno federal realizó varias importaciones de diferentes especies de este tipo de peces, provenientes de Europa (DOF, 2012, Arredondo y Lozano, 2003).

Las carpas (*Cyprinus spp.*), son peces omnívoros, su alimentación se basa en la ingesta de plantas acuáticas, insectos, crustáceos, zooplankton y bentos, (Hovarth L. *et al.*, 1992). Actualmente, la producción de carpa (*Cyprinus spp.*) en México se obtiene de la acuicultura (79%) y la pesca (21%) (Arredondo y Lozano, 2003). La producción nacional por volumen ocupa el 11° lugar de producción pesquera total y el 17° lugar por valor económico que representa la venta de productos. Las estadísticas oficiales indican que, los estados con mayor producción de carpa son Hidalgo, Michoacán, Tamaulipas, Jalisco y Coahuila (SAGARPA, 2020).

Las especies de carpa (*Cyprinus spp.*) presentes actualmente en México se ilustran y nombran en el Cuadro 6.

Especie de carpa	Nombre científico	Imagen
Carpa común	<i>Cyprinus carpio</i>	
Carpa cabezona	<i>Aristichthys nobilis</i>	

Carpa herbívora	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	
Carpa plateada	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	
Carpa Espejo	<i>Cyprinus specularis</i>	
Carpa Barrigona	<i>Cyprinus carpio rubrofuscus</i>	
Carpa negra	<i>Mylopharyngodon piceus</i>	

Carpa Koi	<i>Cyprinus carpio koi</i>	
Carpa dorada	<i>Carassius auratus auratus</i>	

Cuadro 6. Principales especies de carpa (*Cyprinus spp.*) cultivada en México (CONAPESCA, 2017).

### 2.6.1 Carpa común (*Cyprinus carpio carpio*)

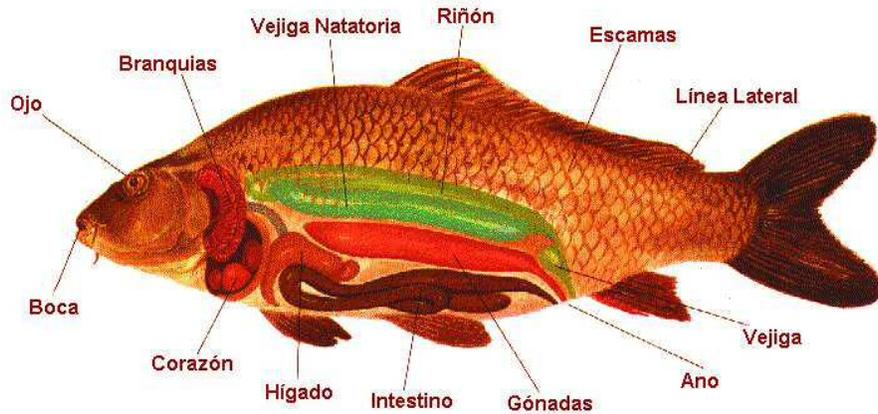
La carpa común (*Cyprinus carpio carpio*), habita mayormente aguas templadas-cálidas. Aunque puede adaptarse también a temperaturas bajas, limitando su crecimiento ya que su alimentación se detiene a temperaturas cercanas a los 5°C, a consecuencia del estrés generado por la baja temperatura (DOF, 2012). La temperatura óptima para su crecimiento se encuentra entre los 20 y 28°C (Hovarth *et al.*, 2002). Esta especie puede llegar a pesar entre 10 a 20 kilogramos en ambientes naturales y medir más de 80 cm de largo (Fernando, 1991; DOF, 2017).

En países asiáticos y europeos, la carpa común tanto en cultivos como en condiciones de vida silvestre es la especie más afectada por enfermedades ocasionadas por Rabdovirus (Hoole *et al.*, 2001).

Como en la mayoría de las especies de peces, la carpa común posee un cuerpo alargado (Figura 4); boca con labios gruesos que se proyectan hacia fuera y cuatro barbillas en el labio superior (dos cortas y dos largas). Sobre la maxila está presente el hueso kinetmoide (Fernando, 1991; Karunasagar y Pai, 1992, DOF, 2012).

Su cuerpo es color verdoso-marrón y ventralmente va de amarillo a blanco. No posee escamas en la cabeza (Hovarth, L. *et al.*, 1986). Tienen la vejiga natatoria conectada al oído gracias al aparato Weberiano (zona cefálica y caudal) (DOF,

2012). Las aletas son oscuras, ventralmente con un matiz rojizo, (Hovarth, L. *et al.*, 1986).



**Figura 4. Anatomía de la carpa común (*Cyprinus carpio carpio*).** Su cuerpo alargado se observa lateralmente, mostrando la coloración natural. Al retirar la pared costal se detalla la disposición de los órganos internos (Hovarth, L. *et al.*, 1986; Fernando, 1991).

Diversos autores consideran a la carpa común como una especie de pez domesticada (Fernando, 1991). Sin embargo, en algunos países también ha sido considerada como una especie indeseable (Estados Unidos de América, Australia, entre otros), donde desafortunadamente su control o erradicación de estos peces no deseados ha resultado difícil, debido a que logran una gran adaptabilidad a los diversos cuerpos de agua donde habitan (Maitland *et al.*, 1992), se apoderan de hábitats, tornándose especie predominante con potencial para exterminar la fauna nativa, por lo que en muchos países se ha llegado a considerar como “plaga” (Karunasagar *et al.*, 1992).

En el Cuadro 7, se exponen algunos motivos que han sustentado la decisión de introducir especies de ciprínidos a lugares donde no son endémicas, así como las consecuencias negativas que surgen de estas movilizaciones.

#### **Situaciones que conllevan a la introducción de ciprínidos a nuevos hábitats:**



1. Son excelente alimento proteico para poblaciones humanas.
2. Como especie importante para la acuicultura.
3. Son especies de interés deportivo.
4. Como animales ornamentales/acuarios (koi)
5. Como animales de experimentación o para estudios toxicológicos
6. Para control biológico de malezas acuáticas (c. herbívora, plateada y negra).

### Problemática de diversos países derivada de la introducción de ciprínidos:

1. Sobrepoblación masiva
2. Competencia con especies nativas y otros animales acuáticos
3. Daños ambientales generales
4. Transmisión de patógenos

**Cuadro 7. Situaciones que han justificado la introducción de Ciprínidos a nuevos hábitats y efectos adversos (DOF, 2012).**

## 2.7 Antecedentes sanitarios en carpas de México

De acuerdo con Armijo (1987) y Arredondo *et.al.*, (1986), muchas de las enfermedades que afectan a las carpas (*Cyprinus sp.*) que existen en México llegaron al país acompañando a los propios animales importados, procedentes de Europa y Asia. Entre los agentes infecciosos que ocasionan enfermedades destacan virus, bacterias, parásitos y hongos.

Los informes de estudios de diagnóstico sanitario en carpas de México son escasos. En una primera referencia, López-Jiménez (1987), informó la ocurrencia de casos no publicados de ascitis infecciosa atribuidas a *Aeromonas* spp. y *Pseudomonas* spp., y descarta la ocurrencia de casos de enfermedad viral.

Por su parte, Vélez-Hernández *et al.*, (1996), informaron casos de *Centrocestus formosanus* en carpas silvestres; a su vez, Soriano-Vargas *et al.*, (2010) reportaron el aislamiento de *Aeromonas bestiarum* en carpa común juveniles del centro de México, los cuales no mostraron signos de enfermedad ni lesiones patológicas asociadas a proceso septicémico.

Con respecto a virus, Yañez (1978) informó que a través de microscopía electrónica se logró la identificación de partículas virales del tipo coronavirus en peces del Centro Acuícola de Zacatepec, en el Estado de Morelos; sin embargo, dicha notificación únicamente se realizó en una publicación de difusión del sector acuícola de distribución local, carente de rigor editorial. Otros investigadores (Chávez *et al.*, 2008), presentaron evidencias sobre el diagnóstico de SVC a través de pruebas de inmunoensayo en carpas de los Estados de México e Hidalgo, no realizaron el aislamiento; sin embargo, más allá de un resumen de congreso nacional, este importante diagnóstico por el tipo de enfermedad que SVCV representa, no fue publicado.

De acuerdo a lo anterior, hasta antes del presente estudio en el país no se disponía de evidencias sólidas que hicieran sospechar y mucho menos comprobar la presencia de agentes virales en carpas del país.

Con una metodología más específica y formal, y de acuerdo a recomendaciones sanitarias internacionales desde el año 2000 el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) de la FMVZ-UAEM ha trabajado muestras para diagnóstico de virus basado en cultivo de células en carpas cultivadas y silvestres del país; sin embargo, hasta antes de este estudio no se tenía evidencia de manifestación de agente citopatógeno en muestras de carpas del país. En este caso, peces con signos de enfermedad septicémica fueron sometidos a un proceso de histopatología que evidenció las lesiones asociadas a SVCV, misma que fue confirmada mediante aislamiento y PCR, según protocolos OIE.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Las carpas (*Cyprinus spp.*) son peces que desde su introducción a México en 1889 han sido distribuidos por todo el territorio nacional, siendo un recurso alimentario muy importante para sectores de escasos recursos económicos y alimentarios. Pese a lo anterior, en el país las carpas se consideran de poco valor comercial y económico, por lo que han recibido poca atención sanitaria.

En México existen pocos registros de casos de enfermedades en carpas del país. Con respecto a virus, únicamente se cuenta con dos reportes locales no publicados que han sugerido presencia de virus en carpas; sin embargo, debido a que en estos casos no se logró el aislamiento ni la detección molecular, oficialmente las carpas del país están libres de este tipo de agentes.

Las carpas son susceptibles a distintos géneros y especies de virus. En este sentido, la viremia primaveral de la carpa (SVCV) y el herpesvirus de la carpa koy son dos enfermedades incluidas en la lista de enfermedades importantes de peces de la OIE. Por tanto, ante evidencia y/o sospecha de su presencia se debe realizar su diagnóstico oportuno y notificar a las autoridades competentes para establecer acciones de control. Derivado de las actividades de diagnóstico en sanidad acuícola realizados por el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) desde el año 2002 se han realizado análisis en carpas con base al Manual de diagnóstico de enfermedades de peces de la Organización Mundial de Salud Animal (OIE), y hasta antes del año 2015 no se tuvo evidencia clínica o de laboratorio de la ocurrencia en México de alguna enfermedad viral emergente para carpas.

En el último trimestre del año 2015 ocurrió un caso de enfermedad septicémica en carpas obtenidas de la Laguna de Tecocomulco, un cuerpo de agua natural del estado de Hidalgo. Inicialmente las lesiones macroscópicas orientaron a un caso por infección viral o septicemia por aeromoniasis; sin embargo, tras observar la manifestación de efecto citopático (CPE) en células EPC, se vio la necesidad de realizar un estudio para descartar o confirmar la presencia del virus de SVC y caracterizar las lesiones patológicas en los peces infectados y las características moleculares generales del agente para conocer su posible origen, así como su comportamiento in vitro.

#### 4. HIPÓTESIS

El virus aislado de carpa común (*Cyprinus carpio carpio*) de una laguna de Tecocomulco, Estado de Hidalgo, corresponde al *Rhabdovirus* causante de la viremia primaveral de la carpa (SVCV). Así mismo, las lesiones patológicas observadas en los peces afectados coinciden con lo descrito para este patógeno.

La viabilidad del SVCV es afectado por la temperatura de conservación *in vitro*.

#### 5. OBJETIVOS

##### 5.1 Objetivo General

Identificar y describir las características del Rhabdovirus de SVCV obtenido de carpa común (*Cyprinus carpio carpio*) de la laguna de Tecocomulco, Estado de Hidalgo; describir las lesiones patológicas en los peces infectados, y las características de replicación y sobrevivencia del virus *in vitro*.

##### 5.2 Objetivos Específicos

1. Identificar y analizar las características filogenéticas del Rhabdovirus de SVCV obtenido de carpa común (*Cyprinus carpio carpio*) procedente de una laguna del Estado de Hidalgo, para establecer su relación con otros Rhabdovirus.
2. Describir las lesiones patológicas macroscópicas e histopatológicas presentes en los animales afectados.
3. Determinar las características de crecimiento del virus en diferentes líneas celulares, tiempo de supervivencia y resistencia al medio ambiente.
4. Evaluar la viabilidad del Rhabdovirus mantenido a tres distintas temperaturas: temperatura ambiente (25°C), refrigeración (4°C) y ultracongelación (-80°C) y medir la multiplicación en células EPC.

## 6. MATERIALES y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia perteneciente a la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM), localizado en el kilómetro 15.5 de la carretera Panamericana en su tramo Toluca-Atlacomulco; comunidad de San Cayetano Morelos, municipio de Toluca, Estado de México.

