



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**“DIAGNÓSTICO DE LA VIREMIA PRIMAVERAL DE LA
CARPA (VPC) EN GRANJAS DEL ESTADO DE MÉXICO
E HIDALGO, MÉXICO.”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

P R E S E N T A:

LARISA ADRIANA CHÁVEZ SORIANO

TUTOR: DRA. ELIZABETH MORALES SALINAS

**COMITÉ TUTORAL: DR. DANIEL MARTÍNEZ GÓMEZ
DRA. SUSANA MENDOZA ELVIRA**

México, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTE TRABAJO FUE FINANCIADO POR EL PROYECTO PAPIIT IN-222307-3 "DESARROLLO Y CONSTRUCCIÓN DE CONTROLES INTERNOS PARA PRUEBAS MOLECULARES DE DIAGNÓSTICO: ENFERMEDADES VIRALES DE ORGANISMOS ACUÁTICOS" RESPONSABLE: MVZ M. EN C. JOSÉ RAMÍREZ LEZAMA Y RECIBIÓ EL APOYO DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR, F.M.V.Z., UNAM RESPONSABLE: DR. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ, DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA AGROPECUARIA, UAM-XOCHIMILCO RESPONSABLE: DR. DANIEL MARTÍNEZ GÓMEZ Y DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA FMVZ, UNAM RESPONSABLE: DRA. LAURA PATRICIA ROMERO ROMERO.

**PERSEVERA EN TU EMPEÑO Y HALLARAS LO QUE BUSCAS;
PROSIGUE TU FIN SIN DESVIARTE Y ALCANZARAS TU
EMPEÑO; COMBATE CON ENERGÍA Y VENCERÁS.**

BUDA

**EL ÉXITO NO ES EL DINERO NI LA FAMA, ES HACER BIEN LO
QUE NOS GUSTA Y SENTIRNOS BIEN CON NOSOTROS
MISMOS.**

ANÓNIMO

AGRADECIMIENTOS:

Gracias al proyecto PAPIITT IN-222307, Laboratorio de Microbiología Molecular de la FMVZ-UNAM responsable Dr. Antonio Verdugo y Laboratorio de Microbiología Agropecuaria UAM-Xochimilco responsable Dr. Daniel Martínez Gómez y Departamento de Patología de la FMVZ-UNAM responsable Dra. Laura Romero Romero por haber financiado este trabajo.

Dios, gracias por haberme dado salud, el entendimiento y las fuerzas para finalizar este proyecto tan importante para mi vida.

Papá, gracias por haberme dado la vida, por haberme apoyado desde mi niñez y haberme dado estudios, ahora finalizó otra fase que sin ti no hubiese podido lograr.

José, amor de mi vida, gracias porque siempre me alentaste, ayudaste, apoyaste, aconsejaste y sacrificaste para que continuara con el posgrado, te amo con toda mi alma.

Ivan, te agradezco tus consejos, amistad y regaños para no abandonar mis estudios de posgrado.

A mis tios Alvaro, Oscar, Gil, Belen, Raúl, Nerio, Tevi y primos por su apoyo moral.

A Amalita, Carmen y Pedrito por el apoyo brindado, sin ustedes no hubiese podido continuar mis estudios de posgrado.

Abuelito Felipe a pesar de que ya no estás conmigo, siempre sentí tu presencia alentándome como cuando estabas vivo, a que confiara en mi misma para lograr mis objetivos, te agradezco en donde quiera que estés.

Dr. Daniel Martínez Gómez en primera por haberme brindado tu amistad y por haberme enseñado a confiar en mi, a tener madurez para enfrentarme a las caídas, a tus consejos, asesoría, tu paciencia en momentos de desesperación y al haberme hecho sentir como en casa en tu laboratorio, gracias a ti finalizó mis estudios, nunca cambies eres genial.

Dra. Estela Méndez gracias por tu grandiosa amistad y por haber compartido tus conocimientos, por tu paciencia, consejos y divertidos momentos, te quiero mucho.

Santi mi amiguito eres un pequeño increíble y junto a ti pase grandes momentos de alegría, te quiero mucho.

Dra. Laura Romero gracias por tu gran amistad y por haberme dado la oportunidad de estudiar algo que por mucho tiempo lo quise llevar a cabo, pero que por circunstancias de la vida no se pudo, por todo tu apoyo y consejos para finalizar este posgrado, te quiero mucho.

Gracias Dra. Nuria de Buen por su amistad, sus consejos durante toda mi vida profesional, personal y por alentarme a realizar un posgrado.

Dr. José Trigo Tavera por haberme permitido estudiar la maestría en ciencias al otorgarme el permiso.

Dra. Elizabeth Morales gracias por su amistad, por haberme alentado a realizar mis estudios de posgrado, por su apoyo y consejos durante este proceso.

Dra. Susy Mendoza por sus consejos y haber compartido conmigo sus experiencias.

Dr. Antonio Verdugo gracias por su amistad y por haberme enseñado a preocuparme por cosas que realmente valen la pena, su apoyo para llevar a cabo estos estudios, consejos y enseñanzas, lo quiero mucho y admiro.

Dr. David Groman gracias por haberme aconsejado de patólogo a patólogo y por haberme asesorado.

Dra. Ana Bertha Montero gracias por su apoyo, consejos, por haberme ayudado a contactar a los comités acuícolas y aportado ideas importantes para la realización de este estudio.

A mis sinodales Dr. Jorge Tortora, Dr. Ricardo Oropeza, Dra. Laura Cobos por sus consejos para la mejora de esta tesis de maestría.

A todos mis profesores de la maestría por exigirnos y por sus enseñanzas para poder ser mejores durante nuestra formación profesional.

A mis amigos de patología Dianis, Juanito, Adriana, Puchie, Moni, Juan, Ana, Karina, Isaco, Natalia, Luis Miguel, Blanquita, Carmen, Ayin, JoséLuis, Bernie, Miguel, Dr. Jaime Campuzano, Dn. Migue, Dña. Julianita y ayudantes por su amistad y por alentarme a continuar.

A mis amigos del laboratorio de Microbiología Molecular Luisito, Jimena, Gabita, Adolfo, Diana, Sule, lleinita, Mau, Dr. Alfredo, Dra. Marce, Francis, Julico por haber compartido sus conocimientos y haberme hecho pasar grandes momentos de alegría durante mi estancia por el laboratorio.

A mi amiga Edith gracias por tu amistad, por haber compartido tus conocimientos y haberme hechado porras durante mis crisis existenciales para continuar con el posgrado.

A mis amigos de la UAM-Xochimilco Ale, Mau, Ingrid, Jesus, Paula, Norita, Leonora, David, Nancy, Angie, Osvaldo, Pili, Wendy e Iram por los grandes momentos que pasamos juntos, sus conocimientos y por haberme soportado durante mi estancia en el laboratorio.

A mis amigos Alejandra, Xitli, Ana, Fer, Natalia, Bernardo, Mariana, Toni, Laura y compañeros de la maestría por su amistad, apoyo moral en todo nuestro camino y esperando todos logren tener éxito profesional.

A mis amigos Concha, Liliana Valdez, Odette, Juan Manuel, Marce, Alina, Pedro, Tona, Male, Tiyi, Arless, Moni, Alberto, Liz, Sandy, Hugo, Karlita, Enrique, Enrique Aburto, Paty, Tony Carrasco y familia por su apoyo moral y disculpas por haberlos abandonado en estos tres años.

Gracias al Comité Acuícola Hidalguense de Sanidad Biól. Ma. Luisa Ceballos Orozco, Ing. Alejandro Falcón Quintanar, Biól. Nemorio García y Subdelegación de Pesca SAGARPA del Estado de México Dr. Fernando Vergara Dominguez, personal que nos ayudo en la colecta de los peces, propietarios de los estanques, granjas y Centros acuícolas que nos donaron y ayudaron para obtener las muestras.

Gracias al laboratorio de Microbiología e Inmunología de la FMVZ-UNAM, Dr. Alejandro de la Peña, Dra. Cristina Rodríguez y Dra. Fabiola Rodríguez por la realización de las muestras de bacteriología y su asesoría técnica.

Gracias al laboratorio de Microscopía Electrónica responsable Dra. Adriana Méndez Bernal y personal Joel López, Lorenzo Martínez y la Biól. Ana Ramírez.

Gracias a los Dres. Suarez Güemes, Carlos Gutiérrez, Marce Figueroa, Juan José Pérez Rivero, Clara Agullón García, Librado Torres y Verónica Rojas por su apoyo y paciencia durante este posgrado. Gracias a Maria Eugenia, Meche, Elsa y Araceli por su apoyo.

Gracias al Técnico Luis Morales y equipo, Tere, fotógrafo Jaime Eugenio Córdova, Ema Serrano por su apoyo técnico para que se llevara a cabo este estudio.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Páginas
Índice de Contenido	IV
Índice de Cuadros y Figuras	VIII
Índice de abreviaturas	IX
Resumen	XII
Abstract	XIII
1.0 Introducción	1
1.1 Producción de carpas en México	1
1.2 Viremia Primaveral de la Carpa (VPC)	2
1.3 Etiología del vVPC	3
1.4 Replicación viral	7
1.5 Factores que favorecen el desarrollo de la enfermedad	10
1.6 Patogenia de VPC	11
1.7 Pruebas diagnósticas	14
2.0 Justificación	20
3.0 Hipotesis	22
4.0 Objetivo principal	23
4.1 Objetivos particulares	24
5.0 Material y métodos	25
5.1 Muestreo	25
5.2 Necropsias e histopatología	26
5.3 Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas sándwich, policlonal (ELISA)	27
5.4 Cultivo bacteriológico	27
5.5 Diseño del CI y reacción en cadena a la polimerasa (PCR)	28

5.5.1	Diseño de iniciadores	28
5.5.2	Obtención del gen de la proteína verde fluorescente	29
5.5.3	Reacción en cadena a la polimerasa (PCR)	30
5.5.4	Clonación y transformación química del plásmido pcDNA3.1V5-His-TOPO	31
5.5.5	Verificación del sentido de la clonación del CI VPC-PVF-VPC en el plásmido pcDNA3.1V5-His-TOPO	33
5.5.6	Transfección de células Hela con el plásmido recombinante con CI VPC-PVF-VPC	33
5.5.7	Extracción del ARNm a partir de células Hela transformadas empleando iniciadores VPC1 y 2	34
5.5.8	Extracción de las muestras clínicas	36
5.5.9	Transcriptasa reversa-reacción en cadena a la polimerasa empleando las muestras clínicas y el CI VPC-PVF-VPC	36
6.0	Resultados	37
6.1	Signos clínicos	37
6.2	Hallazgos macroscópicos	37
6.3	Lesiones histológicas	39
6.4	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)	43
6.5	Estudio bacteriológico	45
6.6	Construcción del CI a partir del plásmido pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO	45
6.7	Verificación del sentido del CI VPC-PVF-VPC en el sitio de clonación del vector pcDNA3.1-V5-His-TOPO con respecto al pCMV	48
6.8	Transfección por lipofectamina en células Hela con el plásmido recombinante con el CI VPC-PVF-VPC	51
6.9	Extracción del ARN de las muestras clínicas de carpas y coamplificado del CI VPC-PVF-VPC	53
7.0	Discusión	54
8.0	Conclusiones	64
9.0	Prospectivas	65

10.0 Anexo	67
10.1 Anexo I	67
11.0 Literatura citada	69

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

	Páginas
Figura 1	4
Cuadro 1	25
Cuadro 2	28
Figura 2	29
Figura 3	30
Figura 4	31
Figura 5	32
Figura 6	32
Figura 7	35
Figura 8	38
Figura 9	38
Figura 10	38
Figura 11	38
Fotomicrografía 1	42
Fotomicrografía 2	42
Fotomicrografía 3	42
Fotomicrografía 4	42
Fotomicrografía 5	42
Fotomicrografía 6	42
Cuadro 3	43
Cuadro 4	44
Cuadro 5	45
Figura 12	46
Figura 13	47
Figura 14	48
Figura 15	49
Figura 16	50
Figura 17	51
Figura 18	52
Figura 19	53

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

A.	<i>Aeromonas</i>
A	Alanina
A	Alfa
ADN	Acido desoxiribonucleico
Anti-VPC	Anticuerpo antiviremia primaveral de la carpa
ARN	Acido ribonucleico
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
ARNasa	Enzima que degrada el ácido ribonucleico
Br-E	Bromuro de etidio
C	Citocina
°C	Grados centígrados
c.b.p	Cuanto baste para
Co	Contrasentido
CAT	Catálogo
CH	Estanque de Chilcuahutla
CI VPC-PVF-VPC	Control interno
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro cuadrado
CMV	Citomegalovirus
CO ₂	Dioxido de Carbono
d.p.i	Días postinfección
DEPEC	Dietil pirocarbonato
DICT ₅₀	Dosis infectante en cultivos de tejido del 50%
DNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EEV-B12	Rhabdovirus de la anguila B12
EEV-C26	Virus C26 de la Anguila
ELISA	Inmunoensayo enzimático
EPC	Cultivo celular <i>Epiteliosum papillosum ciprini</i>
et al.	Y otros
EVA	Virus de la anguila americana
FHM	Cultivo celular Fathead Minnow
FRET	Transferencia por resonancia de energía fluorescente
G ₁	Glucoproteína viral
g	Gravedades
G ₂	Guanina
Gly	Glicina
h.p.i	Horas postinfección
H-E	Hematoxilina Eosina
Hela	Cultivo celular de cáncer cervical
λ Hind	Marcador molecular de 1 kb
HIRRV	Rhabdovirus del Hirame
His	Histidina
IFAT	Técnica de Inmunofluorescencia directa
Kb	Kilobases
Km	Kilómetro
λ	Lambda
L	Litros
L pol	Proteína L polimerasa dependiente de ARN
LB	Medio de cultivo Louria Bertani
LM	Granja "La Manga"