El trabajo de investigación consistió inicialmente en el procesamiento de una muestra de carpas comunes (*Cyprinus carpio carpio*) que mostraron signos de enfermedad, para realizar un estudio de diagnóstico sanitario. Posteriormente, el trabajo contempla la implementación de procedimientos de virología (aislamiento viral e inoculación celular) y patología, el diseño de procesos de biología molecular (RT-PCR y secuenciación) y experimentos *in vitro* para caracterizar al agente involucrado en la infección.

### 6.1 Organismos vivos

En octubre del año 2015, se remitieron al laboratorio de sanidad acuícola del CIESA de la FMVZ de la UAEM, quince organismos de carpa común vivos de aproximadamente 250 grs para realizar un estudio de diagnóstico sanitario integral. Algunos de los peces que conformaron la muestra mostraron signos inespecíficos de enfermedad tales como moderada exoftalmía y distensión abdominal, y hemorragia en base de aletas. Los animales fueron capturados de manera aleatoria por pescadores de la Laguna de Tecocomulco, localizada a 17 km al noreste de Ciudad Sahagún en el Estado de Hidalgo, entre los 19° 53' 45" y 19° 49' 56" de latitud norte y 98° 20' 14" y 98° 26' 24" de longitud oeste, (Comisión de Cuenca de la Laguna de Tecocomulco, A.C., 2007). Se trata de una laguna somera donde la zona más profunda de la columna de agua puede alcanzar los 2.5 m (Novelo *et al.*, 2005).

De acuerdo a quienes remitieron los peces, en fechas previas o cercanas a cuando se remitió la muestra no se reportó alguna situación de enfermedad, mortalidad o anormalidad en la población de las distintas especies de peces que habitan la laguna. Así mismo, pobladores y pescadores desconocen si existe algún registro o antecedente de casos de enfermedad en peces del lugar.

#### 6.1.1 Obtención de muestras

Después del sacrificio mediante sobredosis de anestesia (240 mg/L tricaine methanesulfonate 222; Sigma), los peces se colocaron sobre una charola de disección con el vientre frente al recolector y la cabeza apuntando hacia la mano izquierda. Después de realizar la inspección externa y registrar las

observaciones y lesiones, se realizó una incisión en la línea media en dirección caudo-craneal, partiendo desde el orificio anal y dirigida hasta la comisura inferior del opérculo. Un segundo corte se realizó iniciando en el mismo punto de inicio del corte anterior y siguiendo en dirección dorso-craneal pasando por la línea lateral hacia la comisura lateral superior del opérculo con lo cual se permitió exponer los órganos internos; el fragmento del costado obtenido por los dos cortes fue eliminado.

Una vez expuestos los órganos internos se registraron las lesiones observadas y se obtuvieron las muestras adecuadas para cada uno de los procesos de laboratorio a que fueron sometidos para obtener un diagnóstico.

### **6.1.2 Aislamiento viral**

Aproximadamente 1 ml de fragmentos de hígado, bazo y riñón de los peces con presencia de hemorragias y adherencias fueron depositados en tubos Falcón de 15 ml conteniendo 9 ml de medio L-15 (Medium LEIBOVITZ'S Cat 11415-064, GIBCO BRL), las muestras fueron maceradas, centrifugadas y filtradas en membrana de 0.22 micras ( $\mu\text{m}$ ) para inoculación posterior en una monocapa de células EPC (*Epithelioma Papulosum Cyprini*) y BF-2 (*bluegill fry*) con  $\geq 90\%$  de confluencia. Tras ser inoculadas, las células se incubaron a  $20^{\circ}\text{C}$  durante siete días o hasta que manifestaron efecto citopático (CPE= cytopathic effect).

### **6.1.3 Confirmación del aislamiento viral**

El sobrenadante de las placas de cultivo celular (EPC y BF-2) que presentaron CPE, fue recuperado para una segunda inoculación, pero ahora utilizando monocapas con una confluencia de  $\geq 90\%$  de cuatro distintas líneas celulares: células EPC, BF-2, CHSE-214 (*Chinook Salmon Embryo-214*) y RTG (*Rainbow trout gonad-2*), cada placa fue inoculada a dos diluciones (1:10 y 1:100).

En el caso de células EPC, las muestras se inocularon en dos placas; una de estas se mantuvo a temperatura de  $20^{\circ}\text{C}$  y la segunda placa se mantuvo a  $25^{\circ}\text{C}$ . Las placas con células BF-2, CHSE-214 y RTG, se mantuvieron a una temperatura de  $20^{\circ}\text{C}$  y también se inocularon a dos diluciones (1:10 y 1:100).

### **6.3 Titulación Viral**

El título viral se obtuvo haciendo diluciones seriadas del virus estudiado (Reed y Muench, 1938). Para ello se colocó dentro de un tubo *ependorf*, 0,1 ml de la solución de virus en 0,9 ml de medio L-15, hasta llegar a la dilución  $10^{-8}$ . Después se agregó 0,1 ml de cada dilución a un pocillo de la microplaca de titulación que contenía una monocapa de células EPC (cada dilución se realizó seis veces), dejando pasar un máximo de 7 días para realizar la lectura de la placa y registrar presencia o ausencia de CPE y en cual dilución se presentó.

## 6.4 Microscopía electrónica

La microscopía electrónica para evidenciar la presencia de partículas virales en las células infectadas, se llevó a cabo en monocapas de células EPC cultivadas en placas de 6 pocillos. Las células se inocularon con sobrenadantes de cultivos con CPE positivo. A las 48 h post inoculación, se eliminó el medio de cultivo celular. Las monocapas se recogieron mediante raspado, se centrifugaron durante 1 hora a 2000 rpm, se fijaron en glutaraldehído (2,5% en tampón de cacodilato sódico 0,1 M, pH 7,4) y se fijaron posteriormente en tetróxido de osmio al 2% durante una hora. Las células se deshidrataron con concentraciones ascendentes de acetona y luego se incluyeron en resina epoxi (Epon 812, Electron Microscopy Sciences) y acetona. Se obtuvieron cortes semi finos (150  $\mu\text{m}$ ) utilizando un ultramicrotomo y se montaron en portaobjetos en contraste con azul de toluidina (Electron Microscopy Sciences). Una vez que se identificó el área de interés, se obtuvieron cortes finos (80  $\mu\text{m}$ ) y se montaron en rejillas de cobre en contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo (Electron Microscopy Sciences). Finalmente, se observaron las muestras utilizando un microscopio de transmisión de electrones Jeol 1010 a 60 kV.

## 6.4 Extracción de RNA y obtención de cDNA

A partir de 200  $\mu\text{l}$  de sobrenadante de cultivo celular, se extrajo el RNA total de cada muestra utilizando el kit Thermo Scientific Gene Jet Viral RNA/ Catalogo número k0821, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Posteriormente, se sintetizó el cDNA llevando a cabo una reacción de transcripción inversa mediante el kit comercial PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time, TAKARA, Japan) agregando por cada reacción 1ng de RNA total en un volumen final de 20  $\mu\text{l}$ .

## 6.5 Reacción de PCR para detección de SVCV

Se desarrolló un PCR semi-anidado utilizando el protocolo del Manual de diagnóstico de la OIE con modificaciones, utilizando el kit GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA) en un volumen total de reacción de 25  $\mu\text{l}$  con 200ng de cDNA como templado madre. Para obtener un fragmento de amplificación de 714 pb, se utilizaron los cebadores derivados de secuencias de la región codificante del gen de la glicoproteína de SVCV: VVPC F1: 5'-TCT-TGGAGC-CAA-ATA-GCT-CAR\*-R\*TC-3' y VVPC R2: 5'-AGA-TGG-TAT-GGA-CCC-CAA-TAC-ATH\*-ACN\*-CAY\*-3'. El programa de ciclado se realizó utilizando una modificación del método de Stone *et al.*, (2003), aplicando el siguiente perfil térmico: 1 min a 95°C, 1 min a 55°C, 1 min a 72°C con una extensión final de 10 minutos a 72°C.

El producto de amplificación obtenido se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa a 1,5% peso/volumen con Gel Red como intercalante. El producto obtenido de la primera amplificación fue sometido a una prueba semi-anidada

diseñada para amplificar un producto de PCR de 606 pb utilizando los primers: SVCF1: 5'-TCT-TGG-AGC-CAA-ATA-GCT-CAR\*-R\*TC-3' y SVCR4: 5'-CTGGGG-TTT-CCN\*-CCT-CAA-AGY\*-TGY\*-3'. Los productos del segundo PCR fueron purificados mediante el kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA), y se enviaron a secuenciar a MacroGen Korea (Seoul, Rep. Of Korea).

### **6.6 Análisis de secuenciación genómica**

Las secuencias obtenidas se analizaron mediante Blast NCBI ([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr\\_57232119](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_57232119)) para comparar la secuenciación del Rabdovirus aislado en los peces de Tecocomulco con otras secuencias de Rabdovirus de peces establecidas en el GenBank, y crear relaciones filogenéticas al identificar con cual secuencia está mayormente relacionado.

### **6.7 Análisis histopatológico**

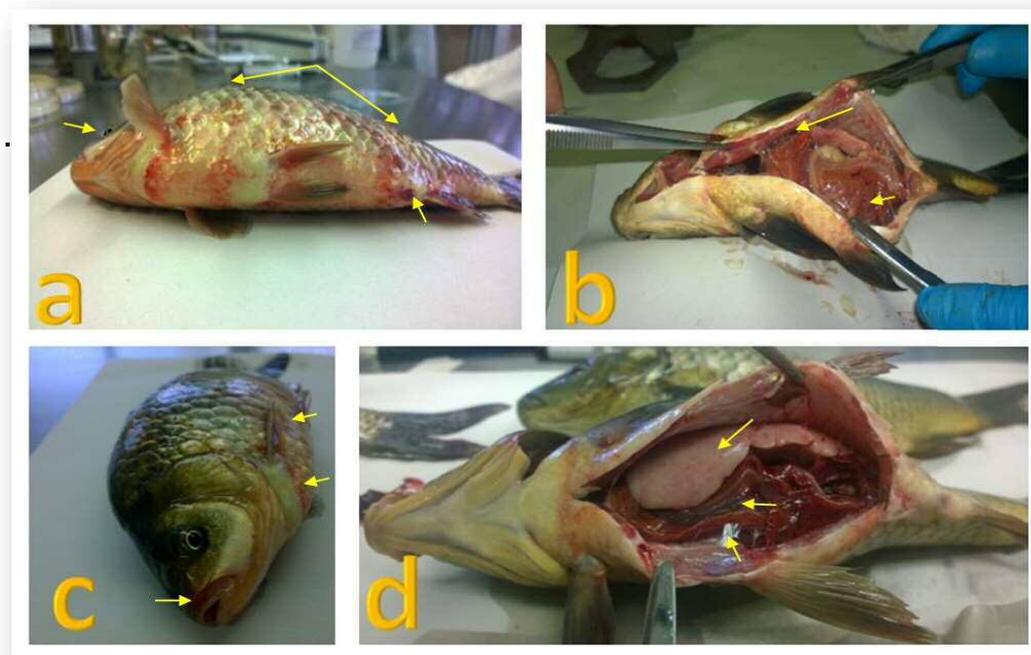
Fragmentos de hígado, bazo, riñón, corazón, branquias e intestino de los 15 peces fueron depositados en frascos conteniendo formalina amortiguada al 10% durante 24 horas, para posterior procesamiento e inclusión en parafina. La obtención de cortes histológicos de 3 a 5 µm fueron teñidos mediante la coloración de hematoxilina y eosina (H&E) para posterior interpretación histopatológica mediante un microscopio compuesto (Ortega *et. al.*, 2019).

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Registro de signos clínicos y toma de muestras

Los peces analizados ingresaron al laboratorio para una revisión de rutina, sin reporte de enfermedad o mortalidad. Sin embargo, al analizar externamente la muestra compuesta de 15 peces, mostraban lesiones y signos indicativos de cursar alguna enfermedad.

Durante la necropsia, en los peces se observó ligera exoftalmia, branquias pálidas, ligera distensión abdominal (figura 5a), hemorragias y áreas de necrosis en la base de aletas pectorales y pélvicas, hemorragias en boca y en mandíbula inferior, en área ventral del pedúnculo caudal y en áreas costales. Algunos peces presentaron áreas de necrosis superficial de piel con pérdida de escamas (Figura 5a y c). Internamente, algunos peces presentaron ascitis serosa moderada, formación de adherencias pleurales y entre órganos abdominales. Algunos peces manifestaron hemorragias difusas en cavidad celómica, esplenomegalia, ligera congestión de vejiga natatoria, renomegalia (Figura 5b y d).



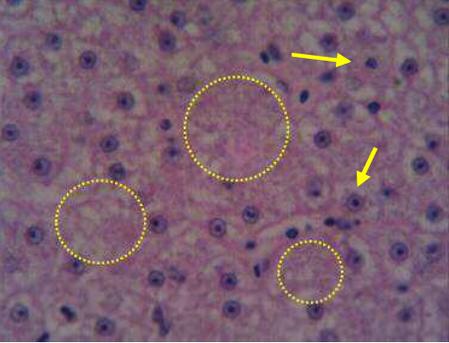
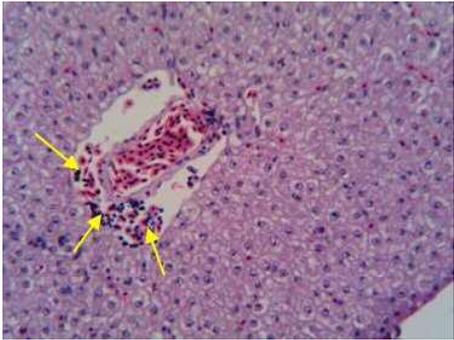
**Figura 5. Lesiones macroscópicas en carpa común (*Cyprinus carpio carpio*).** a) Distensión abdominal, exoftalmia y abultamiento de orificio anal. b) Adherencias entre órganos internos. c) Hemorragias alrededor de la boca y aletas. d) Esplenomegalia y formación severa de adherencias pleurales.

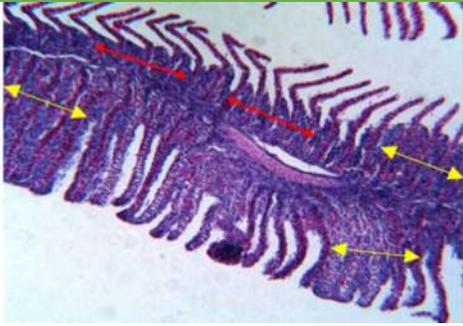
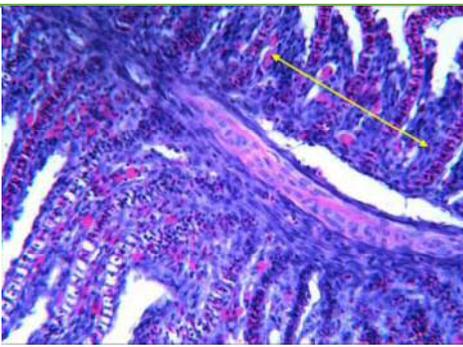
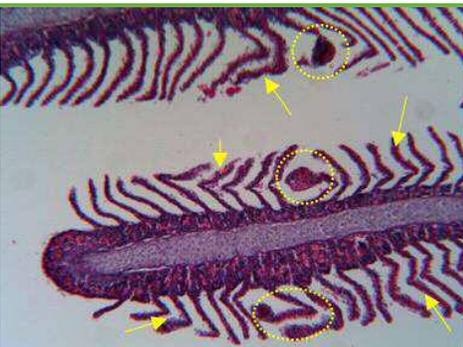
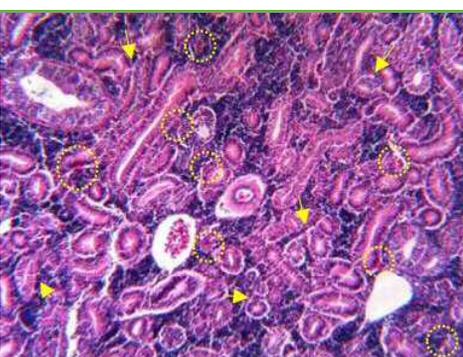
Las muestras de preparaciones húmedas para realizar un diagnóstico parasitológico demostraron presencia de *Gyrodactylus* spp. en piel y aletas y *Trichodina* spp. en piel y en branquias. En los órganos internos no se observaron agentes parasitarios.

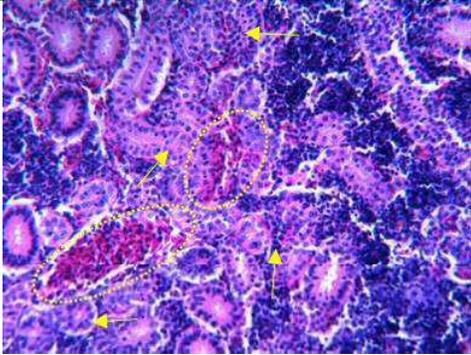
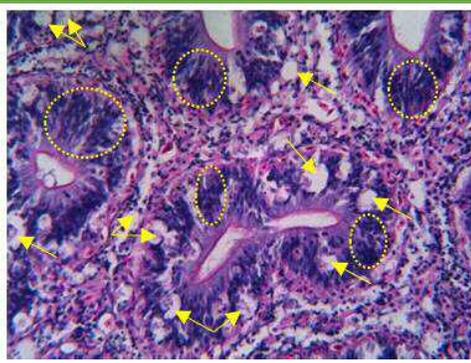
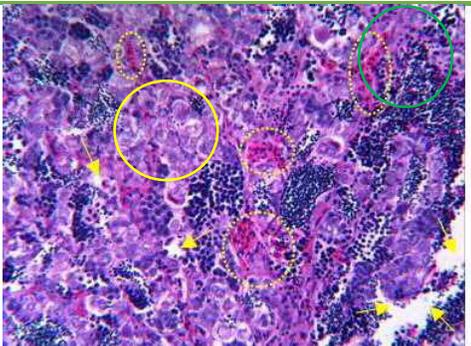
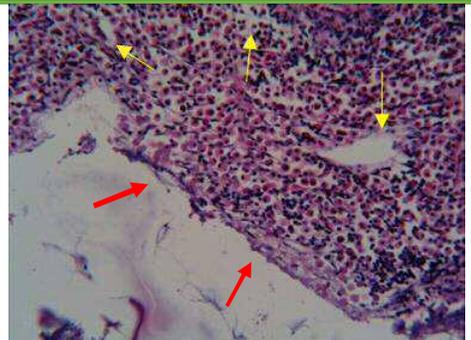
En improntas teñidas con Gram a partir de líquido ascítico y de los tejidos internos de los peces afectados con hemorragias no hubo evidencia de presencia de bacterias. Así mismo, no se obtuvo crecimiento de bacterias a partir de hígado, bazo y riñón.

### 7.2 Descripción histológica de tejidos

Las lesiones histológicas que se presentaron en los órganos de carpas (*Cyprinus carpio carpio*) afectadas por la infección de SVC, se describen en el Cuadro 8.

Órgano	Fotografía de la lesión	Descripción histopatológica
1. Hígado	 <p>630x (H&amp;E)</p>	Zonas con degeneración (Flechas) y necrosis de hepatocitos (círculos punteados).
2. Hígado	 <p>250x (H&amp;E)</p>	Hemorragias perivasculares en hígado (flechas).

<p>3. <b>Branquias</b></p>	 <p>100x (H&amp;E)</p>	<p>Hiperplasia interlamelar con fusión parcial de los filamentos secundarios (flechas amarillas); así mismo, se presenta hiperplasia basal (flechas rojas).</p>
<p>4. <b>Branquias</b></p>	 <p>250x (H&amp;E)</p>	<p>Hiperplasia interlamelar con fusión parcial de los filamentos secundarios (flecha doble).</p>
<p>5. <b>Branquias</b></p>	 <p>250x (H&amp;E)</p>	<p>Telangiectasia en los extremos distales de los filamentos branquiales (círculos punteados) con evidencia de sinequias (flechas).</p>
<p>6. <b>Riñón</b></p>	 <p>100x (H&amp;E)</p>	<p>Nefritis intersticial mononuclear difusa (flechas) con proliferación de melanomacrófagos (círculos punteados).</p>

<p>7. <b>Riñón</b></p>	 <p>250x (H&amp;E)</p>	<p>Se observa nefritis intersticial mononuclear, congestión y hemorragias (círculos punteados), degeneración tubular.</p>
<p>8. <b>Riñón</b></p>	 <p>250x (H&amp;E)</p>	<p>Degeneración y necrosis de túbulos renales (zona punteada), con extensa vacuolización (flechas).</p>
<p>9. <b>Bazo</b></p>	 <p>100x (H&amp;E)</p>	<p>Esplenitis mononuclear, degeneración y necrosis esplénica (círculo amarillo) y hemorragias (círculos punteados).</p>
<p>10. <b>Intestino</b></p>		<p>Enteritis ulcerativa granulomatosa (flechas rojas).</p>

**Cuadro 8. Lesiones observadas en órganos internos de *Cyprinus carpio carpio*, (muestra en estudio) y descripción histopatológica.**

### 7.3 Aislamiento inicial de SVCV

Los homogeneizados de riñón y bazo de los peces afectados mostraron efecto citopático (CPE) indicativo de presencia viral en las muestras analizadas; el CPE se manifestó entre las 24 y 48 hpi en las células EPC y después de 72 hpi en células BF-2. Este resultado indicó que las lesiones sistémicas observadas en las muestras de carpa comunes fueron causadas por un agente viral, lo cual inicialmente se confirmó mediante el análisis de microscopía electrónica, que reveló la abundancia de partículas virales en forma de bala, un rasgo estructural típico de rhabdovirus.

### 7.4 Crecimiento viral en diferentes líneas celulares, tiempo de supervivencia y resistencia al medio ambiente

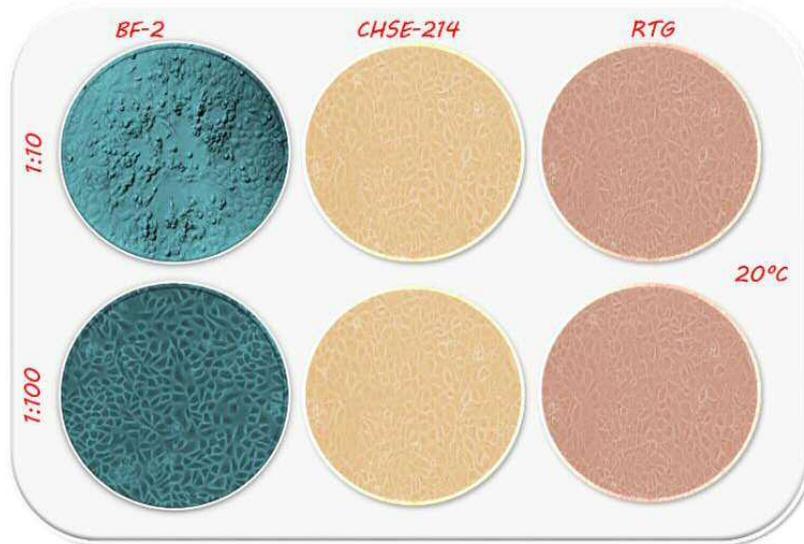
Tras la inoculación con el sobrenadante obtenido de los órganos de los peces de la muestra en una monocapa de células EPC, mantenidas a temperatura de 20°C y 25°C a dos concentraciones 1:10 y 1:100. Ambas placas mostraron CPE (efecto citopático). La placa incubada a 25°C mostro CPE a las 24 hpi, en ambas concentraciones. Al igual que la placa mantenida a 20°C, pero esta última lo manifestó a las 48 hpi, como se ilustra en la Figura 6.



**Figura 6. Placas de dos pocillos con células EPC, inoculadas con el aislado de SVCV obtenido en 2015. Ambas placas muestran CPE en ambas concentraciones.**

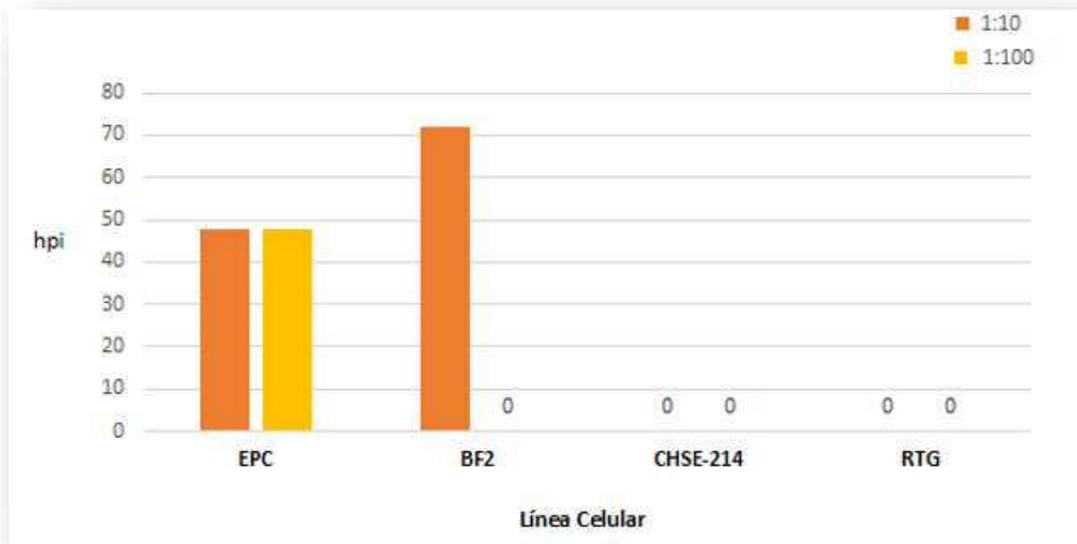
La Figura 7 representa los resultados observados de las placas de cultivo donde se inocularon tres distintas líneas celulares continuas de peces CHSE-214, RTG y BF-2. Cada línea celular se inoculó a dos concentraciones (1:10 y 1:100) y la placa se mantuvo incubando a 20°C.