Ltd.	Compañía privada limitada al compartir
LX	Lipofectamine Plus Regent
Ma	Proteína matriz viral
M	Molar
MCA	Marca
MEM	Medio mínimo esencial
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
Mg	Miligramo
µl	Microlitro
µm	Micrómetro
ml	Mililitro
mM	Milimolar
N	Nucleoproteína viral
Ng	Nanogramos
Nm	Nanómetro
nM	Nanomolar
NS	Gen no estructural
No.	Número
NOM	Norma
OIE	Organización Internacional Sanidad Animal
ORF	Marco de lectura abierto
P	Fosfoproteína viral
p.b	Pares de bases
PAS	Acido peryódico de Shiff
PBS	Amortiguador de fosfatos
pcDNA	Vector de ácido desoxiribonucleico
pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO	Vector de expresión que contiene la fusión de la proteína verde fluorescente en el carboxilo terminal
pcDNA3.1V5-His-TOPO	Vector de expresión
pc PVF	Vector de expresión pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO
pc V5	Vector de expresion pc DNA 3.1V5-His-TOPO
pCMV	Promotor/enhancer del Citomegalovirus humano
PCR	Reacción en cadena a la polimerasa
PFR	Rhabdovirus del Pike fry (Lucio)
pH	Concentración de iones hidronio en una sustancia
Poli A	Poliadenilación
Ppm	Partes por millón
PVF	Proteína Verde Fluorescente
RAVPC	Anticuerpos de conejo contra VPC
RL	Rhabdovirus del lucio
Rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Transcriptasa reversa- reacción en cadena a la polimerasa
S	Grado de sedimentación
SAGARPA	Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación de México
Ser	Serina
SOC	Medio para favorecer la transformación
sp.	Especie
T	Timidina
TAE	Tris-Acido acético-EDTA
TAI	Granja de Tezontepec de Aldama I
TAII	Granja de Tezontepec de Aldama II
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCID ₅₀	Dosis infectante en cultivo celular al 50%
TE	Amortiguador Tris-EDTA
TIA	Granja de Tiacaque, Estado de México

TMB	Sustrato tetrametilbenzidina para ELISA
TUN	Granja de Tunititlán, estado de Hidalgo
Tyr	Tirosina
Un	Unidad
U	Uracilo
UAM	Universidad Autónoma Metropolitana
UDRV	Rhabdovirus de la enfermedad ulcerativa
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UTR	Regiones no traducidas
VHSV	Virus de la septicemia hemorrágica viral
VNPI	Virus de la necrosis pancreática Infecciosa
VPC	Enfermedad de Viremia primaveral de la carpa
VPC 1 y 2	Iniciadores para amplificar al vVPC
VPC-PVF 1 y 2	Iniciadores para obtener el control interno VPC-PVF-VPC
VSV	Virus de la Estomatitis vesicular del Cerdo
VV	Granja de Villa Victoria, Hidalgo
vVPC	Virus de la Viremia primaveral de la carpa

RESUMEN

Larisa Adriana Chávez Soriano. “**Diagnóstico de la Viremia Primavera de la carpa (VPC) en granjas del Estado de México e Hidalgo, México**”. Bajo la supervisión del Dr. Daniel Martínez Gómez, Dra. Susana Mendoza Elvira y Dra. Elizabeth Morales Salinas.

La viremia primavera de la carpa (VPC) es una enfermedad viral asociada a un Rhabdovirus de la familia Vesiculoviridae, que causa cuantiosas pérdidas económicas a la industria acuícola y es de notificación obligatoria ante la OIE. El objetivo del presente estudio fue identificar al vVPC en granjas de los Estados de México e Hidalgo, mediante histopatología, ELISA y RT-PCR, así como construir un control interno para evitar emitir resultados falsos negativos. Las pruebas diagnósticas se realizaron a partir de muestras de tejidos de carpas en granjas sospechosas que mostraban mortalidad, signos clínicos y lesiones macroscópicas. Las muestras colectadas para histopatología fueron fijadas, procesadas, teñidas con H-E y observadas bajo un microscopio fotónico. Las lesiones histológicas en los ciprinidos de estanques particulares y granjas del estado de Hidalgo: Chilcuahutla, Tunititlán, La Manga y Tezontepec de Aldama I y del estado de México: Tiacaque y Villa Victoria, estaban asociadas con mala calidad del agua, presencia de ecto y endoparásitos e infección bacteriana por *Aeromonas hydrophila*; salvo en la granja de Tezontepec de Aldama II, Hidalgo donde las lesiones fueron sugerentes de un complejo virus-bacteria. En el estudio bacteriológico, se confirmó el aislamiento de *Aeromonas hydrophila*. Para confirmar los hallazgos identificados por histopatología se realizó ELISA comercial Test-Line a partir de tejidos, en donde sólo la granja de Tezontepec de Aldama II fue positiva al vVPC. Para verificar que no se generaran falsos negativos por RT-PCR, se incluyó un control interno (CI) competitivo conformado por el gen de la proteína verde fluorescente flanqueado con fragmentos del gen de la glucoproteína del vVPC. El CI fue obtenido por PCR, empleando como template el pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO circularizado y utilizando iniciadores denominados compuestos. Para corroborar los resultados de histopatología y ELISA, se realizó RT-PCR obteniendo un amplificado de 714 pb que corresponde al gen de la glucoproteína del vVPC, en las muestras de los estanques de Chilcuahutla y Tunititlán; también un coamplificado que correspondía al CI obteniendo un amplificado de 801 pb, indicando que las muestras de ambos sitios son positivas para vVPC. Mientras, que para el resto de las muestras provenientes de las otras granjas no hubo ningún amplificado; incluyendo las carpas de TAIL que mostraron lesiones sugerentes a entidad viral y fue positiva por ELISA a vVPC. Por otro lado, el CI VPC-PVF-VPC fue clonado en un plásmido de expresión pcDNA3.1V5-His-TOPO y se identificó el producto clonado en dirección CI VPC-PVF-VPC con respecto al promotor/enhancer CMV, por PCR empleando un iniciador denominado de sentido. Una vez identificado el plásmido recombinante en dirección, fue empleado para realizar la transfección con lipofectamina en células Hela, con el fin de obtener gran cantidad de ARNm que fue de 560 ng, se realizó la extracción de ARNm a partir de las células Hela transfectadas para amplificar por RT-PCR el CI VPC-PVF-VPC de 801 pb. Por último, se verificó la eficiencia de la transfección, ya que el CI VPC-PVF-VPC contiene un gen reportero (proteína verde fluorescente), se observó con un microscopio de fluorescencia, apreciándose positividad en el 50% de las células Hela y la fluorescencia se preservó hasta las 72 horas. A partir de estos hallazgos no se puede realizar aún el reporte de la presencia de VPC ante SAGARPA y la OIE, debido a que en el manual de la OIE se menciona que se requiere confirmar el resultado de RT-PCR por secuenciación y por aislamiento viral empleando cultivo celular de FHM y EPC que no fueron contemplados para el presente estudio.

Palabras clave: VVPC, pruebas diagnósticas, carpas, granjas del Estado México e Hidalgo, control interno.

ABSTRACT

Larisa Adriana Chávez Soriano. “**Spring Viremia of Carp diagnosis (SVC) in farms of the State of Mexico and Hidalgo, Mexico**”. Under the supervision of: Dr. Daniel Martínez Gómez, Dra. Susana Mendoza Elvira y Dra. Elizabeth Morales Salinas.

Spring viremia of carp (SVC) is a viral disease associated to a Rhabdovirus from the family Vesiculoviridae, that causes to the aquatic industry high economic losses and is an OIE notifiable disease. The objective of this study was the identification of SVCv in farms of the states of Hidalgo and Mexico by histopathology, ELISA and RT-PCR, and the construction of an internal control for avoiding the emission of false negative results. The diagnostic tests were done from tissues of carps and the selected farms show mortality, clinical signs and macroscopic lesions. The collected samples for histopathology were fixed in 10% formaldehyde, processed, stain with Hematoxiline-Eosine and observed with a photonic microscope. The histological lesions in the cyprinids of the particular ponds and farms of the state of Hidalgo: Chilcuahutla, Tunititlan, La Manga y Tezontepec de Aldama I and from the state of Mexico: Tiacaque and Villa Victoria, were associated to the bad water quality, the presence of ecto and endoparasites and bacterial infection by *Aeromonas hydrophila*; except in the Tezontepec Aldama II farm the lesions suggested a virus-bacteria complex. In the bacteriologic study, *Aeromonas hydrophila* was isolated too. For confirming the findings identified by histopathology, a commercial Test-line ELISA was done using tissue samples and only in the Tezontepec Aldama II was positive to vVPC. For verifying that we are not generating false negatives by RT-PCR test, we included a competitive internal control established in the body by the green fluorescent protein gene and flanked with fragments of the glycoprotein gene of vVPC. The CI was obtained by PCR, employing like template the circular pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO and using the denominated composed primers. To corroborate the histopathology and ELISA findings, we made RT-PCR obtaining an amplification of 714 bp corresponding to the glycoprotein gene of SVCv, in the samples of the ponds of Chilcuahutla and Tunititlan; and the co amplification of the CI by an amplification of a product of 801 bp, showing that the samples from both places are positive to SVCv. And for the rest of the samples of the other farms we didn't have any amplification; including the TAIL carps samples that showed suggesting lesions of a viral entity and that was positive to ELISA. On the other hand, the CI VPC-PVF-VPC was cloned in an expression plasmid pcDNA3.1V5-His-TOPO and the cloned product in direction toward CMV promoter/enhancer, these was verified by PCR using the denominated sense primer. Once the recombinant plasmid was identified in direction, the transformed plasmid was employed for a lipofectamine transfection in Hela cells, having high quantity of mRNA that was in this study of 560 ng, then the mRNA extraction of the transformed Hela cells was done, these extraction product was used for RT-PCR and a amplification of the 801 bp that corresponds to CI VPC-PVF-VPC was obtained. At last, the efficiency of the transfection was verified, because the CI VPC-PVF-VPC has an inner region composed with a reporter gene (green fluorescent protein) and observed with a fluorescent microscope, shows with fluorescence a positive result that in the present study was of 50% in Hela cells and preserved until 72 hours. The manual of the OIE, says that from this findings we can't make the report of the presence of VPC, because it is required to confirm the RT-PCR results by sequence and with isolation that were not contemplated in the present study. From these findings we can't make any report to SAGARPA and the OIE of the presence of SVC, because in the manual of the OIE the results obtained with RT-PCR must be confirmed by sequencing or isolation in cell culture using FHM or EPC that were not contemplated for this study.

Key words: SVCV, diagnostic techniques, carps, farms of the state of Mexico and Hidalgo and Internal control.

1.0 INTRODUCCIÓN

1.1 PRODUCCIÓN DE CARPA EN MÉXICO

En México, la acuicultura es una actividad complementaria que se creó para el apoyo social de las comunidades rurales. En la actualidad, se han incrementado las necesidades de alimento para consumo humano, aumentando en la dieta la cantidad de proteína animal para mejorar así los niveles nutricionales de la población (Juárez, 1987). Otra actividad para el apoyo de la población, es la repartición, a pequeños productores, de huevo oclado y crías para autoconsumo y obtención de ingreso económico. Por otro lado, la ciprinocultura además de ser empleada para consumo y obtención de ingresos, se utiliza para repoblación de cuerpos de agua naturales y para venta de peces de ornato (Montero, 2006).

El consumo de carpa, se ha arraigado en la dieta de la población rural en varios estados de la república Mexicana como: Estado de México, Hidalgo, Aguascalientes, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Durango, Guanajuato, Jalisco, entre otros; siendo los dos primeros estados los de mayor importancia en cuanto a la producción de crías y peces de engorda (Montero, 2007).

En México se cultivan 8 especies de carpas: (común, espejo, barrigona, dorada, herbívora, plateada, cabezona y negra). El cultivo se lleva a cabo en sistemas intensivos como semintensivos.

A partir de esta actividad, se generan millones de pesos aportados por la producción nacional de especies dulceacuícolas, en donde la ciprinocultura en apariencia es el segundo recurso en importancia en las aguas continentales (Cabrera y García, 1982).

En México, las enfermedades virales en peces no se habían estudiado debido a que no se contaba con pruebas diagnósticas aceptadas por la Organización

Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2009). En el 2001, hubo un brote de Necrosis Pancreática Infecciosa asociado a un birnavirus, que afectó a la truticultura nacional, ocasionando cuantiosas pérdidas económicas a causa de la elevada mortalidad de crías y alevines (Salgado, 2006). Debido a esto, se vio la necesidad e importancia de implementar pruebas diagnósticas permitidas por esta organización como son el aislamiento viral, pruebas serológicas y moleculares para identificar a los agentes virales (OIE, 2009; Iowa State University, 2007). Además, surgió el interés de estudiar otras enfermedades virales como es el caso de la Viremia Primavera de la Carpa (VPC) para determinar si está presente en México.