En este caso, el CPE únicamente se presentó en las células BF-2 luego de 72 hpi en la concentración 1:10; para las demás células no se registró algún efecto.



**Figura 7. Placa de seis pocillos con células BF-2, CHSE-214 y RTG, inoculada con el aislado de SVCV obtenido en 2015. Solo hubo CPE en la línea celular BF-2, a las 72 hpi (placa de 6 pocos).**

Los resultados del crecimiento viral en las 4 distintas líneas celulares empleadas para el estudio de supervivencia del aislado de SVCV obtenido en 2015, mantenidas a temperatura de 20°C, se resumen en la Figura 8.



**Figura 8. Gráfica de resultados para el crecimiento viral registrado en las líneas celulares empleadas para el estudio de SVCV aislado de carpa común en 2015. En células EPC hubo crecimiento en ambas concentraciones; el CPE ocurrió después de 48 hpi. En células BF2 el CPE se observó a las 72 hpi solo en la concentración 1:10. Mientras que en células CHSE-214 y RTG-2, no se observó CPE en ninguna de las dos diluciones probadas**

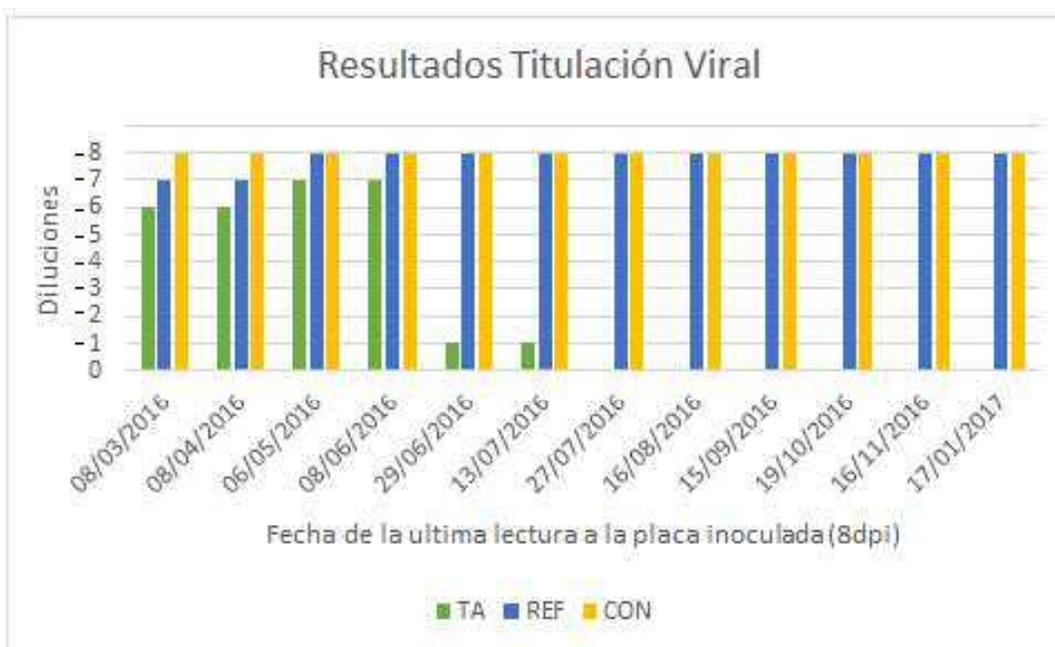
## 7.5 Titulación viral

En el estudio para registrar la supervivencia del aislado de SVCV que previamente había sido conservado a tres diferentes temperaturas (Temperatura Ambiente TA 25°C, Refrigeración REF 4°C y Congelación CON -80°C), se utilizaron células EPC en placas de 96 pocillos, cada placa albergo 8 diluciones, de cada una de las tres temperaturas en estudio. Se realizaron un total de 12 infecciones experimentales, realizadas en el periodo del mes de marzo 2016 a enero 2017 (11 meses) (Figura 9).

El registro del virus mantenido a TA (25°C), en las primeras dos fechas de infección (marzo y abril de 2016), mostro un CPE hasta la dilución  $10^{-6}$ , pero en la inoculación de los meses mayo y junio, se observó un aumento a la dilución  $10^{-7}$ . Sin embargo, para las dos subsecuentes inoculaciones realizadas (en junio y julio de 2016), solo se observó CPE en la dilución  $10^{-1}$ , dejando de infectar en la inoculación número 7 (27 de julio de 2016) (Figura 9).

Para el caso del virus mantenido en REF (4°C), solo en las dos primeras fechas de inoculación (marzo y abril de 2016) mostró un CPE en la dilución  $10^{-7}$ , pero en la fecha tres del estudio aumentó a la  $10^{-8}$  y se mantuvo así en las demás fechas siguientes de inoculación, hasta el término del estudio (Figura 9).

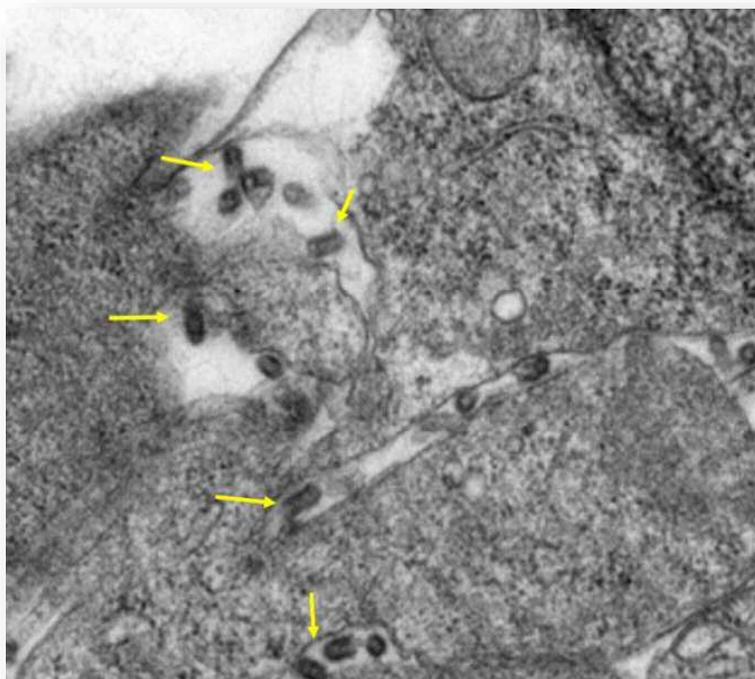
Por su parte el registro de virulencia para el virus mantenido a temperatura CON (-80°C) fue el más estable, desde la primera fecha de inoculación se observó un CPE hasta la dilución  $10^{-8}$ , y continuó así hasta el término del estudio.



**Figura 9. Gráfica de titulación viral en tres submuestras del aislado de SVCV conservado a tres diferentes temperaturas.** Los resultados registrados al inocular células EPC muestran que el registro más estable es el del aislado mantenido en congelación a -80°C.

## 7.6 Análisis de microscopía electrónica

En el análisis de las imágenes de microscopía electrónica realizado en células EPC, se lograron evidenciar claramente y en forma extracelular estructuras microscópicas con la típica forma “de bala”, característica de los Rhabdovirus (Figura 10).



**Figura 10.** Microfotografía electrónica en células EPC a 8 hpi, donde se visualizan las típicas partículas de tipo Rhabdovirus.

## 7.7 Reacción de RT – PCR para detección de SVCV

Los análisis del PCR semi-anidado realizados utilizando el material genómico del sobrenadante de cultivo de células EPC con efecto citopático, resultaron positivos para el supuesto SVCV. Del primer paso de la reacción de RT-PCR se obtuvo un producto de amplificación de un tamaño de 716 pb; mientras que para el proceso semi anidado, el fragmento de amplificación fue de 606 pb.

El análisis comparativo entre una secuencia parcial (426 pb) del producto de amplificación obtenido por MacroGen Inc. (Corea) y el de otras secuencias depositadas en GenBank reveló una identidad del 97% con la glicoproteína del SVCV, lo cual confirma al aislado obtenido de las muestras de las carpas analizadas en el laboratorio, como un miembro de SVCV.

Sobre la base del análisis filogenético de las secuencias parciales del gen de la glicoproteína del SVCV, el virus aislado de carpas de la Laguna de Tecocomulco se clasificó en el genogrupo Ia, relacionado con aislados de China.



Córdoba

Revista MVZ

ISSNe: 1909-0544



El suscrito editor de la **Revista MVZ Córdoba** de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Córdoba - Montería - Colombia

### CERTIFICA

1. Que el manuscrito "**Características de replicación y supervivencia del virus de viremia primaveral de la carpa (SVCV) aislado en México**".
2. Los autores del manuscrito antes referido son: Leticia Cañas L., Sandra Hernández-Dávila, Juan Carlos Vázquez-Chagoyan, Simón Martínez-Castañeda, Raúl Fajardo M, Benjamín Valladares-Carranza, César Ortega S.
3. Que el citado manuscrito se encuentra listado para ser publicado en la Revista MVZ Córdoba 25(3):Septiembre-Diciembre; 2020.
4. Esta certificación se expide por solicitud de los interesados en Montería, el día 30 de abril de 2020.

**MARCO GONZALEZ TOUS - M.V.Z., M.Sc.**  
Editor en Jefe - Rev.MVZ Córdoba

*Revista MVZ Córdoba*

Universidad de Córdoba Kilómetro 12 vía Ciénaga de Oro, Colombia  
<http://revistas.unicordoba.edu.co/index.php/revistamvz/index>

Find us: [SJR](#) [Scopus](#) [WoS](#) [Google Scholar](#) [Facebook](#) [Twitter](#) [Instagram](#) [Mendeley](#)  
[revistamvz@correo.unicordoba.edu.co](mailto:revistamvz@correo.unicordoba.edu.co)



Original

# Características de replicación y supervivencia del virus de viremia primaveral de la carpa (SVCV) aislado en México

Leticia Cañas L.<sup>1</sup> MVZ; Sandra Hernández-Dávila<sup>1</sup> Biól; Juan Carlos Vázquez-Chagoyan<sup>1</sup> Ph.D; Simón Martínez-Castañeda<sup>1</sup> Ph.D; Raúl Fajardo M<sup>1</sup> Ph.D; Benjamín Valladares-Carranza<sup>1</sup> Ph.D; César Ortega S<sup>1\*</sup> Ph.D.

<sup>1</sup>Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), Carretera Toluca-Atlacomulco Km. 15.5, CP 50200, Toluca, México.  
Correspondencia: [cortegas@uaemex.mx](mailto:cortegas@uaemex.mx)

Recibido: Diciembre 2019; Aceptado: Mayo 2020; Publicado: Agosto 2020.

## RESUMEN

**Objetivo.** Realizar el aislamiento del virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV) en ejemplares de carpa común (*Cyprinus carpio*), evaluar su crecimiento en diferentes tipos de células, así como la supervivencia viral a diferentes temperaturas. **Materiales y métodos.** Diez carpas de entre 400-500 gramos de una laguna del centro de México fueron procesadas para el diagnóstico de SVCV mediante aislamiento en cultivo de células y RT-PCR semianidado. El virus obtenido se inoculó en células EPC, BF-2, CHSE-214 y RTG-2 para determinar diferencias de crecimiento de SVCV. Además, se evaluó la supervivencia del virus conservado a temperatura ambiente (TA 20-25°C), refrigeración (REF 4°C) y congelación (CONG -80°C) hasta once meses. Los órganos internos se procesaron para análisis histológico. **Resultados.** Los peces analizados no presentaron signos externos sugestivos de enfermedad, pero interna e histopatológicamente se observaron lesiones sugestivas de infección sistémica. SVCV fue aislado en células EPC y BF-2 y confirmado por RT-PCR semianidado. SVCV únicamente indujo CPE en células EPC y BF-2 y fue negativo en RTG-2 y CHSE-214. El virus conservado a TA perdió viabilidad después de cuatro meses post infección (mpi), siendo total a seis mpi; mientras REF y CONG fueron estables durante los once meses de estudio. **Conclusiones.** La infección subclínica por SVCV fue confirmada en carpas que presentaron lesiones histológicas asociadas a esta infección. SVCV únicamente causó CPE en células EPC y BF-2 y el virus conservó su viabilidad a 4°C y -80°C hasta once meses; mientras que a TA se perdió en seis meses.

**Palabras clave:** *Cyprinus carpio*, peces, enfermedad, RT-PCR, infección, células (Fuente: AGROVOC).

## ABSTRACT

**Objective.** To perform the isolation of spring viremia of carp virus (SVCV) in common carp (*Cyprinus carpio*) and evaluate its growth in different cell types and viral survival at different temperatures. **Materials and methods.** Ten carps of between 400-500 grams of a lagoon in central Mexico were processed for diagnosis of SVCV by isolation in cell culture and by RT-PCR. The virus obtained was inoculated into EPC, BF-2, CHSE-214 and RTG-2 cells to determine differences in virus growth; the

### Como citar (Vancouver).

Cañas L., Hernández-Dávila S., Vázquez-Chagoyan JC, Martínez-Castañeda S, Fajardo MR, Valladares-Carranza B, Ortega SC. Características de replicación y supervivencia del virus de viremia primaveral de la carpa (SVCV) aislado en México. Rev MVZ Córdoba. 2020; 25(3):e1875. <https://doi.org/10.21897/mvz.1875>



©El (los) autor(es). Revista MVZ Córdoba 2020. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), que permite a otros distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de modo no comercial, siempre y cuando den crédito y licencien sus nuevas creaciones bajo las mismas condiciones.

ISSN: 1909-0944

## 8. DISCUSIÓN

Este trabajo formó parte de una investigación que describe la ocurrencia y confirmación de la viremia primaveral de la carpa (SVC) en carpas silvestres de la laguna de Tecocomulco en el Estado de Hidalgo, México. De acuerdo con una investigación bibliográfica, este registro corresponde al primer caso confirmado en el país de esta enfermedad inscrita en la lista de enfermedades importantes de la Oficina Internacional de Salud Animal (OIE). Los diferentes procesos de laboratorio realizados a las muestras trabajadas en este caso, además de permitir la confirmación de la presencia de este virus han permitido conocer también sus características genéticas y de replicación *in vitro*.

Inicialmente, los animales estudiados presentaron signos clínicos y lesiones inespecíficas indicativos de padecer alguna enfermedad; sin embargo, fueron remitidos al laboratorio únicamente para un análisis sanitario de rutina, sin reportar situación de anormalidad. De acuerdo con la historia clínica obtenida, al momento o en fechas anteriores recientes a cuando se obtuvieron los peces de la muestra remitida, en la laguna no había ocurrido algún proceso de anormalidad o mortalidad de los animales. Así mismo, los pescadores declaran que nunca se han presentado casos de enfermedad o mortalidad en las especies de peces que existen en la laguna.

En relación con lo anterior, si bien la laguna de Tecocomulco ha sido objeto de estudios de investigación, no existen antecedentes o publicaciones sobre estudios sanitarios; la mayoría de las investigaciones reportadas corresponden a análisis para evaluar los parámetros de calidad de agua (Delgadillo, 2012), de población de algas y otros organismos (Novelo *et al.*, 2005; Quiroz-Flores *et al.*, 2014; Rico-Sánchez *et al.*, 2014) o presencia de pesticidas (Aguilar-Jiménez 2007). Por tanto, es incierto conocer el impacto de probables patógenos y el SVCV en las distintas poblaciones de peces que existen en peces de la laguna.

La falta de reportes de casos de enfermedad o mortalidades de peces podría ser una consecuencia de la gran extensión que tiene la laguna de Tecocomulco (1,769 hectáreas) (Rico-Sánchez *et al.*, 2014) o un carácter asintomático de la infección (Ahne *et al.*, 2002). Sin embargo, también podría tener relación con el hecho de que, por considerar a la carpa como una especie de poca importancia económica en México, la mortalidad no haya sido registrada o atendida, aunado a la falta de técnicos o especialistas en enfermedades de peces por parte de la autoridad sanitaria oficial.

La detección de SVCV y otros virus de peces en animales asintomáticos también ha sido reportada (Fijan *et al.*, 1971; Ahne *et al.*, 2002), aunque por lo general el patógeno suele causar alta mortalidad en carpa común y en otras especies de peces (Ashraf *et al.*, 2016; Phelps *et al.*, 2019). En este sentido, no se conoce si otras especies o variedades de peces presentes en la laguna hayan padecido la enfermedad clínica o estén infectadas asintomáticamente, actuando como portadoras.

Debido a la falta de registros y controles de movilización de peces en el país no es claro si este caso se debe a la detección de una primera introducción del virus o si el virus ha estado presente de manera asintomática en la laguna. A este tiempo no es claro cuándo y cómo fue que el virus se introdujo a esta laguna. México es un país con fuerte comercio e importación de peces ornamentales, entre los cuáles se encuentran ciprínidos y carassidos (Zambrano & Macías-García 2000), que pueden ser especies susceptibles o portadoras de SVCV (Ahne *et al.*, 2002).

La carpa es una especie exótica, probablemente, antes de su introducción, en la laguna existieron peces nativos y anfibios; debido a que se trata de una laguna cerrada, es de suponer que el SVCV ha sido introducido junto con carpas sembradas, ya que la repoblación de peces ha sido una práctica común en México desde fines del siglo XIX (Tapia & Zambrano 2003, Wakida-Kusunoki & Amador-del-Ángel 2011), o bien existe la posibilidad de que la presencia del virus esté asociado con el arribó de las aves migratorias que podrían actuar como vectores-portadoras (Ahne *et al.*, 2002). En la laguna de Tecocomulco, existen alrededor de 120 especies de aves, 78 de las cuales son especies terrestres y 42 acuáticas; de estas últimas, 29 son migratorias (Gobierno del Estado de Hidalgo, 2003), provenientes de Norteamérica, en donde SVCV ha sido detectada en peces silvestres (Garver *et al.*, 2007) o de cultivo (OIE 2017a).

La SVC es una enfermedad septicémica caracterizada por manifestar hemorragias generalizadas que se derivan de los daños causados por el virus en el epitelio vascular; siendo los órganos diana el riñón, hígado y bazo, para la replicación viral, dando lugar a hemorragias y pérdida del equilibrio sal-agua (Gaafar *et al.* 1980; Wolf, 1988; Bowser *et al.*, 1980). En este sentido, los peces no manifestaron hemorragias externas severas que hicieran sospechar de esta enfermedad; sin embargo, durante la necropsia se observaron hemorragias en órganos de la cavidad abdominal junto con fibrosis y adherencias generalizadas, lo que sugirió la presencia de SVCV. Estas observaciones y las lesiones registradas a nivel histológico son similares a las que se han descrito en casos asociados a infección por SVCV (Hoffman, 2002), y aunque las lesiones no son específicas de SVC, aportan al diagnóstico diferencial. En este caso, la conclusión es apoyada por el hecho de que no se observó presencia o acción de agentes bacterianos o parasitarios en los peces analizados.

Las lesiones observadas durante la necropsia en las carpas hicieron sospechar un caso de SVC, por lo que se intentó el aislamiento en células EPC. Los cultivos de células manifestaron efecto citopático en menos de 48 hpi, demostrando alta infectividad. Ante la carencia de una prueba de diagnóstico confirmatoria de SVCV en el laboratorio, se propuso descartar que el CPE se debiera a la presencia del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), que es endémico en México (Ortega *et al.*, 2016; DOF, 2018). Para esto, además de volver a inocular el aislado en células EPC, también se inoculó en las células BF-2, RTG-2 y CHSE-214. Derivado de estos desafíos, el CPE únicamente se manifestó en células EPC y BF-2, siendo negativo en RTG-2 y CHSE-214, lo cual es coincidente con lo establecido en la literatura. Así mismo se realizó una

prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFAT) y de RT-PCR para IPNV los cuales también fueron negativos.

Otros análisis que permitieron la identificación y confirmación de SVCV, fue la evidencia a través de microscopio electrónico de partículas en forma de bala, típicas de los Rhabdovirus, observadas a nivel citoplasmático en células EPC. Una vez definida la morfología viral, el RT-PCR semi-anidado permitió confirmar que SVCV es el agente causante de las lesiones observadas en los peces de la muestra analizada. Se utilizaron los primers recomendados por la OIE (Stone *et al.*, 2003), los cuales han sido ampliamente utilizados en el diagnóstico y análisis de este virus (OIE, 2015c).

Al tratar de determinar las características del comportamiento *in vitro* del SVCV obtenido de la Laguna de Tecocomulco, se determinó que tal como refiere la literatura, la expresión de CPE ocurre de manera más rápida en las células EPC (OIE, 2019); seguido por las células BF-2. Sin embargo, este virus no crece en células CHSE-2014 y en RT-G. Con respecto a esta última línea celular, el resultado es contrario a lo informado por Vesely *et al.*, (2000), quien describió que el virus puede crecer en células RT-2 a títulos similares a los obtenidos en la línea EPC. Probablemente esta variación se deba a que se trata de aislados de distinto genotipo, por lo que sería deseable hacer un ensayo utilizando diferentes cepas de SVCV.

En el diagnóstico de SVC se han utilizado diferentes procedimientos los cuales han sido ampliamente analizados y clasificados, incluso por la OIE. Sin embargo, los resultados del diagnóstico en animales portadores pueden variar, entre otras razones por el órgano utilizado como muestra, la temperatura ambiental en donde se alojan los peces y el periodo de muestreo o etapa de viremia (Wakida-Kusunaki *et al.*, 2011). En este sentido, en el análisis para determinar la supervivencia del virus conservado a tres diferentes temperaturas durante un periodo aproximado de once meses, se demostró que el virus mantenido a temperatura ambiente tiene menor viabilidad que los mantenidos a temperatura de refrigeración y a -80°C, ya que en ambos tipos de muestra el virus se mantuvo infectivo, con títulos elevados y sostenidos hasta por más de los once meses. Este resultado puede ser una de las razones de que la autoridad sanitaria no haya logrado detectar la infección en peces tomados en la misma laguna, lo cual ocurrió meses después de que el laboratorio declaró la sospecha de SVCV en peces de la laguna.

Con relación a lo anterior, el laboratorio de diagnóstico (CIESA) detectó y reportó la sospecha de SVCV en la muestra remitida en octubre, mientras que el laboratorio oficial tomó muestras en el mes de febrero siguiente, cuando probablemente había disminuido la carga viral en los peces. En nuestro estudio, la confirmación del virus se realizó mediante RT-PCR y secuenciación subsecuente a través de RNA obtenido del virus obtenido en crecimiento de células EPC. Al respecto, la autoridad sanitaria únicamente utiliza el RT-PCR como prueba de diagnóstico, y en este caso, utilizo únicamente tejido branquial como muestra.

De acuerdo a la recomendación sanitaria internacional (OIE, 2017a), es posible suponer tres situaciones que pudieron influir en el resultado del estudio de diagnóstico realizado por la autoridad sanitaria: inicialmente no se realizó el diagnóstico cuando se notificó el caso en octubre de 2015; en segundo término, la OIE establece que para el diagnóstico de SVCV se debe utilizar más de una técnica de diagnóstico y que en animales portadores, idealmente se debe utilizar el cultivo de células, y tercero, las instancias sanitarias internacionales establecen que en animales portadores la muestra de elección es el tejido renal (OIE, 2019). Ante tales hechos, es deseable realizar un estudio en distintas épocas del año para establecer la situación temporal de la infección, considerando las especies de peces, anfibios y crustáceos que existen en la laguna, entre otros aspectos.

Las características genéticas de las cepas de SVCV muestran relación estrecha con su origen geográfico, y pueden dividirse en clados asiáticos y europeos (Miller *et al.*, 2007; Stone *et al.*, 2003). Así, el análisis filogenético de la glicoproteína parcial ubicó al aislado mexicano dentro del genogrupo Ia (Warg *et al.* 2007; Zhang *et al.*, 2009), que se relaciona con otros aislados procedentes de Asia, Reino Unido y las Américas (Dikkeboom *et al.*, 2004; Garver *et al.*, 2007; Stone *et al.*, 2003). Como se ha expuesto, a la fecha no se conoce el origen del SVCV obtenido de carpas de la laguna de Tecocomulco; sin embargo, es conocido que este y otros virus pueden diseminarse a través de peces infectados o de aves portadoras, y como se ha expuesto, la migración de aves desde Norteamérica ocurre en la laguna, y también es posible que se hayan presentado eventos de introducción de peces de consumo u ornamentales infectados.