1.2 VIREMIA PRIMAVERAL DE LA CARPA (VPC)

La Viremia Primavera de la Carpa (VPC) es una enfermedad de curso agudo, sistémica, hemorrágica y contagiosa (Fijan *et al.*, 1971; Petty *et al.*, 2002; Johnson y Weber, 2004).

VPC es una enfermedad certificable ante SAGARPA y la OIE y se encuentra en la lista B dentro de la norma 010-PESCA-1993 (OIE, 2009; NOM-010-PESCA-1993), esto debido a que tiene gran importancia económica porque al introducirse en un centro de producción, puede causar morbilidad y mortalidad del 30-90% en cultivos de ciprínidos de producción y ornamentales. Afecta a carpas juveniles y adultos de hasta 1 año de edad (Ahne *et al.*, 2002; Iowa State University, 2007).

Esta enfermedad afecta a todas las especies de carpa como: carpa común, carpa koi (Liu *et al.*, 2004), carpa herbívora, carpa plateada (Shchelkunov *et al.*, 1984; OIE, 2009), carpa cabezona y peces japoneses (OIE, 2009), siendo

estos últimos más susceptibles a la infección (Fijan, 1976; Pasco *et al.*, 1987; Johnson y Weber, 2004). En la literatura también se menciona que inclusive puede afectar a ictalúridos como el pez gato europeo y al pez cebra (*Brachynario rerio*) (Sanders *et al.*, 2003; Siwicki *et al.*, 2003; OIE, 2009). Experimentalmente, otras especies de agua dulce se han infectado con el virus de la Viremia Primavera de la Carpa (vVPC) como los peces Guppie (Ahne *et al.*, 2002) y la perca del Norte (*Exoc lucus*) (Wolf, 1988; OIE, 2009). Otras especies afectadas son “Sheatfish” (*Silurus glanis*) ocasionando mortalidad hasta del 90% (Fijan *et al.*, 1981; OIE, 2009), trucha arcoíris (Svetlana *et al.*, 2006) e inclusive afecta a la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) (Bussereau *et al.*, 1975). Así mismo, el virus ocasiona lesiones en los “Golden shiners” (*Notemigonus crysoleucas*) (Ahne *et al.*, 2002), Roach (*Rutilus rutilus*) (Haenen y Davidse, 1993), Lucio (*Esox lucius*) (Koutná *et al.*, 2003) y Pumpkinseed (*Lepomis gibbosus*) (Ahne *et al.*, 2002), así como en los camarones blancos del pacífico (Johnson *et al.*, 1999).

Desafortunadamente para esta enfermedad no existe ningún tratamiento exitoso, por el momento solo se sugieren medidas profilácticas de higiene y manejo (Ahne *et al.*, 2002; OIE, 2009).

1.3 ETIOLOGÍA

El grupo de los rhabdovirus es el que tiene mayor número de agentes que afecta a los peces y es de gran importancia ya que está asociado con epizootias y cuantiosas pérdidas económicas (Essbauer y Ahne, 2001).

Dentro de la familia Rhabdoviridae se encuentran los géneros: Vesiculovirus, Lyssavirus, Ephemerovirus, Cytorhabdovirus, Nucleorhabdovirus y

Novirhabdovirus. Los virus de peces se encuentran incluidos en 2 de los 6 géneros, Novirhabdovirus y Vesiculovirus. En el género Novirhabdovirus se encuentran los virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (VNHI), rhabdovirus Hirame (HIRRV), virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV) y tres sugerentes a este género como virus B12 de la anguila (EEV-B12), C26 de la anguila (EEV-C26) y rhabdovirus de la “snakehead”. Dentro del género Vesiculovirus se incluyen los rhabdovirus del lucio (PFR), el virus de la Viremia Primavera de la Carpa (vVPC) (Walker et al., 2000), virus de la anguila americana (EVA) y el rhabdovirus de la enfermedad ulcerativa (UDRV) (Van Regenmortel et al., 2000; Essbauer y Ahne, 2001 y Walker et al., 2000).

El virus de la viremia primaveral de la carpa (vVPC) fue clasificado dentro del género vesiculovirus de acuerdo con el patrón electroforético de sus polipéptidos estructurales (Hoffman et al., 2002 y OIE, 2009) y pertenece al género y especie: *Rhabdovirus carpio* (Fijan et al., 1971).

El vVPC tiene como todos los miembros de la familia, forma de bala (Wunner et al., 1995; Ahne et al., 2002), mide 60-90 nm de ancho y 90-180 nm de largo, es un virus ARN, envuelto, de cadena sencilla, lineal, no segmentado y de sentido negativo (Fijan,1999; Ahne et al., 2002; OIE,2009) (Figura 1).

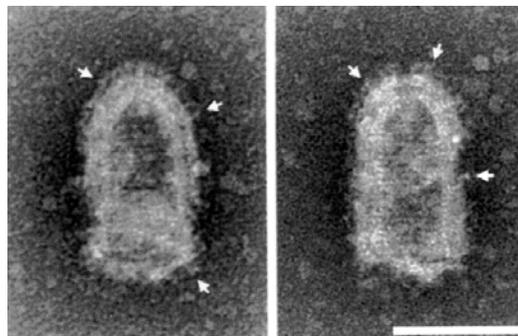


Figura 1. Imagen de microscopía electrónica del rhabdovirus de la Viremia Primavera de la carpa donde se aprecia que la partícula está envuelta con espículas de glucoproteínas (flechas). Tiene forma de bala, mide 60-90 nm de ancho y 90-180 nm de largo. (Tomado de Wolf, 1988).

Este virus tiene la capacidad de pasar a través de filtros de 450 a 200 μ de porosidad, pero es retenido por membranas de 100 μ (Wolf, 1988).

En el año 2002, se determinaron los componentes del genoma completo del virión. Está constituido por una secuencia de 11,019 nucleótidos, con 5 genes y tiene 5 marcos de lectura abierta que codifican para 5 proteínas que se acomodan de la siguiente manera 3'-N-P-M-G-L-5', cuyas secuencias virales se encuentran incluidas en el GenBank (Hoffman *et al.*, 2002). Cada una de estas 5 proteínas estructurales permite la identificación del virus y son necesarias para que se lleve a cabo la replicación viral. Carece del gen no estructural (NS), presente en los virus del género Novirhabdovirus (Kurath *et al.*, 1997; Walker *et al.* 2000; Ahne *et al.*, 2002).

Las 5 proteínas estructurales se denominan: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), matriz (M), glucoproteína (G) y polimerasa dependiente del ARN (L) (Lenoir, 1973; Lenoir y de Kinkelin, 1975; Clerx y Horzinek 1978; Ahne *et al.*, 2002; Essbauer y Ahne, 2001; OIE, 2009).

La nucleocápside presenta una simetría helicoidal que mide 50 nm de diámetro y está compuesta por 3 proteínas (N, P y L), conocidas como ribonucleoproteínas (Ahne *et al.*, 2002).

La nucleoproteína (N) es la proteína más abundante del virión e interacciona con el ARN viral para darle la estructura helicoidal a la nucleocápside, es un modulador de la transcripción. Para que la replicasa cumpla su función de replicación, la nucleoproteína debe estar en altas concentraciones y además también tiene la función de proteger al ARNm recién formado (Sokol y Koprowski, 1975; Banerjee, 1987 y Ahne *et al.*, 2002).

La fosfoproteína (P) es otro de los componentes de la nucleocápside y para que se lleve a cabo la transcripción requiere de la formación de un complejo junto con las proteínas N y L (Roy, 1981; Banerjee, 1987; Wunner *et al.* 1995 y Ahne *et al.*, 2002). Se encarga de la fosforilación durante la transcripción, elonga la cadena de ARN durante la replicación y transcripción, además, posiciona a la L polimerasa en el promotor de la terminación 3'. Esta proteína también es requerida para que se lleve a cabo el capping o metilación del ARNm.

La proteína L polimerasa, funciona durante la transcripción y replicación viral como transcriptasa y ARN polimerasa, pero para que esta función se lleve a cabo se requiere de la formación de un complejo con las proteínas N y P; además, en el caso de peces, para que la replicación se lleve a cabo, la temperatura óptima para su actividad es de 20-25 °C (Roy y Clewley, 1978b; Banerjee, 1987; Ahne *et al.*, 2002).

Como otros vesiculovirus, el vVPC tiene una membrana proteica M que conforma la envoltura de la nucleocápside, le da la forma de bala al virión y une a la nucleocápside con los dominios citoplasmáticos de la proteína G, que está embebida en la bicapa lipídica de la envoltura viral (Walker *et al.* 2000). Es necesario que la partícula viral durante la liberación en la célula, no se encuentre envuelta para que se pueda llevar a cabo la replicación y transcripción (Kiuchi y Roy, 1984; Banerjee, 1987; Björklund *et al.*, 1996; Ahne *et al.*, 2002 y OIE, 2009).

La glucoproteína G está constituida por peplómeros o espículas triméricas que se unen a los receptores e inducen la endocitosis del virión (Ahne *et al.*, 2000). Estas proteínas integrales de membrana se encuentran embebidas firmemente

en la bicapa lipídica de la envoltura viral, están constituidas por un dominio corto y por 2-3 segmentos transmembranales que son componentes α -hélices hidrofóbicas, estas estructuras se expanden hacia la bicapa lipídica (Flint, 2004). La glucoproteína posee oligosacáridos que surgen a partir del dominio corto y posee sitios de unión para receptores virales en la superficie celular. Las secuencias de la glucoproteína median la fusión viral con la membrana celular durante la fase de adhesión, para que se lleve a cabo la endocitosis viral. Estas proyecciones son antigénicas e inducen anticuerpos neutralizantes, son responsables de la hemoaglutinación y determinan las propiedades serológicas de los rhabdovirus (Wagner, 1987). Para el caso del vVPC, comparte determinantes antigénicos con el rhabdovirus del lucio (Hill *et al.*, 1975; Bishop y Smith, 1977, Jorgensen *et al.*, 1989; Ahne *et al.*, 2002).

1.4 REPLICACIÓN VIRAL

Se han realizado pocos estudios con respecto a la forma de replicación del vVPC, sin embargo parece ser semejante a la del vesiculovirus de la estomatitis vesicular del cerdo (vSV).

Los rhabdovirus tienen peplómeros o espículas que utilizan para la adhesión con las células de hospedero. Estos peplómeros están conformados por glucoproteínas de superficie, constituidas por aminoácidos hidrofóbicos básicos de fosfatidilserina; además dependen de varios factores para que se lleve a cabo la unión entre la partícula viral y la célula. Dichos factores son en primer lugar, la proteína de fusión constituida por una glucoproteína que forma complejo proteico de fusión, este complejo provee la energía requerida para que se lleve a cabo la aproximación entre la membrana celular y la viral; una

vez fusionadas ambas membranas, el complejo se disocia perdiendo la capacidad de fusión (Flint, 2004). En segundo lugar, debe haber en el medio un pH ácido y en tercer lugar, la temperatura fisiológica del hospedero (Matlin *et al.*, 1982; Wagner, 1991).

Para que se lleve a cabo la fase de adhesión, las células requieren de un receptor específico (Wagner, 1991; Hunt, 2008), cuyo mayor componente parecen ser fibronectina (Bearzoti *et al.*, 1999) o fosfolípidos ácidos de fosfatidilserina y ácido fosfatídico (Wagner, 1991). Estos componentes serán identificados por las glucoproteínas de la superficie del rhabdovirus de vSV permitiendo que se lleve a cabo la adhesión con la membrana celular (Hunt, 2008).

Una vez adherido el virus a la membrana celular, éste provoca modificaciones bioquímicas de la membrana ocasionando deformación asociada con el sistema de túbulos, plegamientos y formación de la vesícula endocítica; de ésta forma el virus entra a la célula por endocitosis preservándose la fusión entre ambos componentes (Wagner, 1991; Flint *et al.*, 2004, Hunt, 2008).

Ya en el interior de la vesícula o endosoma, se liberan enzimas lisosomales (Wagner, 1991) por activación de la bomba de protones, favoreciendo la acidez en el interior del endosoma, reactivando la reacción de fusión para que se de la transferencia del virus hacia el citoplasma celular.

Para que se pueda llevar a cabo la transcripción, se requiere de la pérdida de la envoltura y de la proteína matriz; ambas sufren cambios conformacionales, fusionándose con la membrana del endosoma a través de cargas y produciéndose la liberación de la nucleocápside helicoidal.

La nucleocapside está constituida por una cadena de ARN con sentido negativo que está recubierta por la L-polimerasa dependiente del ARN, nucleoproteínas y fosfoproteínas. Estas proteínas se encargan de catalizar la síntesis del ARN viral conocido como el complejo ribonucleoproteína nuclear de sentido negativo (Wagner, 1991; Flint *et al.*, 2004).

La cadena de ARN con sentido negativo liberado en el citoplasma de la célula infectada, está cubierta por moléculas proteicas de la nucleocápside y escasas proteínas L y P que catalizan la síntesis del ARN viral. La cadena de ARN de sentido negativo se copia, dando origen a 5 ARN mensajeros subgenómicos por las proteínas L y P (Wagner, 1991; Flint *et al.*, 2004).

Se cree que las proteínas N, P y L sintetizadas *de novo* participan en la replicación viral. Esta fase se inicia con la síntesis de ARN genómico con sentido positivo en forma de ribonucleoproteínas. Para que cada uno de los ARNm con sentido positivo sean traducidos, deberán estar metilados en la penúltima adenina que puede tener o carecer de "capping". El "capping" del nucleótido 5' terminal se localiza al final de cada gen viral, antes que la cadena de ARN sea extendida (Gupta y Roy, 1980; Gupta y Roy, 1981) y por último los 5 ARNm con sentido positivo serán poliadenilados en el penúltimo nucleótido que es el sexto o séptimo uracilo.

Por otro lado, estos ARN con sentido positivo servirán como template para la síntesis de nuevas cadenas de ARN pero con sentido negativo, en forma de nucleocápside. Otra parte de las cadenas de ARN con sentido negativo, entrarán hacia la vía de síntesis de ARNm viral de nuevo (Barnejee, 1987; Hunt, 2008).

Los ARNm de N, P, M y L son traducidas por los ribosomas citoplásmicos, mientras que la proteína G por los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso (Pal y Wagner, 1987; Wagner, 1991). Las glucoproteínas entran por la vía secretora a través del retículo endoplásmico rugoso y el aparato de Golgi, donde son transformadas y glucosiladas (Flint *et al.*, 2004) y posteriormente viajan en vesículas hacia la membrana plasmática donde se fusionarán e insertarán con las ribonucleoproteínas y la proteína matriz.

La progenie de las ribonucleoproteínas y proteína matriz son transportadas a la membrana celular, aquí se unen a la superficie citoplásmica de la membrana, en una región que contiene numerosas glucoproteínas. Los fosfolípidos de fosfatidilserina con cargas negativas, se unirán con la proteína matriz con carga positiva iniciándose el ensamblaje.

Las partículas virales ensambladas serán envueltas por la membrana rica en glucoproteínas y se liberarán los viriones por lisis celular, esto gracias a las polimerasas residuales para reiniciar un nuevo ciclo de infección (Flint *et al.*, 2004; Wagner, 1991).

1.5 FACTORES QUE FAVORECEN EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD

Para que la VPC se desarrolle en los peces se requiere de varios factores, entre los que se pueden mencionar la edad, temperatura, inmunidad, sobrepoblación y calidad del agua.

Con respecto a la edad, los peces menores de un mes (alevines y crías) son más susceptibles a VPC (Shchelkunov y Shchelkunova, 1989); sin embargo,

los peces adultos de hasta 1 año pueden verse afectados (Ahne *et al.*, 2002; Iowa State University, 2007).

Uno de los factores ambientales cruciales para que se desencadene un brote, es la temperatura (Fijan, 1972). Si las temperaturas son menores a los 17-18°C se iniciará la signología clínica (Ahne, 1986; Fijan N, 1999; Ahne *et al.*, 2000; OIE, 2009) y al descender entre los 10 y 11° C se incrementará la mortalidad (Baudouy *et al.*, 1980 a y b). Estas fluctuaciones de temperatura se presentan durante la primavera con picos altos en abril, en el verano en los meses de junio y noviembre, cuando inicia el invierno que es cuando se presentan los brotes (Wolf, 1988; Pfeil y Bath, 1978). Al ser estos organismos poiquiloterms o sea que mantienen la temperatura corporal igual a la ambiental si hay una disminución en la temperatura del agua, provocará que la respuesta inmune disminuya y aunque la replicación viral es lenta, la enfermedad es fatal presentándose los signos clínicos y la mortalidad (Baudouy *et al.*, 1980a,b y c; Jeney y Jeney, 1995).

Otros factores que son frecuentes y que contribuyen a que se presenten enfermedades en las producciones acuícolas son las malas prácticas sanitarias, la mala calidad del agua, sobrepoblación, el exceso de manejo y la mala nutrición, que ocasionan estrés y desarrollo de la enfermedad (Jeney y Jeney, 1995; Wolf, 1988; Stankiewicz, 1979).

1.6 PATOGENIA DE vVPC

El vVPC al estar infectando a los peces causa inmunosupresión y los agentes bacterianos secundarios como *Aeromonas* sp. y *Pseudomonas* sp. que se encuentran en el agua, también intervienen afectando a los peces

conformando un complejo virus bacteria (Fraire, 1978; Cahil, 1990; Cipriano, 2001).

La VPC tiene dos presentaciones (Wolf, 1988): la forma aguda o ascítica que está asociada con el *Rhabdovirus carpio* (Fijan *et al.* 1971) y la forma crónica o ulcerativa conocida como la eritrodermatitis de la carpa que es provocada por el *Rhabdovirus carpio* y *Aeromona salmonicida* o *A. hydrophila* (Bootsma *et al.*, 1977). Las lesiones vasculares observadas por vVPC y *A. hydrophila* son similares pudiendo confundir el diagnóstico (Wolf, 1988; Stoskopf, 1993; Fijan, 1999; y OIE, 2009).

La transmisión de la VPC puede darse de tres maneras: horizontal, vertical o a través de vectores (Wolf, 1988; Ahne *et al.*, 2002 y OIE, 2009). La forma horizontal puede ser directa o indirecta, la forma directa es a través del contacto con peces enfermos que muestran signos clínicos o pústula con trasudado en el tegumento. Sin embargo, puede haber peces que sean portadores asintomáticos, que portan al virus pero que no presentan signos clínicos o lesiones.

La forma indirecta es por el factor abiótico, el agua; los viriones son excretados en las heces, orina ó moco branquial y son diseminados en el agua pudiendo sobrevivir a los 10°C por 5 semanas o durante más de 6 semanas en el fango del estanque a 4°C. (Ahne 1982; Ahne *et al.*, 2002; OIE, 2009).

Otra forma de transmisión es la vertical, donde el vVPC se ha encontrado en el fluido ovárico de algunos peces y se ha asociado con los huevos, aunque parece no ser una forma de transmisión importante (Wolf, 1988; OIE, 2009). Un ensayo usando fluido seminal y ovárico en carpas asintomáticas de 5 – 10 años

de edad, demostró escasas partículas virales en estas muestras (Békesi y Csontos, 1985).

Por otro lado, el vVPC puede ser inoculado por vectores que transmiten al virus pasivamente, como parásitos, crustáceos (*Argulus foliaceus*) (Pfeil 1977; Ahne 1985a), la sanguijuela *Piscicola geometra* y otros artrópodos (Ahne, 1985a; OIE, 2009). Otros vectores potenciales son las aves ictiófagas, como la garza *Ardea cinerea* que mantiene al virus hasta 120 minutos después de la ingesta (Peters y Neukirch, 1986).

Por otro lado, debido a que en la mayoría de las granjas no se toman las medidas sanitarias adecuadas, el virus puede ser dispersado hacia los estanques en los utensilios de limpieza como redes, contenedores para transportar peces e inclusive en los uniformes o botas del personal mal desinfectados (Ahne et al, 2002; OIE, 2009).

El periodo de incubación de la enfermedad experimentalmente es de 7 – 15 días. El virus es excretado en heces, orina ó moco branquial hacia el agua, entrando así en contacto con el epitelio branquial, que es el primer sitio anatómico donde se replica el virus a las dos horas post-infección (h.p.i.). Debido a que las branquias son un tejido muy vascularizado, el virus se disemina vía sanguínea (viremia) a los 5 días post-infección (d.p.i) e invade órganos y tejidos, como el bazo, hígado, encéfalo y riñón. Entre los 7 a 10 d.p.i., se replica en el endotelio vascular, en el tejido hematopoyético y en el riñón (Ahne, 1978).

Aproximadamente entre los 8-11 d.p.i los signos clínicos que se muestran son: insuficiencia respiratoria, letargia, se mantienen en el fondo de los estanques,

nado errático, pérdida de equilibrio e hiperactividad esporádica (Ahne, 1978; OIE, 2009).

A los 15-20 d.p.i, se aprecian las lesiones macroscópicas evidenciándose el oscurecimiento de la piel, exoftalmia, branquias pálidas, aletas deshilachadas en algunos peces, abdomen distendido, abundante líquido ascítico sanguinolento, heces gruesas y largas con moco, prolapso y edema del coprodéo (Wolf, 1988; Ahne, 1978; Fijan 1999; OIE, 2009).

En la piel se observan numerosas Petequias (Ahne *et al.*, 2002 y OIE, 2009) y la presencia de pústulas.

Las branquias muestran también numerosas Petequias y cambios degenerativos. En pocas ocasiones se han apreciado cuerpos de inclusión intracitoplásmicos eosinofílicos en el epitelio branquial (Wolf, 1988; Woo y Brunol, 1999).

En el encéfalo y cámara anterior del ojo hay hemorragias y edema (Osadcaja y Ruderho, 1981).

Con respecto al músculo esquelético, se aprecian zonas de hemorragia y abundante edema (Woo y Brunol, 1999; OIE, 2009); mientras que el músculo cardíaco presenta degeneración hialina, necrosis (OIE, 2009), miocarditis y pericarditis (Wolf, 1988 y Woo y Brunol, 1999).

El hígado muestra cambios degenerativos de las paredes vasculares, reacción inflamatoria y abundante edema. En el parénquima hepático se aprecian numerosos focos de degeneración y necrosis, abundante edema e infiltrado inflamatorio constituido por histiocitos y linfocitos (Negele, 1977).

En el páncreas se observa necrosis y reacción inflamatoria linfocitaria (Negele, 1977) o heterofílica (Wolf, 1988; Woo y Brunol, 1999).

El tejido adiposo que se encuentra en la cavidad celómica puede presentar cambios degenerativos y abundante edema y en el peritoneo parietal y visceral se observa reacción inflamatoria, los vasos linfáticos se encuentran dilatados y en su luz macrófagos y linfocitos (Negele, 1977). En el estómago se aprecia gastritis catarral (Osadcaja y Ruderho, 1999) y en el intestino hay perivasculitis y edema severo (Negele, 1977), necrosis, descamación del epitelio y atrofia de vellosidades (Osadcaja y Ruderho, 1999).

El bazo muestra hiperemia severa con hiperplasia del tejido reticuloendotelial, linfoide y de los centros melanomacróforos (Negele, 1977) y esplenitis (Osadcaja y Ruderho, 1999). Además, se observa almacenamiento de lipofuscina en siderocitos, necrosis e inflamación (Negele, 1977).

En el riñón se llegan a apreciar lesiones necróticas en el tejido excretor y en el hematopoyético. Los túbulos renales (tejido excretor), presentan cilindros hialinos que corresponden a la presencia de abundante proteína, cambios degenerativos y vacuolas en el epitelio tubular (Negele, 1977; OIE, 2009).

Una de las lesiones más característica de esta enfermedad se localiza en el epitelio de la vejiga natatoria, donde se observa hiperplasia, hemorragias (Negele, 1977; Ahne *et al.*, 2002; OIE, 2009) y los vasos sanguíneos de la submucosa se encuentran dilatados con infiltrado linfocitario y edema (Negele, 1977; OIE, 2009).

En la literatura se menciona que durante la replicación pueden apreciarse cuerpos de inclusión intracitoplásmicos en el epitelio branquial y en los túbulos renales con cambios degenerativos y detritus asociados a la necrosis (Wolf, 1988; Woo y Brunol, 1999).

Como se mencionó, las lesiones histológicas en su mayoría son de tipo vasculares, hiperemia y hemorragias, necróticas e inflamatorias. Al afectarse los vasos sanguíneos, branquias y riñón hay un desbalance iónico y en la mayoría de los casos los peces mueren a los 20 d.p.i. (Ahne, 1977; Ahne, 1978; OIE, 2009).

1.7 PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

Debido a que la acuicultura en México, es de suma importancia a nivel económico, surgió el interés de estudiar las enfermedades certificables virales, que ocasionan alta mortalidad y cuantiosas pérdidas económicas como es el caso de VPC.

En México, las enfermedades virales no se habían estudiado, debido a que no se contaba con pruebas diagnósticas aceptadas por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). En el 2001, hubo un brote de Necrosis Pancreática Infecciosa asociado a un birnavirus, que afectó a la truticultura nacional, ocasionando cuantiosas pérdidas económicas debido a la elevada mortalidad de crías y alevines (Salgado, 2006). Debido a esto, se vio la necesidad e importancia de implementar pruebas diagnósticas permitidas por la OIE como son el aislamiento viral, pruebas serológicas y moleculares para identificar a los agentes virales (OIE, 2009). Por lo anterior, surgió el interés de estandarizar las pruebas diagnósticas para Viremia Primavera de la Carpa (VPC) para determinar si está presente en el país.

Existen dos tipos de pruebas diagnósticas, las directas y las indirectas. Las primeras se refieren a pruebas que demuestren la presencia del agente etiológico como el aislamiento, PCR, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia

e hibridación "*in situ*". Las pruebas indirectas son las serológicas que demuestran la reacción del organismo en contra del agente, entre las que se encuentran el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inhibición de la hemoaglutinación, aglutinación en placa, virus sueroneutralización y fijación del complemento.

Según el Manual de pruebas diagnósticas para organismos acuáticos de la OIE, el diagnóstico debe de ser confirmado mediante el aislamiento viral, pero tiene la desventaja de que es tardado, costoso de implementar, se necesita experiencia para identificar los efectos citopáticos y no es confiable al utilizar muestras autolisadas. Por lo que, es necesario verificar el resultado del aislamiento, empleando la prueba de inmunofluorescencia o ELISA monoclonal o policlonal en tejidos de animales sospechosos. El manual indica que dichas pruebas de diagnóstico son suficientes para iniciar medidas de control y deberán ser confirmadas con virus neutralización, RT-PCR y secuenciación.