Pese a haber logrado el aislamiento y confirmación de SVCV en la Laguna de Tecocomulco, en realidad no se conoce el nivel de mortalidad que el virus pudo causar en esta laguna, o incluso si el virus fue capaz de causar mortalidad. Es difícil conocer el impacto real del virus, pues se desconoce desde cuando está presente en la laguna y a que especies afecta actualmente (Fijan *et al.*, 1999).

La ocurrencia de este caso debe alertar a las autoridades para estar atentos a la ocurrencia de otros casos, por ejemplo, después del primer brote de SVCV en una granja de carpas koi en Norte América en 2002 hasta el año 2016 se han registrado ocho brotes subsecuentes de SVCV (Emmenegger *et al.*, 2016); por lo que este virus exótico para México representa un riesgo potencial para las especies de peces nativos y de cultivo.

## 9. CONCLUSIONES

Los procesos de diagnóstico e identificación realizados en una muestra de carpa común (*Cyprinus carpio carpio*) en octubre del año 2015, confirman la presencia del Virus de la Viremia Primavera de la Carpa en el país.

Se desconoce la manera en que el virus ingreso a la laguna de donde fueron obtenidos los peces de la muestra. Así mismo, no se conoce si el virus está presente en otros cuerpos de agua del país.

El análisis filogenético clasificó al aislado mexicano dentro del genogrupo 1a, relacionado con aislados de Asia, Reino Unido y las Américas.

El virus de SVCV pierde su supervivencia a los 4 meses a temperatura ambiente (25°C); mientras que conservado a 4°C y -80°C, se mantiene infectivo hasta por 10 meses.

No se determinó el o los efectos que el virus ha podido provocar en la salud de los peces, en el ambiente.

## 10. RECOMENDACIONES

Estudiar la prevalencia de SVCV en la propia laguna y en otras zonas del país.

Realizar un estudio para determinar las especies de peces afectadas con la infección de SVCV.

Investigar las posibles vías de llegada de SVCV a la laguna.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Ashraf U, Lu Y, Lin L, Yuan J, Wang M, Liu X. Spring viraemia of carp virus: recent advances. *J Gen Virol.* 2016; 97(5):1037-1051. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000436>
2. Adel, H. K.; Moigan, B.; Zarrin, S. & Bahram, K. (2008). The First Report of Spring Viraemia of Carp in Some Rainbow Trout Propagation and Breeding by Pathology and Molecular Techniques in Iran, 2013. *Science Alert.* All Rights Reserved. *Asian Journal of Veterinary Advances.* 3 (4): 263-268. Islamic Azad University of Iran, Theran.
3. Adams, M.J., Lefkowitz, E.J., King, A.M.Q. and Cartens, E.B., (2014) Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2014). *Archives of Virology* 159, 2831-2841.
4. Ahne W, Bjorklund HV, Essbauer S, Fijan N, Kurath G, Winton JR (2002) Spring viremia of carp (SVC). *Dis Aquat Org* 52:261–272.
5. Ahne, W. (1982a) Untersuchungen zur Tenazität der Fischviren. *Fortschritte in der Veterinärmedizin* 35, 305–309.
6. Ahne, W. (1978) Untersuchungsergebnisse über die akute Form der Bauchwassersucht (Frühlingsvirämie) der Karpfen. *Fischwirt* 28, 46–47.
7. Ahne, W. (1985a) *Argulus foliaceus* L. and *Piscicola geometra* L. as mechanical vectors of spring viraemia of carp virus (SVCV). *Journal of Fish Diseases* 8, 241–242.
8. Ahne, W. (1985b) Viral infection cycles in pike (*Esox lucius* L.). *Journal of Applied Ichthyology* 1, 90–91.
9. Aguilar-Martínez, J. (2007). Determinación de pesticidas organoclorados en *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758 del lago de Tecocomulco, Hidalgo. Bachelor Dissertation, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo-UAEH, México.
10. Arredondo- Figueroa, J.L., 1983. Especies acuáticas de importancia nutricional, introducidas en México. *Biótica* 8(2): 175-199.
11. Amend DF, Yasutake WT, Mead RW (1969) A haematopoietic virus disease of rainbow trout and sockeye salmon. *Trans Am Fish Soc* 98:796–804
12. Basic A., Schachner O., Bilic I. & Hess M. (2009). Phylogenetic analysis of spring viraemia of carp virus isolates from Austria indicates the existence of at least two subgroups within genogroup Id. *Dis. aquat. Org.*, 85, 31–40.
13. Baudouy, A.-M., Danton, M. and Merle, G. (1980a) Experimental infection of susceptible carp fingerlings with spring viremia of carp virus, under

- wintering environmental conditions. In: Ahne, W. (ed.) Fish Diseases. Third COPRAQ-Session. Springer, Berlin, pp. 23–27.
14. Baudouy, A.-M., Danton, M. and Merle, G. (1980b) Virémie printanière de la carpe. Résultats de contaminations expérimentales effectuées au printemps. *Annales de Recherches Vétérinaires* 11, 245–249.
  15. Baudouy, A.-M., Danton, M. and Merle, G. (1980a) Experimental infection of susceptible carp fingerlings with spring viremia of carp virus, under wintering environmental conditions. In: Ahne, W. (ed.) Fish Diseases. Third COPRAQ-Session. Springer, Berlin, pp. 23–27. Baudouy, A.-M., Danton, M. and Merle, G. (1980b) Virémie printanière de la carpe. Résultats de contaminations expérimentales effectuées au printemps. *Annales de Recherches Vétérinaires* 11, 245–249. Baudouy, A.-M., Danton, M. and Merle, G. (1980c) Virémie printanière de la carpe: étude expérimentale de l'infection évoluant à différentes températures. *Annales de l'Institut Pasteur/Virologie* 131E, 479–488. Baudouy, A.-M., Danton, M. and Merle, G. (1980c) Virémie printanière de la carpe: étude expérimentale de l'infection évoluant à différentes températures. *Annales de l'Institut Pasteur/Virologie* 131E, 479–488.
  16. Békési, L. and Csontos, L. (1985) Isolation of spring viraemia of carp virus from asymptomatic broodstock carp, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Fish Diseases* 8, 471–472.
  17. Behera, T., and P. Swain. 2012. "Antigen Adsorbed Surface Modified Poly-EpsilonCaprolactone Microspheres Stimulates Both Adaptive and Innate Immune Response in Fish." *Vaccine* 30:5278–84.
  18. Biacchesi S, M, Tholouze (2000). Recovery of NV Knockout Infections hematopoietic necrosis virus expressing foreign genes. *Journal of Virology*
  19. Bucke D, Finlay J (1979) Identification of spring viremia in carp (*Cyprinus carpio* L) in Great Britain. *Vet Rec* 104:69–71
  20. Björklund HV, Olesen NJ, Jorgensen PEV (1994) Biophysical and serological characterization of rhabdovirus 903/87 isolated from European lake trout *Salmo trutta lacustris*. *DisAquatOrgan* 19:21–26
  21. Bowser, P.R., Martineau, D., and Wooster, G.A., 1980, Seasonal prevalence of skin tumors from wallaye (*Stizostedion vitreum*) from Oneida Lake, New York, *J. Wild. Dis.* 24:292.
  22. Cipriano, R.C., Bowser, P.R., Dove, A., Goodwin, A. and Puzach, C. (2011) Prominent emerging diseases within the United States. In: Bridging America and Russia with Shared Perspectives on Aquatic Animal Health. Proceedings of the Third Bilateral Conference between Russia and the United States, 12–20 July, 2009 Shepherdstown, W V. Khaled bin Sultan Living Oceans Foundation, Landover, Maryland, pp. 6–17.
  23. Cieslak M., Wahli T., Diserens N., Haenen O.L.M. & Schutze H. (2017). Phylogeny of the infectious hematopoietic necrosis virus in European aquaculture. *PloS one*, 12 (9), e0184490.

24. Comisión de Cuenca de la Laguna de Tecocomulco, A.C., 2007. Informe Anual. Disponible en: [http://www.conagua.gob.mx/DLHgo07/contenido/Documentos/Informe\\_Anual\\_CCLT\\_2007.pdf](http://www.conagua.gob.mx/DLHgo07/contenido/Documentos/Informe_Anual_CCLT_2007.pdf).
25. CONAPESCA. Anuario estadístico de acuicultura y pesca 2017. [internet]. México: Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca, Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación. Diciembre 2017. [consultado 2019 junio 21]. 300 p. Disponible en [https://www.conapesca.gob.mx/work/sites/cona/dgppe/2017/ANUARIO\\_ESTADISTICO\\_2017.pdf](https://www.conapesca.gob.mx/work/sites/cona/dgppe/2017/ANUARIO_ESTADISTICO_2017.pdf)
26. Copyright © 2017, International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Disponible en: <http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>
27. Clark, H. R., and Soriano, E. Z., 1974, Fish rhabdovirus replication in cell culture: new system for the study of rhabdovirus-cell interaction in which the virus and cell have different temperature optima, *Infect. Immunity* 10, 180.
28. Chen Z.Y., Liu H., Li Z.Q. & Zhang Q.Y. (2008) Development and characterization of monoclonal antibodies to spring viraemia of carp virus. *Veterinary Immunology & Immunopathology* 123, 266–276.
29. Delgadillo, A. (2012). Determinación de parámetros fisicoquímicos, estado eutrófico y metales pesados de la laguna de Tecocomulco, Hidalgo; identificación de compuestos quelantes de Hydrocotyle ranunculoides L.f. PhD Dissertation, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
30. Diario Oficial de la Federación de México. ACUERDO mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos [internet]. México: Secretaría de Gobernación, 2018 noviembre [consultado 2019 junio 21]. 15 p. Disponible en [https://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5545304&fecha=29/11/2018](https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5545304&fecha=29/11/2018)
31. Dixon PF, Longshaw CB (2005), Assessment of commercial test kits for identification of spring viraemia of carp virus. *Dis Aquat Organ* 67:25-29
32. Dixon P.F., Hattenberger-Baudouy A.M. & Way K. (1994) Detection of carp antibodies to spring viraemia of carp virus by a competitive immunoassay. *Diseases of Aquatic Organisms* 19, 181–186.
33. Dietzschold, B., Rupprecht, C. E., Fang Fu, Z., and Koprowski, H. (1996). Rhabdoviruses. In "Fields Virology" (B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman, and S. E. Straus, eds.), 3rd ed., pp. 1137-1159. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA.
34. Dikkeboom, A.L., Radi, C., Toohey-Kurth, K., Marcquenski, S.V., Engel, M. et al. (2004) First report of spring viremia of carp virus (SVCV) in wild

- common carp in North America. *Journal of Aquatic Animal Health* 16, 169–178.
35. Dorson M, Torchy C, Chilmonczyk S, de Kinkelin P, Michel C (1984) A rhabdovirus pathogenic for perch, *Perca fluviatilis* L.: isolation and preliminary study. *J Fish Dis* 7:241–245
  36. Emmenegger, E. J., Sanders, G. E., Conway, C.M., Binkowski, F. P., Winton, J. R., & Kurath, G. (2016). Experimental infection of six North American fish species with the North Carolina strain of spring viremia of carp virus. *Aquaculture*, 450, 273–282. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.07.007>
  37. Enzmann P.J., Kurath G., Fichtner D. & Bergmann S.M. (2005). Infectious hematopoietic necrosis virus: Monophyletic origin of European IHNV isolates from North-American genogroup M. *Dis. Aquat. Org.*, 66, 187–195.
  38. OIE (2012) Código Sanitario para los Animales acuáticos, 16a ed. OIE, París. Available from URL: <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/código-acuático/acceso-en-línea>
  39. FAO Fisheries and Aquaculture Circular #1140 Word Aquaculture 2015: A brief overview
  40. Fijan N, Petrinc Z, Sulimanovic D, Zwillenberg LO (1971) Isolation of the causative agent from the acute form of infectious dropsy of carp. *Veterinarski Archiv (Zagreb)* 41:125–138
  41. Fijan N. (1999) Spring viremia of carp and other viral diseases and agents of warm water fish. *Fish diseases and disorders* P.T.K. Woo. London, CAB International. 3:177-244.
  42. Frerichs GN, Millar SD, Roberts RJ (1986) Ulcerative rhabdovirus in fish in South-East Asia. *Nature* 322:216
  43. Garver K.A., Batts W.N. & Kurath G. (2006). Virulence comparisons of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) U and M genogroups in sockeye salmon and rainbow trout. *J. Aquat. Anim. Health*, 18, 232–243. doi: 10.1577/h05-038.
  44. Garver, K.A., Dwilow, A.G., Richard, J., Booth, T.F., Beniac, D.R. et al. (2007) First detection and confirmation of spring viraemia of carp virus in common carp, *Cyprinus carpio* L., from Hamilton Harbour, Lake Ontario, Canada. *Journal of Fish Diseases* 30, 665–671.
  45. Gobierno del estado de Hidalgo, Consejo Estatal de Ecología (2003). Ficha Informativa de los Humedales de Ramsar: Laguna de Tecocomulco. 29 de septiembre de 2003. Retrieved from [http://ramsar.conanp.gob.mx/docs/sitios/FIR\\_RAMTSAR/Hidalgo/Laguna%20de%20Tecocomulco/LAGUNA\\_DE\\_TECOCOMULCO\\_FIR.pdf/](http://ramsar.conanp.gob.mx/docs/sitios/FIR_RAMTSAR/Hidalgo/Laguna%20de%20Tecocomulco/LAGUNA_DE_TECOCOMULCO_FIR.pdf/) (accessed 28 March 2018).