Por lo que el PCR y RT-PCR, se ha empleado cada vez más en el diagnóstico de enfermedades de especies acuícolas (Cunningham, 2002), debido a que es una prueba sensible, específica, segura y una vez implementada no es tan costosa y es fácil de realizar (OIE, 2004).

No obstante lo anterior, en la RT-PCR pueden surgir dudas si los resultados negativos realmente sean por la ausencia del virus debido a que durante la extracción del ARN de las muestras clínicas, se contamine con inhibidores como grasa, hemoglobina y enzimas que impidan la amplificación, que ocurran errores durante la extracción de los ácidos nucleicos, en la mezcla de los reactivos o durante el RT-PCR por mal funcionamiento del termociclador o que hayan variaciones en la ejecución de los ciclos de RT-PCR o pobre actividad

de la ADN polimerasa (Hoofar *et al.*, 2004; Villanova *et al.*, 2007; Adams y Thompson, 2008; Cunningham, 2002) por lo anterior, se requiere de la validación de un método molecular con un CI (Adams y Thompson, 2008) que evite la posibilidad de obtener resultados falsos negativos, éste debe ser estable, económico al producirse, no infeccioso, ausente en las muestras clínicas y capaz de verificar la eficiencia del procedimiento en cada uno de los pasos (Niesters, 2004; Pasloske *et al.*, 1998).

Por lo anterior, se deben de emplear controles internos que son cualquier secuencia de ADN o ARN presente en el tubo para PCR o RT-PCR, que debe ser coamplificado junto con las muestras clínicas. Esta señal control, siempre debe de ser producida a pesar de que no se amplifique el producto de la muestra.

Existen dos tipos de controles internos, los competitivos y los no competitivos. En los competitivos se utilizan iniciadores compuestos y éstos son amplificados usando un solo juego de iniciadores y son sometidos a las mismas condiciones en el mismo tubo de PCR. Para evitar la competencia entre el iniciador de la muestra y el del control interno, resultando en la inhibición o unión de ambos productos por los iniciadores, es necesario modificar la concentración de ambos iniciadores. La concentración de la muestra debe ser menor y el tamaño de la secuencia del control interno debe ser mayor, para evitar así la competencia entre ambas secuencias (Hoofar *et al.*, 2004).

En los no competitivos, las secuencias de la muestra y el control interno son amplificados usando juegos de iniciadores, diferentes para cada uno. Esto requiere que se realicen dos reacciones del PCR o RT-PCR con diferente cinética y que procedan simultáneamente (Hoofar *et al.*, 2004).

Debido a lo anterior, se diseñó un control interno de tipo competitivo, para verificar los resultados que serán emitidos a partir del RT-PCR para el diagnóstico de vVPC. Se decidió emplear en el cuerpo del control interno, el gen de la proteína verde fluorescente, que al estar clonado en un vector de expresión, en dirección con respecto al promotor/enhancer del citomegalovirus (pCMV), se verificará la eficiencia de la transfección por lipofectamina en células Hela a partir de la expresión de la proteína verde fluorescente y se generará una gran cantidad de ARNm que será empleado como control interno.

2.0 JUSTIFICACIÓN

En el 2001, en el estado de México, se identificó un brote asociado con el birnavirus de la necrosis pancreática infecciosa (vNPI) en truchas (Salgado, 2001), que motivó el interés de identificar otras enfermedades certificables como VPC, que afecta a la carpa que es una especie de importancia económica en el país. Un brote, podría diseminarse con facilidad en el territorio nacional y ocasionar 70-90% de mortalidad, provocando cuantiosas pérdidas. Lo anterior es factible, debido a que no hay un manejo sanitario adecuado en la mayoría de las granjas y a que muchas especies de peces ornamentales, huevo y crías, son de importación como es el caso de las carpas Koi y los peces japoneses. Muchos de los peces importados pasan por los Estados Unidos de América y Canadá en los cuales, desde el 2002 ha habido reportes de VPC (Goodwin, 2002; Dikkeboom *et al.*, 2004; Garver, 2007). En el país, no existen pruebas diagnósticas como el aislamiento viral o pruebas moleculares que confirmen que efectivamente los peces están libres de enfermedades. Así mismo, se requiere implementar nuevas regulaciones sanitarias, que incluyan la toma de muestras para la detección de animales enfermos y portadores asintomáticos. Por otro lado, en varias granjas y estanques rurales se desarrollan policultivos, en los cuales se mezclan tanto especies de producción como ornamentales, éstas últimas importadas, las cuales en ocasiones son utilizadas para repoblación de cuerpos de agua naturales pudiéndose introducir y dispersar numerosas enfermedades.

Debido a que no se han realizado estudios para determinar si existen enfermedades virales en los ciprínidos de México y a que se han identificado algunos peces con signos clínicos y lesiones sugerentes a la vVPC, surgió el

interés de realizar el presente estudio para la implementación de técnicas diagnósticas sensibles, rápidas y económicas.

3.0 HIPOTESIS

Si se implementara la prueba de RT-PCR con controles internos para el diagnóstico de la Viremia Primaveral de la Carpa, entonces se podrá evaluar su presencia en ciprínidos de producción y ornamentales.

4.0 OBJETIVO PRINCIPAL

Identificar al virus de la viremia primaveral de la carpa en granjas sospechosas de los estados de México e Hidalgo, México mediante histopatología, ELISA y RT-PCR.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- I) Realizar histopatología para identificar lesiones sugerentes a VPC.

- II) Verificar los hallazgos histopatológicos de las muestras de carpas por ELISA.

- III) Construir un control interno competitivo, constituido por el gen de la proteína verde fluorescente flanqueado con fragmentos del gen de la glucoproteína de vVPC.

- IV) Diagnosticar por RT-PCR al vVPC a partir de muestras clínicas de carpa.

- V) Realizar cultivos bacteriológicos para evaluar que las lesiones puedan estar asociadas con *Aeromonas* sp., debido a que las lesiones de estas bacterias son semejantes a las del vVPC.

5.0 MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 MUESTREO

Las colectas se realizaron en 7 granjas, capturando en total 258 ciprinidos de diferentes variedades (barrigona, espejo, plateada, koi y japoneses) elegidos al azar y sin importar el sexo. Las carpas colectadas eran de centros de producción de cría y de engorda, cultivados, en el Estado de México, municipios de Tiacaque (TIA) y Villa Victoria (VV) e Hidalgo, municipio de Tezontepec de Aldama I (TAI) y II (TAII), localidades de Chilcuautla (CH), Tunititlán (TUN) y Mangas (LM). El objetivo de la colecta fue verificar o descartar una posible infección viral, ya que en las historias clínicas referían mortalidades, signos clínicos y lesiones macroscópicas sugerentes de la infección por rhabdovirus de la VPC (Cuadro 1).

Cuadro1. Número de peces y especies de carpas colectadas en granjas del Estado de México e Hidalgo, México.

GRANJA	ESTADO	NÚMERO DE PECES	VARIEDAD DE CARPA
Tezontepec de Aldama I (TAI)	Hidalgo	24	Barrigona, espejo y koi
Tezontepec de Aldama II (TAII)	Hidalgo	80	Barrigona y espejo
Chilcuahutla (CH)	Hidalgo	24	Barrigona y espejo
Tunititlán (TUN)	Hidalgo	15	Barrigona, espejo y koi
La Manga (LM)	Hidalgo	20	Japoneses y Koi
Tiacaque (TIA)	Estado de México	70	Plateada
Villa Victoria (VV)	Estado de México	25	Barrigona

5.2 NECROPSIAS E HISTOPATOLOGÍA

A los responsables de las granjas se les preguntó la historia clínica y si los peces habían mostrado signos clínicos de enfermedad. Para el sacrificio se le agregó al agua benzocaína (5 mg/L) (Stoskopf, 1993). Se realizaron las necropsias de acuerdo a los métodos descritos por Stoskopf, 1993 y Noga, 1996 y se documentaron las lesiones macroscópicas.

Para el estudio histopatológico se emplearon 10 peces de cada granja. Durante las necropsias realizadas en las carpas de 6 granjas se obtuvieron todos los órganos y tejidos. De las granjas de TA II fueron remitidas crías de carpa para el estudio histopatológico y debido al tamaño que presentaban los peces (0.8 cm) se fijaron, inyectándoles formalina a la cavidad celómica. La formalina empleada para preservar los tejidos se utilizó al 10 % amortiguada a pH de 7.2 y se dejaron las muestras en fijación durante 24 horas.

Para la fijación se realizaron cortes de los órganos con un tamaño aproximado de 1 cm³ y los cuerpos completos de las crías se cortaron longitudinalmente. Las secciones de los tejidos se colocaron en cápsulas previamente etiquetadas, fueron procesados por la técnica histológica de rutina, se realizaron cortes con microtómo a 3-4 micrómetros de grosor y fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina (H-E) para su posterior revisión en el fotomicroscópio y documentar las lesiones histológicas.

El estudio histopatológico se realizó para identificar a los organismos que presentaran lesiones microscópicas sugerentes de un proceso viral.

También durante la necropsia, el riñón y el bazo de todos los organismos se dividieron en 3 partes: una para realizar el estudio histopatológico, los otros dos se emplearon en las pruebas de ELISA y RT-PCR. Para estos últimos dos

estudios, las muestras de tejido fueron colocadas en tubos estériles y congeladas a -70°C hasta su procesamiento.

5.3 ENSAYO INMUNOABSORBENTE LIGADO A ENZIMAS (ELISA) SANDWICH POLICLONAL

Se empleó en el presente estudio, el juego de reactivos Test-Line Ltd. Clinical Diagnostics 001/2000/CPVP siguiendo el procedimiento de acuerdo a las instrucciones del fabricante de captura de antígeno policlonal. El estuche incluye un blanco, un testigo positivo y negativo. Para la validación e interpretación de resultados ver anexo 1.

Para detectar peces infectados por el vVPC mediante la prueba de ELISA se realizó un “pool” de bazo y riñón de los peces pertenecientes a las granjas de (TAI), (TAII), (TU) y (LM) del Estado de Hidalgo y (TI) y (VV), del Estado de México, así como de las crías completas pertenecientes a TAII. Para la preparación de las muestras, los órganos y los cuerpos de las crías completas fueron homogeneizados en tubos colocando 3 g de muestra en 3-5 volúmenes de PBS pH 7.2 y fueron almacenados a -20°C hasta realizar la prueba. Los homogeneizados fueron centrifugados a 2000 g por 5 minutos y los sobrenadantes se emplearon para la prueba.

5.4 CULTIVO BACTERIOLÓGICO

Con hisopos estériles, se tomaron muestras de “pool” obtenidas de la cavidad celómica de 10 carpas por granja. Las muestras fueron colocadas en medio de Stuart y se enviaron al Departamento de Microbiología e Inmunología, de la

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para su análisis bacteriológico general.

5.5 DISEÑO DEL CONTROL INTERNO Y REACCIÓN EN CADENA A LA POLIMERASA (PCR)

5.5.1 DISEÑO DE INICIADORES

Se diseñaron 2 juegos de iniciadores sentido y contrasentido (Invitrogen) tomando como base distintas secuencias obtenidas del GENBANK. El primer par amplifica el gen que codifica para la proteína verde fluorescente en verde y fueron diseñados a partir de la secuencia del vector pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO (pcPVF). Este juego de iniciadores, contienen además en los extremos dos segmento del gen que codifica para la glucoproteína del vVPC en rojo (Genbank número de acceso U18101). El segundo par de iniciadores corresponden únicamente a la secuencia adicionada con el primer par al gen de la proteína verde fluorescente (en rojo con número de acceso U18101). A continuación se muestran las secuencias, concentración inicial y el tamaño de cada uno (Cuadro 2).

Cuadro 2. Nombre de los iniciadores para PCR y RT-PCR, tamaño en pares de bases, concentración inicial y secuencias empleadas para obtener el control interno y para ser empleado con las muestras clínicas de carpas.

NOMBRE DEL INICIADOR	SECUENCIA	TAMAÑO (pb)	CONCENTRACIÓN INICIAL (nmol)
VSP-GFP-1	5´TCTTGGAGCCAAATAGCTCAAGCTTTTGTAGAGCTCATCCA	40	22.8
VSP-GFP-2	5´AGATGGTATGGACCCCAATACATCATGGCCAGCAAAGGAG	41	49.1
VSP-1	5´AGATGGTATGGACCCCAATACATC	24	35.0
VSP-2	5´TCTTGGAGCCAAATAGCTCAA	21	40.2

5.5.2 OBTENCION DEL GEN DE LA PROTEINA VERDE FLUORESCENTE

Se empleó el plásmido de expresión pcDNA 3.1/CT-GFP TOPO (pc-PVF) (Invitrogen), el cual contiene el gen de la proteína verde fluorescente de 720 pares de bases. En la Figura 2, se observa parte de la secuencia nucleotídica de este vector y se indica el sitio de clonación de secuencias de ADN y el marco de lectura de la proteína verde fluorescente, en la figura 3, se observa el mapa con los componentes que integran a este vector.

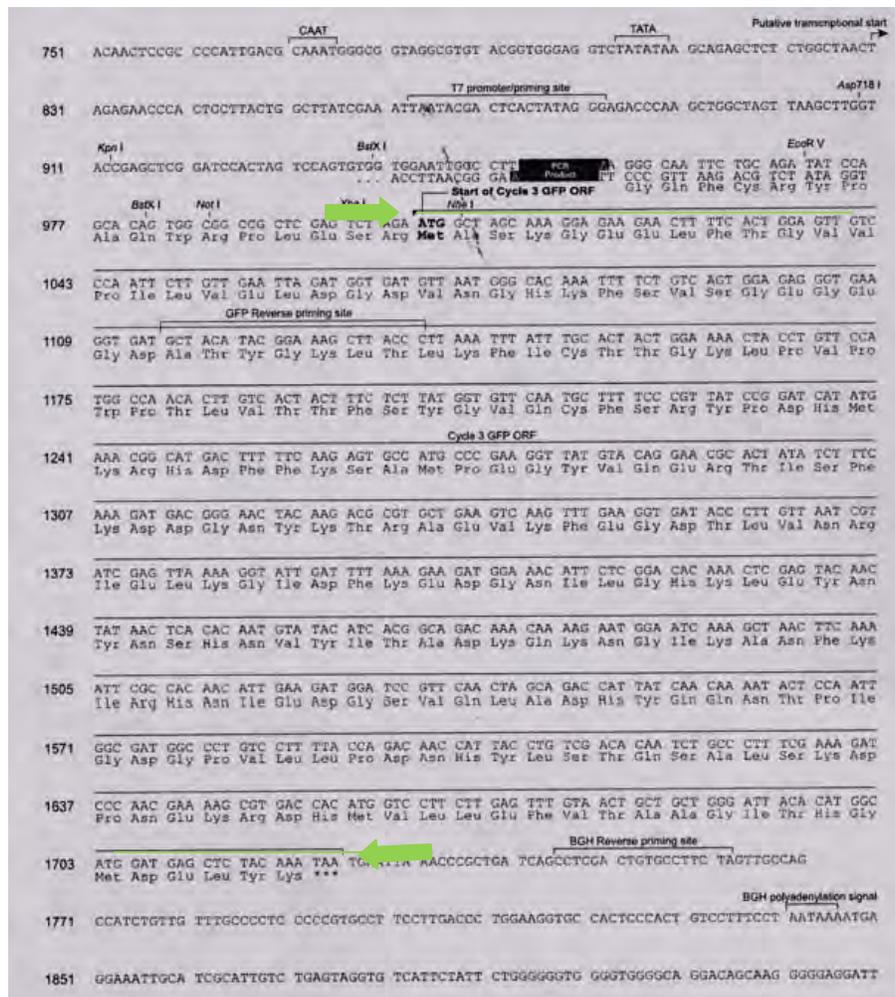


Figura 2. Secuencia nucleotídica y de aminoácidos de la proteína verde fluorescente.

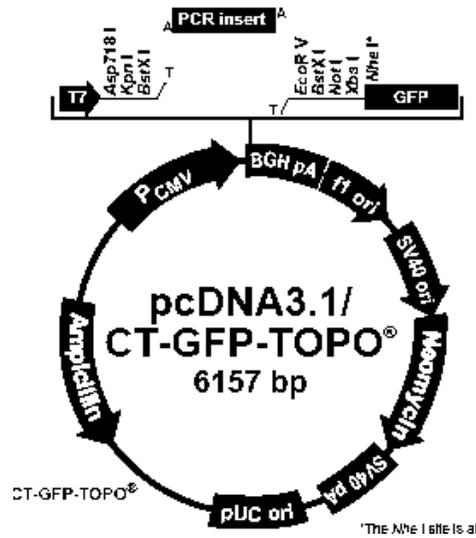


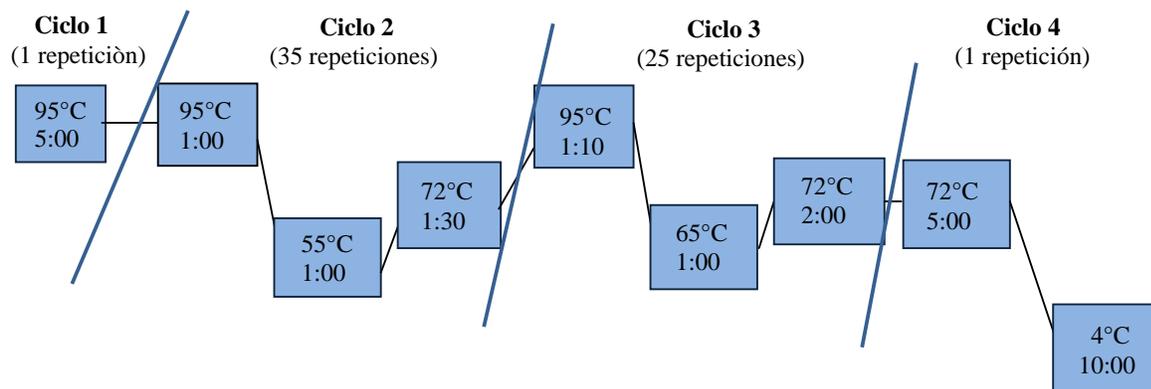
Figura 3. Mapa del plásmido de expresión pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO.

Este vector fue transformado en una cepa de *E.coli* y el plásmido fue extraído por medio de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 2002). Una vez purificado, el ADN plasmídico se visualizó por medio de electroforesis empleando geles de agarosa al 1.2% teñidos con Bromuro de etidio (Br-E).

5.5.3 REACCIÓN EN CADENA A LA POLIMERASA (PCR)

Se realizó el PCR (Figura 4) agregando el plásmido recombinante pc-PVF como templado y los iniciadores compuestos (VPC-PVF-1 y 2), con el fin de obtener el control interno competitivo (CI-VPC-PVF-VPC) de 801 pb, que corresponde al gen de la proteína verde fluorescente flanqueado por fragmentos del gen de vVPC (CI VPC-PVF-VPC). Para ello, se mezclaron los siguientes reactivos en tubos para PCR: 45 µl de Supermix (Invitrogen), 2µl del plásmido pc-PVF, 2µl de cada uno de los Iniciadores compuestos VSP-GFP-1 y 2. Las condiciones empleadas en esta PCR se indican en la Figura 4.

Figura 4. Condiciones de la Reacción en Cadena a la Polimerasa empleando iniciadores compuestos VSP-GFP-1 y VSP-GFP-2 para obtener el CI VPC-PVF-VPC.



El producto obtenido de esta reacción fue visualizado empleando electroforesis en geles de agarosa al 1.2% teñidos con bromuro de etidio, como marcador de peso molecular se empleó lambda *Hind III* (Invitrogen).

5.5.4 CLONACIÓN Y TRANSFORMACIÓN QUÍMICA DEL PLÁSMIDO pcDNA 3.1 V5-His-TOPO

El CI VPC-PVF-VPC fue clonado en el vector pcDNA 3.1 V5-His-TOPO (pcV5). Con esta construcción se realizó una segunda PCR empleando como templado el pcV5 y los iniciadores VPC 1 y 2 (Figura 5). El producto obtenido fue visualizado por electroforesis. El plásmido de expresión pcDNA 3.1 V5-His-TOPO (pc-V5) (Invitrogen) entre sus características presenta río arriba al sitio de clonación el promotor/enhancer del citomegalovirus (pCMV) (Figura 6), esto será útil posteriormente, cuando se realice la transfección en células eucariontes (Hela) y se produzca gran cantidad de ARNm, permitiendo la expresión eficiente y de alto nivel del CI VPC-PVF-VPC.

Figura 5. Condiciones de la Reacción en Cadena a la Polimerasa empleando iniciadores VPC-1 y VPC-2 para comprobar la amplificación del CI con el mismo juego de iniciadores para las muestras clínicas de carpa.

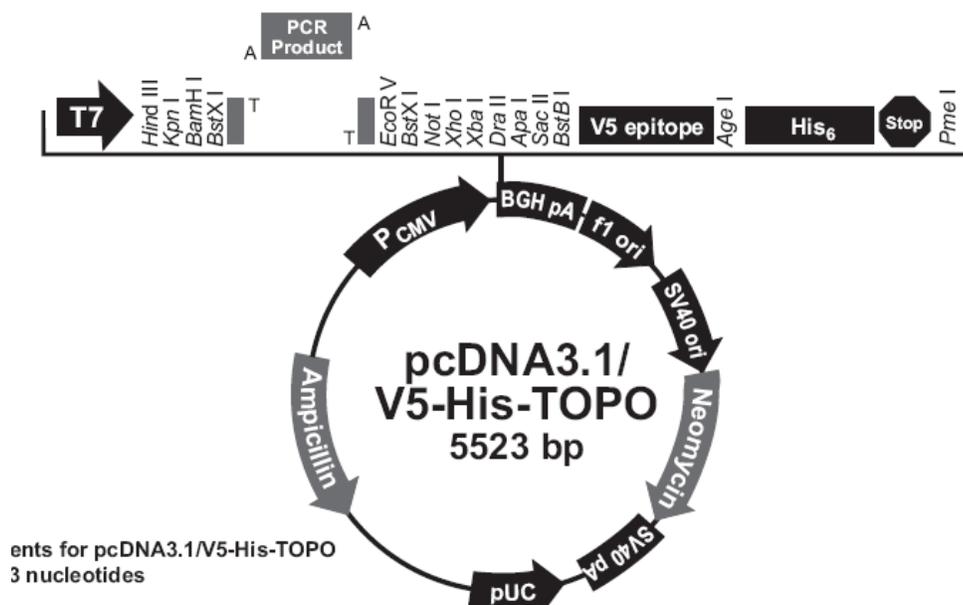
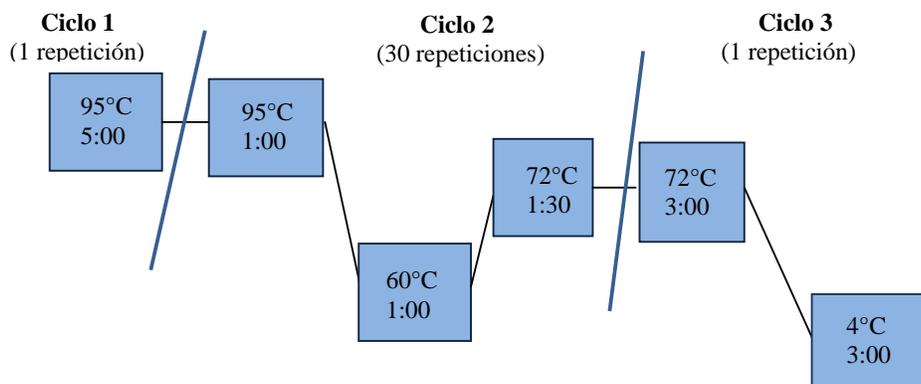


Figura 6. Componentes del plásmido de expresión pcDNA3.1V5-His-TOPO.

5.5.5 VERIFICACIÓN DEL SENTIDO DEL CI VPC-PVF-VPC EN EL SITIO DE CLONACIÓN DEL PLÁSMIDO pcDNA3.1 V5-His TOPO

Para la verificación del sentido en el cual se encontraba el CI VPC-PVF-VPC en el sitio múltiple de clonación, con respecto al promotor/enhancer del citomegalovirus humano (pCMV) componente de pc-V5, se empleó un nuevo iniciador denominado de dirección diseñado con el programa DNAMan, cuya secuencia es 5´ GGATCCACTAGTCCAGTGTGG 3´. Con este iniciador se realizó PCR empleando como templados los pcV5 transformantes (CI VPC-PVF-VPC) y los iniciadores que amplifican el control interno. Los productos obtenidos fueron visualizándose en geles de agarosa al 1.2%, teñidos con Br-Et. Una vez que se identificó que el CI VPC-PVF-VPC estuviese en dirección en el sitio de clonación del pc-V5, a partir de los cultivos de LB sólido con ampicilina se tomaron 4 colonias y se realizó crecimiento en medio LB líquido. Después se hizo lisis alcalina maxipreparación según Sambrook *et al.*, 2002, para obtener abundante cantidad de pcV5 transformante. Una vez purificado se realizó electroforesis, visualizándose en gel de agarosa al 1.2% teñido con Br-Et. Este mismo vector fue purificado empleando el sistema comercial “pure link quick plasmid miniprep” (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del manual. Este vector purificado fue cuantificado por medio de espectrometría a 260 nm.

5.5.6 TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS HELA CON EL PLÁSMIDO RECOMBINANTE CON CI VPC-PVF-VPC:

Se cultivaron células Hela en cajas de cultivo de 25 cm² en el medio mínimo esencial de Eagle´s (MEM) (In Vitro) (L-glutamina 2 Mm, bicarbonato de sodio 0.1 mM, antibiótico 10 mg/ml y 10% suero fetal bovino), hasta alcanzar una confluencia del 80%.