46. Goodwin AE, Merry GE (2011a) Mortality and carrier status of bluegills exposed to viral hemorrhagic septicemia virus genotype IVb at different temperatures. *J Aquat Anim Health* 23:85-91.
47. Goodwin, A.E. (2003) Differential diagnosis: SVCV vs KHV in koi. *Fish Health Newsletter, American Fisheries Society, Fish Health Section* 31, 9–13.
48. Horvath, L. (1986). Carp oogenesis and the environment. In: R. Billard & J. Marcel (eds.), *Aquaculture of Cyprinids*, 2–6 September 1985, Evry, France. INRA, Paris, France. pp. 109–117.
49. Horvath, L., Tamas, G. & Seagrave, C. 1992. *Carp and Pond Fish Culture*. Fishing News Books, Blackwell Scientific Publications Ltd., UK, 154 pp.
50. Hoole, D., Bucke, D., Burgess, P. & Wellby, I. 2001. *Diseases of Carp and other Cyprinid Fishes*. Fishing News Books, Blackwell.
51. Hoffmann B, Schutze H, Mettenleiter TC (2002) Determination of the complete genomic sequence and analysis of the gene products of the virus of Spring Viremia of Carpa MillerMA, LavineCL, KlasSD, PfefferLM, WhittMA (2004) Recombinant replication restricted VSV as an expression vector for murine cytokines. *Protein Expr Purif* 33:92–103 fish rhabdovirus. *Virus Res* 84:89–100
52. Howatson, A. F., 1970, Vesicular stomatitis and related viruses, *Adv. Virus Res.* 16, 195.
53. Hulata, G. (1995). A review of genetic improvement of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) and other cyprinids by crossbreeding, hybridization and selection. *Aquaculture*, 129:143–155.
54. Jensen MH (1963) Preparation of fish tissues for virus research. *Bull Off Int Epizoot* 59:131–134
55. Jeremic, S., Ivetic, V. and Radosavljevic, V. (2006) Rhabdovirus carpio as a causative agent of disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*-Walbaum). *Acta Veterinaria (Beograd)* 56, 553–558.
56. Jensen NJ, Bloch B, Larsen JL (1979) Theulcus-syndrome in cod (*Gadus morhua*): III. A preliminary virological report. *Nord Vetmed* 31:436–442
57. Jensen Mh (1965) Research on the virus of Egtved disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 126, 422-426.
58. Jeney, Zs. & Jeney, G. (1995). Recent achievements in studies on diseases of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture*, 129:397–420.
59. Johansson T., einer-jensen K., Batts W.N., Ahrens P., Björklund C., Kurath G., Björklund H. & Lorenzen N. (2009). Genetic and serological typing of European infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) isolates. *Dis. Aquat. Org.*, 86, 213–221.

60. Jorgensen PEV, Olesen NJ, Ahne W, Wahli T, Meier W (1993) Isolation of a previously un described rhabdovirus from pike *Esox lucius*. *Dis Aquat Organ* 16:171–179
61. Johnson, M. C., B. E. Simon, C. H. Kim, and J. A. Leong. 2000. Production of recombinant snakehead rhabdovirus: the NV protein is not required for viral replication. *J. Virol.* 74:2343–2350
62. Kasornchandra J, Engelking HM, Lannan CJ, Rohovec JS, Fryer JL (1992) Characteristics of three rhabdoviruses from snakehead fish (*Ophicephalus striatus*). *Dis Aquat Organ* 13:89–94
63. Kimura T, Yoshimizu M, Gorie S (1986) A new rhabdovirus isolated in Japan from cultured hirame (Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*) and ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Dis Aquat Organ* 1:209–217
64. Kolodziejek J., Schachner O., Durrwald R., Latif M. & Nowotny N. (2008). “Mid-G” region sequences of the glycoprotein gene of Austrian infectious hematopoietic necrosis virus isolates form two lineages within European isolates and are distinct from American and Asian lineages. *J. Clin. Microbiol.*, 46, 22–30.
65. Koski P, Hill BJ, Way K, Neuvonen E, Rintamäki P (1992) A rhabdovirus isolated from Brown trout (*Salmo trutta lacustris* (L)) with lesions in parenchymatous organs. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 12:177–180
66. Kurath, G., and Leong, J. C., 1985, Characterization of infectious hematopoietic necrosis virus mRNA species reveals a nonvirion rhabdovirus protein, *Viral.* 53:462.
67. Kurath, G., Ahem, K. G., Pearson, G. D., and Leong, J. c., 1985, Molecular cloning of the six mRNA species of infectious hematopoietic necrosis virus, a fish rhabdovirus, and gene order determination by R loop mapping, *J. Virol.* 53:469. Kurilla
68. Liu H, Gao L, Shi X, Gu T, Jiang Y, Chen H (2004) Isolation of spring viraemia of carp virus (SVCV) from cultured koi (*Cyprinus carpio koi*) and common carp (*C. carpio carpio*) in PR China. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 24: 194–202
69. Liu L., Li Q., Lin L., Wang M., Lu Y., Wang W., Yuan J., Li L. & Liu X. (2013) Proteomic analysis of epithelioma papulosum cyprini cells infected with spring viremia of carp virus. *Fish & Shellfish Immunology* 35, 26–35
70. Lima P.C., Harris J.O. & Cook M. (2013) Exploring RNAi as a therapeutic strategy for controlling disease in aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology* 34, 729–743.
71. Lot, A.; A. Novelo, M. Olvera, y P. Ramírez- García, (1999). Catálogo de angiospermas acuáticas de México: hidrófitas estrictas emergentes, sumergidas y flotantes. Cuadernos 33. Instituto de Biología, UNAM. México. 161 pp.

72. Lot, A., (2005). "Vegetación Acuática de la Laguna de Tecocomulco". En: Huízar, R.; E. Jiménez, y C. Juárez. Eds. La Laguna de Tecocomulco, Geo-Ecología de un Desastre. Publicación Especial 3. Instituto de Geología, UNAM. México. pp. 141-147.
73. Malsberger RG, Lautenslager G (1980) Fish viruses: rhabdovirus isolated from a species of the family Cichlidae. *FishHealthNews*9:1-2
74. Misk, E., Garver, K.A., Nagy, E., Isaacs, S., Tubbs, L. et al. (2016) Pathogenesis of spring viremia of carp virus in emerald shiner *Notropis atherinoides* Rafinesque, fathead minnow *Pimephales promelas* Rafinesque and white sucker *Catostomus commersonii* (Lacepede). *Journal of Fish Diseases* 39, 729-739.
75. Morzunov S.P., Winton J.R. & Nichol S.T. (1995). The complete genome structure and phylogenetic relationship of infectious hematopoietic necrosis virus. *Virus Res.*, 38, 175-192.
76. Murphy, F. A. (1996). Virus taxonomy. In "Fields Virology" (B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, R. M., Chanock, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman, and S. E. Straus, eds.), 3rd ed., pp. 15-58. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA. Murphy.
77. McAllister, R. M., Nelson-Rees, W. A., Johnson, E. Y., Rongey, R. W., and Gardner, M. B., 1971, Disseminated rhabdomyosarcomas formed in kittens by cultured human rhabdomyosarcoma cells, *J. Natl. Cancer Inst.* 47, 603.
78. McAllister, R. M., Nicholson, M., Gardner, M. B., Rongey, R. W., Rasheed, S., Sarma, P. S., Huebner, R. J., Hatanaka, M., Oroszlan, S., Gilden, R. V., Kabigting, A., and Vernon, L., 1972, C-type virus released from cultured human rhabdomyosarcoma cells, *Nat. New Biol.* 235, 3.
79. Novelo, E., Montejano, G., Cantoral, E., & Tavera, R. (2005). Las Algas de la Laguna de Tecocomulco. In R. Huízar, E. Jiménez, & C. Juárez (Eds.), *La Laguna de Tecocomulco, Geo-Ecología de un Desastre* (pp. 131-140). México: Publicación Especial 3, Instituto de Geología, UNAM.
80. OIE (World Organization for Animal Health) (2017a). Spring viraemia of carp. *Aquatic Animal Health*. Retrieved from [www.oie.int/en/standardsetting/aquaticcode/accessonline/?htmlfile=chapitre\\_svc.Htm](http://www.oie.int/en/standardsetting/aquaticcode/accessonline/?htmlfile=chapitre_svc.Htm) (accessed 18 January 2018).
81. OIE (World Organization for Animal Health) (2017b). Manual of diagnostic tests for aquatic animals. Retrieved from [www.oie.int/international-standard-setting/aquatic-manual/](http://www.oie.int/international-standard-setting/aquatic-manual/) (accessed 18 January 2018).
82. OIE. Spring viraemia of carp, *Aquatic Animal Health Code*. [en línea]. World Organization for Animal Health: Paris; 2019. [Acceso 18 Junio 2019]. URL disponible en: URL disponible

en: [https://www.oie.int/en/standard-setting/aquatic-code/access-online/?htmfile=chapitre\\_svc.htm](https://www.oie.int/en/standard-setting/aquatic-code/access-online/?htmfile=chapitre_svc.htm)

83. Obregón, F. 1961. Cultivos de la Carpa seleccionada en México. Tercera edición. Banco Nacional de Crédito Ejidal, Secretaria de Agricultura y Ganadería, México, D.F. 87 p.
84. Ortega C, Valladares B, Arguedas D, Vega F, Montes de Oca R, Murray A. Distribution of Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) Based on Surveillance Programs in Freshwater Trout Farms of Mexico. *J Aquat Anim Health*. 2016; 28(1):21-26. <https://doi.org/10.1080/08997659.2015.1131757>
85. Ortega C, Cañas-Lopez L, Irgang R, Fajardo R, Poblete-Morales M, Valladares-Carranza B, et al. First detection of spring viraemia of carp virus in common carp (*Cyprinus carpio* L.) affected by a septicemic disease in Mexico. *J Fish Dis*. 2019; 42(5):667-675.
86. Osadchaya YF, Nakonechnaya MG (1981) Rhabdovirus salmonis, the cause of a new disease in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J Ichthyol* 21:113–121
87. Pfeil-Putzien, C. (1978) Experimentelle Übertragung der Frühjahrsvirämie (spring viraemia) der Karpfen durch Karpfenläuse (*Argulus foliaceus*). *Zentralblatt für Veterinärmedizin, Reihe B* 25, 319–323.
88. Peters, F. and Neukirch, M. (1986) Transmission of some fish pathogenic viruses by the heron, *Ardea cinerea*. *Journal of Fish Diseases* 9, 539–544.
89. Phelps N, Armien A, Mor S, Goyal S, Warg J, Bhagyam R, Monahan T. Spring Viremia of Carp Virus in Minnehaha Creek, Minnesota. *J Aquat Anim Health*; 2012; 24(4):232-237. <https://doi.org/10.1080/08997659.2012.711267>
90. Pfeil-Putzien, C. and Baath, C. (1978) Nachweis einer Rhabdovirus-carpio-Infektion bei Karpfen im Herbst. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 91, 445–447.
91. Quiroz-Flores, A., Ramírez-García, P., & Lot Helgueras, A. (2014). Variación anual de la biomasa de *Nymphoides fallax ornduff* (menyanthaceae) en la laguna de Tecocomulco, Hidalgo, México. *Polibotánica*, 37, 93–108.
92. Reed L y H Muench (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hyg* 27, 493-497.
93. Rico-Sánchez, A., Rodríguez-Romero, A., López-López, E., & Sedeño Díaz, J. (2014). Patrones de variación espacial y temporal de los macroinvertebrados acuáticos en la Laguna de Tecocomulco, Hidalgo (México). *Revista De Biología Tropical*, 62, 81–96. <https://doi.org/10.15517/rbt.v62i0.15780>