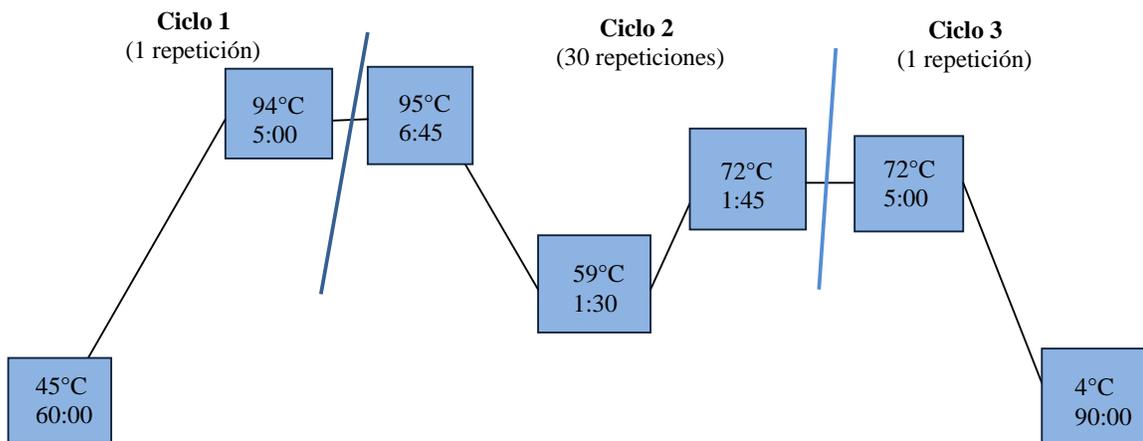
Para la transfección, se empleó lipofectamina LX (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. La reacción de lipofectamina se preparó agregando 24 μ l del vector purificado a una concentración de 5.7 ng/ml, 2.4 μ l de MEM y reactivo de lipofectamina LX 1.4 μ l y se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente, se agregaron 2.8 μ l de lipofectamina LX y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Del cultivo de monocapa se retiró el MEM y se realizaron 3 lavados con PBS pH 7.4. La mezcla de transfección se agregó al cultivo de células Hela, revolviéndose suavemente e incubándose a 37°C y con 5% de CO₂. A las seis horas se retiró la mezcla de la transfección de la caja de cultivo de células Hela y se agregaron 5 ml de MEM enriquecido nuevo con antibiótico dejándose incubar por 24 horas. Al completarse la incubación, las células transfectadas fueron observadas bajo un microscopio de fluorescencia empleando luz azul que corresponde a 495 nm para emitir bioluminiscencia verde.

5.5.7 EXTRACCIÓN DEL ARNm A PARTIR DE CÉLULAS HELA TRANSFORMADAS Y RT-PCR EMPLEANDO INICIADORES DE VPC 1 Y 2.

Una vez evaluada la eficiencia de la transfección por lipofectamina, se requería verificar si durante la transcripción *in vitro*, el promotor/enhancer del citomegalovirus (pCMV) había generado la cantidad suficiente de ARNm (CI VPC-PVF-VPC) y que la expresión de las proteínas no haya sido modificada durante la traducción preservándose la formación del CI VPC-PVF-VPC en las células Hela. Para verificarlo, se realizó la extracción del ARNm de las células Hela transfectadas a partir de una caja de 25 cm², empleando Trizol (Invitrogen) (Maldonado, 2009) y se verificó la concentración por

espectrofotometría a partir del producto final de las extracciones del ARNm de las células Hela transfectadas, para obtener la concentración adecuada para ser empleado como CI junto con las muestras clínicas de carpa. Después se realizó el RT-PCR (Figura 7), agregando los siguientes reactivos: cuanto baste para 50 µl agua con DEPEC, 2 µl de ARNm de Hela transfectadas (605 ng), 1 µl Iniciador VPC-1 (35 nmol), 1 µl Iniciador VPC-2 (40.2 nmol), 4 µl solución amortiguadora 5X (Invitrogen), 1.5 µl MgCl₂, 2 µl dNTPs (Invitrogen), 1µl DTT, 1U Taq polimerasa (Invitrogen), 100 U Transcriptasa reversa Superscript II (Invitrogen), utilizando los iniciadores de VPC-1 y VPC-2 para obtener un amplificado de 801 pb que corresponderá al CI VPC-PVF-VPC y se realizó electroforesis de gel de agarosa 1.2% teñido con Br-Et.

Figura 7. Condiciones de la Transcriptasa reversa-Reacción en cadena a la Polimerasa empleando los iniciadores para VPC 1 y 2.



Posteriormente, para conocer el límite inferior de la amplificación del CI VPC-PVF-VPC para ser usado como control interno competitivo, se realizó dilución doble seriada del ARN de la extracción y RT-PCR (Figura 7) agregando los siguientes reactivos: cuanto baste para 50 µl agua con DEPEC, 5 µl de CI

VPC-PVF-VPC (663 ng), 1 µl Iniciador VPC-1, 1 µl Iniciador VPC-2, 4 µl Solución amortiguadora 5X (Invitrogen), 1.5 µl MgCl₂, 2 µl DNTPs (Invitrogen), 1 µl DTT, 1 U Taq polimerasa (Invitrogen), 100 U Transcriptasa reversa Superscript II (Invitrogen). Una vez finalizado el RT-PCR se hizo electroforesis con gel de agarosa al 1.2%.

5.5.8 EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS CLÍNICAS

Se realizó "pool" de las muestras de riñón y bazo de los peces obtenidos de cada una de las granjas, realizando macerados con 50 a 100 mg de los tejidos. Las muestras se centrifugaron a 12,000 g por 10 minutos a 4°C. Después de retirar el sobrenadante, se agregó Trizol (Invitrogen) para realizar la extracción de ARN (Maldonado, 2009) a partir de las muestras de carpa colectadas de las 7 granjas y cada extracción fue cuantificada por espectrofotometría.

5.5.9 TRANSCRIPTASA REVERSA-REACCIÓN EN CADENA A LA POLIMERASA EMPLEANDO LAS MUESTRAS CLÍNICAS Y EL CI VPC-PVF-VPC

Por último, se realizó el RT-PCR de un solo paso estandarizado por Maldonado E., 2009 empleando los iniciadores para VPC 1 y 2 (Figura 6), con los siguientes reactivos: cuanto baste para 50 µl agua con DEPEC, 2 µl de ARN de las muestras, 5 µl de CI VPC-PVF-VPC, 1 µl Iniciador VPC-1, 1 µl Iniciador VPC-2, 4 µl solución amortiguadora 5X (Invitrogen), 1.5 µl MgCl₂, 2 µl DNTPs (Invitrogen), 1µl DTT, 1 U Taq polimerasa (Invitrogen),100 U Transcriptasa reversa Superscript II (Invitrogen). Estos se analizaron por electroforesis empleando gel de agarosa al 1% teñido con Br-Et.

6.0 RESULTADOS

6.1 SIGNOS CLÍNICOS

Los peces colectados en 6 de las 7 granjas no mostraban signos clínicos de enfermedad, en algunos casos solo se apreciaban lesiones macroscópicas. Las carpas barrigonas y espejo, remitidas de la granja de TA II se observaron adelgazadas, mostraban boqueo constante, nado errático. El productor refirió crecimiento lento y mortalidad del 100%.

6.2 HALLAZGOS MACROSCÓPICOS

Las lesiones macroscópicas observadas en los peces de 3 granjas fueron: en la granja del municipio de CHI, manchas blancas opacas de 1 X 2 cm en la piel (Figura 8) y en la misma granja seis organismos presentaban úlceras en la piel de 1.5 X 1 cm en las regiones dorsal y lateral del cuerpo. El borde de las úlceras era rojo oscuro y en el centro se apreciaba un material blanco algodonoso sugerente de infección micótica, además de la presencia de hemorragias equimóticas y en sufusión (Figura 9). En la granja de LM se apreciaron 10 peces con úlceras de 1 X 2 cm con borde de color rojo oscuro en la piel, en 3 de los casos se vio un material blanco algodonoso sugerente de hongos de *Saprolegnia* sp. (Figura 10). Las crías de carpa remitidas de la granja de TA II mostraban exoftalmia unilateral o bilateral, despigmentación de la piel, algunos peces adelgazados, no alcanzaron la talla de 2 cm de longitud total y aumento de volumen de la cavidad celómica (Figura 11). El resto de los peces colectados de las otras granjas no mostraron lesiones macroscópicas.



Figura 8. Carpa barrigona de la granja de la localidad de Chilcuahutla que presenta en la región dorsal del cuerpo una mancha blanca opaca de 1 X 2 cm (flecha) que corresponde al incremento en la producción de moco.



Figura 9. Carpa barrigona con úlcera en la piel de la región lateral izquierda de 1 X 1.5 cm (flecha).



Figura 10. Pez japonés perteneciente a la granja de "La Manga" observándose en la región lateral del cuerpo úlcera de 2 X 3 cm y la presencia de material algodonoso blanco sugerente con *Saprolegnia* sp. (Flecha).



Figura 11. Crías de carpa barrigona que presentan exoftalmia (1), despigmentación de la piel (2), adelgazamiento (3) y aumento de volumen de la cavidad celómica (flecha) pertenecientes a Tezontepec de Aldama II.

6.3 LESIONES HISTOLÓGICAS

En cuatro de las granjas del Estado de Hidalgo (TA I, CHI, TUN y LM) y las del Estado de México (TIA y VV), los peces mostraron lesiones de hiperplasia de células productoras de moco en las branquias y cambios vasculares de telangiectasia leve, multifocal, sugerente de mala calidad del agua. Otras lesiones identificadas en las branquias fueron inflamación leve, difusa por heterófilos (branquitis) e hiperplasia linfoide. Además, se observaron múltiples especies de parásitos como monogéneos *Dactylogyrus* sp., digéneos de *Centrocestus formosanus*, *Trichodina* sp. e *Ichthyophthyrus multifiliis*.

Por otro lado, los diez peces seleccionados al azar para el estudio histopatológico de las granjas CHI, TUN y LM, mostraron múltiples granulomas en el tejido periocular, coroides, branquias, hígado, bazo, páncreas, peritoneo, ovario y miocardio con escasos cortes transversales y longitudinales de nematodos (huevos larvados y adultos). En 3 carpas espejo pertenecientes a la granja de Chilcuahutla se apreciaron en el tejido periocular, bazo y páncreas, numerosos melanomacrófagos y abundante melanina alrededor de los granulomas que contenían parásitos. En las secciones que presentaron granulomas se realizó tinción especial de Ziehl-Neelsen que resultó negativa para bacterias ácido alcohol resistentes.

En una de las granjas de TUN, Estado de Hidalgo y en TIA, Estado de México, se identificaron cestodos de *Bothriocephalus acheilognathi* y nemátodos en la luz de intestino anterior. Por otro lado, también se observó enteritis heterofílica, linfocitaria grave, difusa, hiperplasia linfoide leve, multifocal y alrededor de los parásitos la proliferación de una fina capa de tejido conectivo fibroso. Por

último, en el intestino de las carpas provenientes de la granja de VV, se apreciaron numerosos nematodos.

En la mayoría de los peces, en la mucosa de intestino y riñón se observó necrosis zonal, reacción inflamatoria severa difusa, constituida por numerosos heterófilos, macrófagos y linfocitos además de numerosas estructuras ovoides, ácido periódico de Schiff (PAS) positivas que correspondieron a myxosporidios identificados como *Myxobolus* sp.

De los 80 peces remitidos de la granja de TA II, se tomaron 10 crías de carpa Barrigona y 10 de carpa Espejo al azar y las lesiones microscópicas más relevantes fueron:

En la piel de la superficie corporal y tejido periorcular: dermatitis desde epidermis hasta hipodermis y perioftalmatitis necrótica crónica-activa (reacción inflamatoria constituida por heterófilos, histiocitos y linfocitos), en el 100% de las muestras. Así mismo, en el 70% de las muestras histológicas con miositis necrótica crónica-activa grave, difusa (Fotomicrografía 1). Además, en el 100% de las carpas se observó edema grave, difuso en piel y en un 60% en el músculo esquelético. En el estrato escamoso de la piel en el 60% de las secciones histológicas con hiperplasia leve, difusa y en el 10% en el músculo esquelético con hemorragia extensa.

Por otro lado, en el 60% de los peces, se apreció branquitis necrótica crónica-activa, grave, difusa (Fotomicrografía 2), además de hiperplasia grave del epitelio branquial, causando la fusión de las lamelas secundarias e hiperplasia de las células productoras de moco en un 50% de las muestras y con la presencia de numerosos bacilos Gram negativos en el 70% de las secciones de branquias.

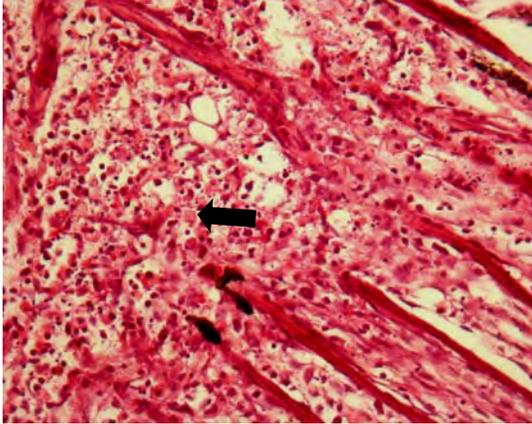
En el 50% de las muestras se observó con hepatitis necrótica crónica-activa moderada, multifocal y la presencia de numerosos cuerpos de inclusión eosinofílicos intranucleares en los hepatocitos (Fotomicrografía 3).

En el 50% de las carpas en el bazo y el 80% en el riñón mostró con linfonecrosis moderada, difusa y en el 30% de ambos tejidos edema leve, difuso. En el riñón en el 60% de los peces revisados, se apreció tubulonefrosis y necrosis glomerular grave, multifocal (Fotomicrografía 4).