94. Sanders, G.E., Batts, W.N. and Winton, J.R. (2003) Susceptibility of zebrafish (*Danio rerio*) to a model pathogen, spring viremia of carp virus. *Comparative Biochemistry and Physiology – Part C: Toxicology and Pharmacology* 53, 514–521.
95. Sano T (1976) Viral diseases of cultured fishes in Japan. *Fish Pathol*10:221–226
96. Sano T, Nishimura T, Okamoto N, Fukada H (1977a) Studies on viral diseases of Japanese fishes.VII. A rhabdovirus isolated from European eel *Anguilla anguilla*. *Bull Jpn Soc Sci Fish*43:491–495.
97. Saleh M., Soliman H., Schachner O. & El-Matbouli M. (2012) Direct detection of unamplified spring viraemia of carp virus RNA using unmodified gold nanoparticles. *Diseases of Aquatic Organisms* 100,3 –10
98. Soliman, M.K., Aboeisa, M.M., Mohamed, S.G. and Saleh, W.D. (2008) First record of isolation and identification of spring viraemia of carp virus from *Oreochromis niloticus* in Egypt. In: Eighth International Symposium on Tilapia in Aquaculture. Proceedings of the ISTA 8, October 12–14, 2008, Cairo, Egypt. Final Papers Submitted to ISTA 8, pp. 1287–1306.
99. Smail DA (1999). Viral hemorrhagic septicaemia in viral, Bacterial and Fungal Infections, pp.123-147. Edited by P.T.W. Woo & D.V. Bruno. Wallingford, UK: CAB International.
100. Snow M. y DA. Smail (1999). Experimental Susceptibility of turbot *Scophthalmus maximus* to viral haemorrhagic septicaemia virus isolated from cultivated turbot. *Dis. Aquat. Org.* 38, 163-168.
101. Stone, D.M., Ahne, W., Denham, K.D., Dixon, P.F., Liu, C.T.Y. et al. (2003) Nucleotide sequence analysis of the glycoprotein gene of putative spring viraemia of carp virus and pike fry rhabdovirus isolates reveals four genogroups. *Diseases of Aquatic Organisms* 53, 203–210.
102. Stone, D.M., Kerr, R.C., Hughes, M., Radford, A.D. and Darby, A.C. (2013) Characterisation of the genomes of four putative vesiculoviruses: tench rhabdovirus, grass carp rhabdovirus, perch rhabdovirus and eel rhabdovirus European X. *Archives of Virology* 158, 2371–2377.
103. Shope, R. E., 1973, Rabies virus antigenic relationships, in "The Natural History of Rabies" (G. M. Baer, ed.), Academic Press, New York.
104. Tapia, M., & Zambrano, L. (2003). From aquaculture goal to real social and ecological impacts: Carp introduction in rural central Mexico. *Ambio*, 32, 252–257.
105. Takano R, Nishizawa T, Arimoto MyK Muroga (2000). Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from wild Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Bull.eur.ass.fish pathol.* 20, 186-192.
106. Vicenova, M., Reschova, S., Pokorova, D., Hulova, J. and Vesely, T. (2011) First detection of pike fry-like rhabdovirus in barbel and spring

viraemia of carp virus in sturgeon and pike in aquaculture in the Czech Republic. *Diseases of Aquatic Organisms* 95, 87–95.

107. Walker PJ, Benmansour A, Calisher CH, Dietzgen R, Fang RX, Jackson AO, Kurath G, Leong JC, Nadin-Davies S, Tesh RB, Tordo N (2000) Family Rhabdoviridae. In: van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL (eds) *Virus taxonomy, classification and nomenclature of viruses. The seventh report of the international committee for taxonomy of viruses*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 563–583
108. Warg JV, Dikkeboom AL, Goodwin AE, Snekvik K, Whitney J (2007) Comparison of multiple genes of spring viremia of carp viruses isolated in the United States. *Virus Genes* 35: 87–95
109. Warrilow D, Smith IL, Harrower B, Smith GA (2002) Sequence analysis of an isolate from a fatal human infection of Australian bat lyssavirus. *Virology* 297:109–119
110. Wagner, R., 1975, Reproduction of rhabdoviruses, in: *Comprehensive Virology*, Vol. 4 IH. Fraenkel-Conrat and R. Wagner, eds.), pp. 1-93, Plenum Press, New York.
111. Watanabe L, Pakingking R, Iida H, Nishizawa T, Iida Y, Arimoto M y K Muroga (2002). Isolation of Aquabirnavirus and viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) from wild marine fishes. *Fish Pathol.* 37 (4), 189-191.
112. Wildy, P.(1971). Classification and nomenclature of viruses. In Melnick, J.L. (ed.) *Monographs in Virology*, Vol. 5.p.33. (Basel: Karger).
113. Winton J.R. & Einer-Jensen K. (2002). Molecular diagnosis of infectious hematopoietic necrosis and viral hemorrhagic septicemia. In: *Molecular Diagnosis of Salmonid Diseases*, Cunningham C.O., ed. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 49–79.
114. Wizingmann G, C, Baath y R Hoffmann (1980). Isolation of viral hemorrhagic septicemia virus from fry of rainbow trout, pike and grayling *zentralbl. Veterinaarmed. Reihe B* 27,7981.
115. Wolf K (1988) *Fish viruses and fish viral diseases*. Cornell University Press, Ithaca, NY 476 pp.
116. Xiao, Z.G., Shen, J., Feng, H., Liu, H., Wang, Y.P. et al. (2015) Characterization of two thymosins as immunerelated genes in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Developmental and Comparative Immunology* 50, 29–37.
117. Xiao, Y., Shao, L., Zhang, C. & An, W. (2014). Genomic evidence of homologous recombination in spring viremia of carp virus: a negatively single stranded RNA virus. *Virus Res* 189, 271–279.
118. Wakida-Kusunoki, A.T., & Amador-del-Ángel, L. E. (2011). First record of the common carp *Cyprinus carpio* var. *communis* (Linnaeus, 1758) and the mirror carp *Cyprinus carpio* var. *specularis* (Lacepède,

1803) in Tabasco. Southern Gulf of Mexico. Aquatic Invasions, 6, 557–560. <https://doi.org/10.3391/ai.2011.6.S1.013>

119. Zambrano, L., & Macías-García, C. (2000). Impact of introduced fish for aqua-culture in Mexican freshwater systems. In R. Claudi, & J. H. Leach (Eds.), Non-indigenous freshwater organisms (pp. 113–124). Boca Raton, FL: Lewis Publishers
120. Zhang, N. Z., Zhang, L. F., Jiang, Y. N., Zhang, T. & Xia, C. (2009). Molecular analysis of spring viraemia of carp virus in China: a fatal aquatic viral disease that might spread in East Asian. PLoS One 4, e6337.
121. Zhang QY, Li ZQ, Gui JF (2000) Isolation of a lethal rhabdovirus from the cultured Chinese sucker *Myxocyprinus asiaticus*. Dis Aquat

## 12. ANEXOS

### 12.1 Secuencia del primer SVC R4 (SVC R4)



SPECIFICATION SHEET

WWW.IDTDNA.COM

23-Feb-2016

Order No. **11683138**

Ref. No. **142835796**

Sequence - SVC R4 (SVC R4)

100 nmole DNA Oligo, 24 bases

5'- CTG GGG TTT CCN\* CCT CAA AGY\* TGY -3'

#### Properties

$T_m$  (50mM NaCl)\*: 61.9 °C  
GC Content: 56.3%  
Molecular Weight: 7,347.6  
nmoles/OD260: 4.7  
ug/OD260: 34.3  
Ext. Coefficient: 214,450 L/(mole·cm)

#### Amount Of Oligo

13.5 = 62.9 = 0.46  
OD260 nmoles mg  
For 100 µM: add 629 µL

#### Shipped To

EDUARDO GOMEZ  
UNIPARTS, S.A. DE C.V.  
GALILEO 92  
MEXICO, DF 11550  
MEXICO  
52814718 2124  
Customer No. 301736 PO No. 14830

#### Secondary Structure Calculations

Lowest folding free energy (kcal/mole): -0.10 at 25 °C  
Strongest Folding  $T_m$ : 26.8 °C

#### Oligo Base Types

Oligo Base Types	Quantity
DNA Bases	24

#### Modifications and Services

Modifications and Services	Quantity
Standard Desalting	1
Phosphorothioate Bond	2

#### Disclaimer

See on reverse page notes (I) (II) & (III) for usage, label license, and product warranties

Mfg. ID 199142977 Labels - Peel Here



### I N S T R U C T I O N S

\*Lyophilized contents may appear as either a translucent film or a white powder. This variance does not affect the quality of the oligo.

\*Please centrifuge tubes prior to opening. Some of the product may have been dislodged during shipping.

\*The  $T_m$  shown takes no account of  $Mg^{2+}$  and dNTP concentrations. Use the OligoAnalyzer® Program at [www.idtdna.com/scitools](http://www.idtdna.com/scitools) to calculate accurate  $T_m$  for your reaction conditions.

P

## 12.2 Secuencia del primer SVC R2 (VPC R2)



SPECIFICATION SHEET

WWW.IDTDNA.COM

23-Feb-2016

Order No. **11683138**

Ref. No. **142835795**

Sequence - SVC R2 (VPC R2)

100 nmole DNA Oligo, 30 bases

**5'- AGA TGG TAT GGA CCC CAA TAC ATH\* ACN\* CAY -3'**

### Properties

$T_m$  (50mM NaCl)\*: 60.7 °C  
 GC Content: 44.4%  
 Molecular Weight: 9,201.4  
 nmoles/OD260: 3.3  
 ug/OD260: 30.7  
 Ext. Coefficient: 299,796 L/(mole·cm)

### Amount Of Oligo

21.2 = 70.7 = 0.65  
 OD<sub>260</sub> nmoles mg  
 For 100 µM: add 707 µL

### Shipped To

EDUARDO GOMEZ  
 UNIPARTS, S.A. DE C.V.  
 GALILEO 92  
 MEXICO, DF 11550  
 MEXICO  
 52814718 2124  
 Customer No. 301736 PO No. 14830

### Secondary Structure Calculations

Lowest folding free energy (kcal/mole): -1.19 at 25 °C  
 Strongest Folding  $T_m$ : 39.1 °C

### Oligo Base Types

Oligo Base Types	Quantity
DNA Bases	30

### Modifications and Services

Modifications and Services	Quantity
Standard Desalting	1
Phosphorothioate Bond	2

### Disclaimer

See on reverse page notes (I) (II) & (III) for usage, label license, and product warranties

Mfg. ID 199142976 Labels - Peel Here



## I N S T R U C T I O N S

\*Lyophilized contents may appear as either a translucent film or a white powder. This variance does not affect the quality of the oligo.

\*Please centrifuge tubes prior to opening. Some of the product may have been dislodged during shipping.

\*The  $T_m$  shown takes no account of  $Mg^{2+}$  and dNTP concentrations. Use the OligoAnalyzer® Program at [www.idtdna.com/scitools](http://www.idtdna.com/scitools) to calculate accurate  $T_m$  for your reaction conditions.

P

## 12.3 Secuencia del primer SVC F1 (VPC F1)



SPECIFICATION SHEET

WWW.IDTDNA.COM

23-Feb-2016

Order No. **11683138**

Ref. No. **142835794**

Sequence - SVC F1 (VPC F1)

100 nmole DNA Oligo, 24 bases

5'- TCT TGG AGC CAA ATA GCT CAR\* R\*TC -3'

### Properties

*T<sub>m</sub>* (50mM NaCl)\*: 56.9 °C  
 GC Content: 45.8%  
 Molecular Weight: 7,368.9  
 nmoles/OD260: 4.3  
 ug/OD260: 31.8  
 Ext. Coefficient: 231,400 L/(mole-cm)

### Amount Of Oligo

14.4 = 62.1 = 0.46  
 OD260 nmoles mg  
 For 100 µM: add 621 µL

### Shipped To

EDUARDO GOMEZ  
 UNIPARTS, S.A. DE C.V.  
 GALILEO 92  
 MEXICO, DF 11550  
 MEXICO  
 52814718 2124  
 Customer No. 301736 PO No. 14830

### Secondary Structure Calculations

Lowest folding free energy (kcal/mole): -3.04 at 25 °C  
 Strongest Folding *T<sub>m</sub>*: 50.9 °C

### Oligo Base Types

DNA Bases Quantity  
 24

### Modifications and Services

Standard Desalting Quantity  
 1  
 Phosphorothioate Bond  
 2

### Disclaimer

See on reverse page notes (I) (II) & (III) for usage, label license, and product warranties

Mfg. ID 199142972 Labels - Peel Here



## I N S T R U C T I O N S

\*Lyophilized contents may appear as either a translucent film or a white powder. This variance does not affect the quality of the oligo.

\*Please centrifuge tubes prior to opening. Some of the product may have been dislodged during shipping.

\*The *T<sub>m</sub>* shown takes no account of *Mg*<sup>2+</sup> and dNTP concentrations. Use the OligoAnalyzer® Program at [www.idtdna.com/scitools](http://www.idtdna.com/scitools) to calculate accurate *T<sub>m</sub>* for your reaction conditions.

P