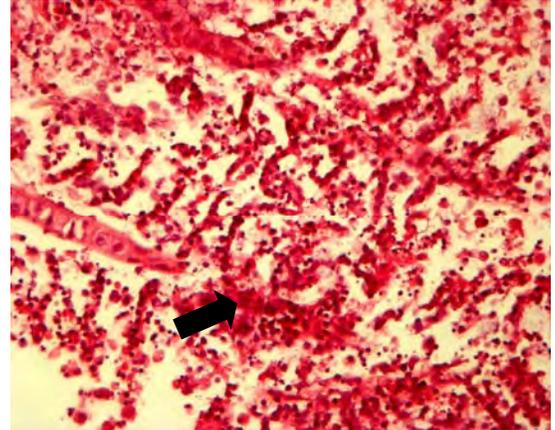
En el tejido gastrointestinal: gastritis en el 20% de las muestras, faringitis y peritonitis en el 80% y enteritis en el 100%, heterófilica en el 70% de los peces y en el 30% crónica-activa, ambas graves, difusas. También se observó necrosis extensa en el intestino abarcando desde la mucosa hasta la submucosa en el 100% de las muestras histológicas revisadas (Fotomicrografía 5), en un 20% en el estómago y 80% en la faringe en este último extendiéndose hasta la muscular. Otra de las lesiones identificadas en el 20% de las muestras de intestino y estómago fue edema leve, difuso y en la faringe extendiéndose hasta el músculo liso, edema de leve a grave, difuso, en el 30% de los peces revisados.

El páncreas con pancreatitis necrótica crónica-activa grave, multifocal, edema moderado en el 60% de las secciones histológicas (Fotomicrografía 6) y en el 10% de las muestras de páncreas se encontraron hemorragias extensas e hiperplasia de los centros melanomacrófagos leve, multifocal.

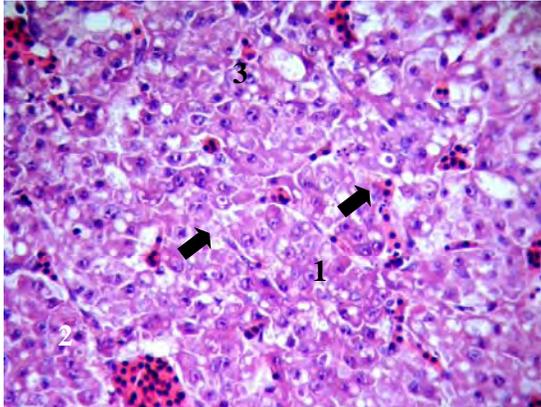
Por último, en un solo organismo se apreció en la coroides con necrosis grave, zonal y en el epicardio del corazón con serositis granulomatosa grave, difusa.



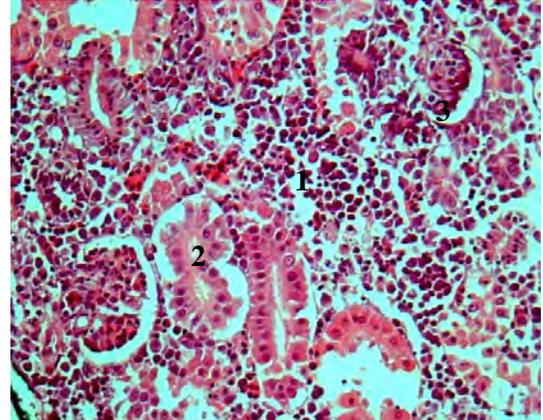
Fotomicrografía 1. Sección de músculo esquelético de la aleta caudal mostrando un área extensa de necrosis y reacción inflamatoria constituida por linfocitos y macrófagos (Flecha) H-E, 500X.



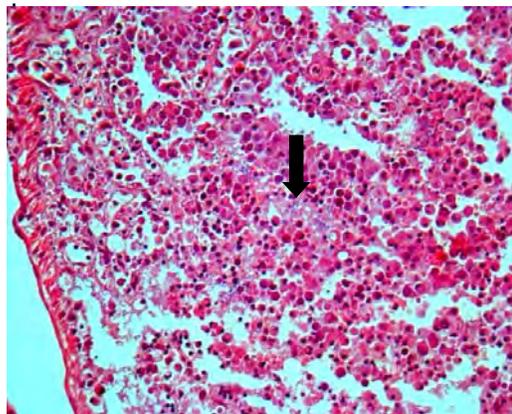
Fotomicrografía 2. Sección de branquias observándose necrosis extensa, grave, difusa, hemorragias y células inflamatorias macrófagos, heterófilos y linfocitos (Flecha) H-E, 500X.



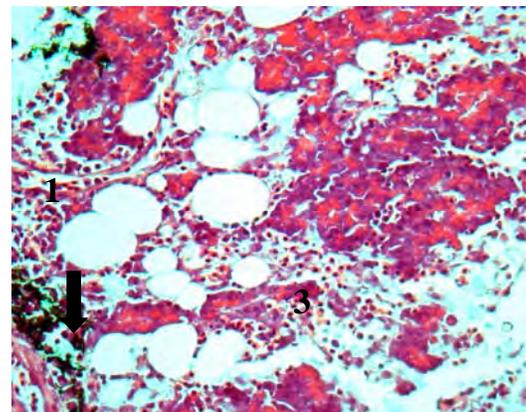
Fotomicrografía 3. Sección de hígado observándose esteatosis hepática leve, escasas áreas de necrosis (1) y la presencia de escasos cuerpos de inclusión eosinófilicos intranucleares (Flecha) H-E, 500X



Fotomicrografía 4. Sección de riñón mostrándose linfonecrosis (1), tubulonefrosis (2) y necrosis glomerular grave, difusa (3) H-E, 500X.



Fotomicrografía 5. Sección de intestino anterior de carpa observándose necrosis extensa grave, difusa con reacción inflamatoria por macrófagos y heterófilos (Flecha) H-E, 125 X.



Fotomicrografía 6. Sección de páncreas apreciándose numerosas áreas de necrosis (1) e hiperplasia de centros melanomacrófagos leve, multifocal (flecha) y reacción inflamatoria constituida por heterófilos linfocitos y macrófagos (3) H-E, 125 X.

6.4 ENSAYO INMUNOABSORBENTE LIGADO A ENZIMAS (ELISA)

Los resultados de ELISA obtenidos de la mezcla de extractos de riñón y bazo de peces colectados de las granjas del estado de Hidalgo: TA I y II, CH, TUN, LM y del Estado de México TIA y VV fueron negativos al vVPC. Los resultados se validaron según el manual de la prueba del ELISA Testline, la media de la absorbancia del antígeno negativo fue de 0.117 y la absorbancia del antígeno positivo fue de 1.358.

De acuerdo al manual, se cumplieron los resultados de validación y se interpretaron como negativos, porque los valores de la media de la absorbancia de las muestras problema fueron menores a 0.1, salvo en una de las muestras de CH que fue de 0.13, aún así son menores a la media de la absorbancia del antígeno negativo (Cuadro 3).

Cuadro 3. Resultados de la prueba de ELISA para muestras de tejido de carpas de 4 granjas del estado de Hidalgo y 2 del Estado de México para detectar al vVPC.

GRANJA	MUESTRA 1	MUESTRA 2	MEDIA DE LAS MUESTRAS	VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS	RESULTADOS
Blanco	0.231				
Negativo	0.215	0.139	1.177		
Positivo	1.359	1.357	1.358		
TA1	0.166	1.163	0.164	0.06	-
TA2	0.147	0.255	0.201	0.03	-
CH1	1.120	0.064	0.092	0.13	-
CH2	0.168	0.206	0.187	0.04	-
TUN 1	0.214	0.201	0.207	0.02	-
TUN 2	0.188	0.201	0.194	0.03	-
LM 1	0.190	0.109	0.149	0.08	-
LM 2	0.115	0.120	0.117	0.006	-
TI 1	0.222	0.301	0.261	0.03	-
TI 2	0.239	0.322	0.280	0.04	-
VV1	0.221	0.216	0.218	0.01	-
VV2	0.170	0.162	0.166	0.06	-

TA 1 Y 2-Tezontepec de Aldama 1; CH-Chincuahutla; TUN-Tunititlán; LM-La Manga; TI-Tiacaque y VV - Villa Victoria.

Por otro lado, se realizaron otras dos pruebas de ELISA para las crías de carpa pertenecientes a la granja de TAIL, que tuvieron mortalidad del 100%. En ambas pruebas de ELISA se cumplieron los resultados de validación; en la primera ELISA se obtuvo un resultado positivo para vVPC, pero como se utilizó agua destilada, en vez del reactivo de dilución proporcionado en el juego de reactivos, se repitió la prueba para corroborar dicho resultado, el cual también fue positivo para el mismo agente (Cuadro 4 y 5).

En el cuadro 4 se observan los resultados de la primera ELISA, se consideró positiva porque la media de las absorbancias de las muestras fueron mayores a 0.1 y el doble de la media de la absorbancia del antígeno negativo.

Cuadro 4. Resultados de la prueba de ELISA para muestras de crías de carpas de dos estanques con mortalidad de la Granja de Tezontepec de Aldama II, Hidalgo para detectar al vVPC.

ESTANQUE	MUESTRA I	MUESTRA II	MEDIA DE LAS MUESTRAS	VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS	RESULTADOS
Blanco	0.068				
Negativo	0.060	0.060	0.008		
Positivo	1.104	1.039	1.071		
M1 E1	0.739	0.831	0.785	0.71	+
M2 E1	0.812	0.908	0.86	0.79	+
M3 E1	0.841	0.743	0.792	0.72	+
M4 E9	0.603	0.612	0.607	0.53	+
M5 E9	0.549	0.623	0.586	0.51	+
M6 E9	0.489	-	0.489	0.42	+

M-muestra, E1-Estanque carpa barrigona y E9-Estanque de carpa espejo

En el cuadro 5 se muestran los resultados de la segunda ELISA realizada a las carpas de TAIL en donde la media de las absorbancias de las muestras son mayores a 0.1 y el doble de la media del antígeno negativo.

Cuadro 5. Comprobación de los Resultados obtenidos en la prueba de ELISA en muestras de crías de carpas de la Granja de Tezontepec de Aldama, Hidalgo.

ESTANQUE	MUESTRA 1	MUESTRA 2	MEDIA DE LAS MUESTRAS	VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS	RESULTADOS
Blanco	0.429				
Negativo	0.496	0.475	0.485		
Positivo	2.091	1.850	1.970		
M1 E1	1.421	2.077	1.749	1.32	+
M2 E1	1.649	1.211	1.430	1.00	+
M3 E1	1.645	2.110	1.877	1.00	+
M4 E9	1.703	1.725	1.714	1.44	+
M5 E9	1.502	-	1.502	1.50	+
M6 E9	1.413	1.855	1.637	1.20	+

M-Muestra, E1-Estanque 1 (carpa barrigona) y E9-Estanque 9 (carpa espejo)

6.5 ESTUDIO BACTERIOLÓGICO

Los resultados informados del laboratorio de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM indicaron que en todas las muestras del “pool” de cavidad celómica de las carpas y en todas las granjas hubo un crecimiento de escasas a abundantes colonias identificadas como *Aeromonas hydrophila*. Se solicitó la realización del antibiograma y las bacterias resultaron sensibles a gentamicina, sulfonamida, trimetoprim, norfloxacin y cefuroxina y resultaron resistentes a ampicilina y estreptomycin.

6.6 CONSTRUCCIÓN DEL CONTROL INTERNO A PARTIR DEL PLÁSMIDO pcPVF.

Se logró la circularización del plásmido pc-PVF al clonarse el gen de *Campylobacter* sp. de 801 pb como se aprecia en el gel de agarosa (Figura 12).

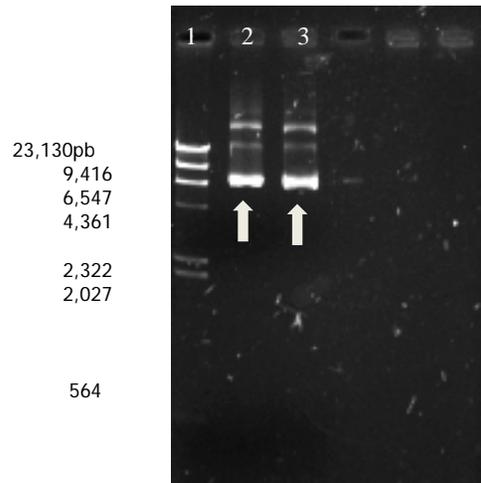


Figura 12. Fotografía de gel de agarosa al 1.2% en TAE, teñido con Br-Et, observándose dos muestras de plásmidos (pc-PVF) circularizados al clonar un gen de *Campylobacter* sp. (Flechas). Carril 1: M-marcador λ *Hind III*, carril 2: P1-plásmido 1 y carril 3: P2-plásmido 2.

A partir del plásmido pc-PVF circularizado, se realizó la PCR obteniéndose el gen de la PVF para conformar el cuerpo del CI VPC-PVF-VPC al emplear los iniciadores compuestos de sentido VSP-GFP-1 5' AGA TGG TAT GGA CCC CAA TAC ATC ATG GCC AGC AAA GGA G de 40 pb y contrasentido VSP-GFP-2 5' TCT TGG AGC CAA ATA GCT CAA GCT TTT GTA GAG CTC ATC CA de 41 pb. El amplificado fue de 801 pb que corresponde al gen de la proteína verde fluorescente flanqueado con fragmentos de la secuencia del gen de la glucoproteína del vVPC demostrado mediante gel de agarosa (Figura 13).

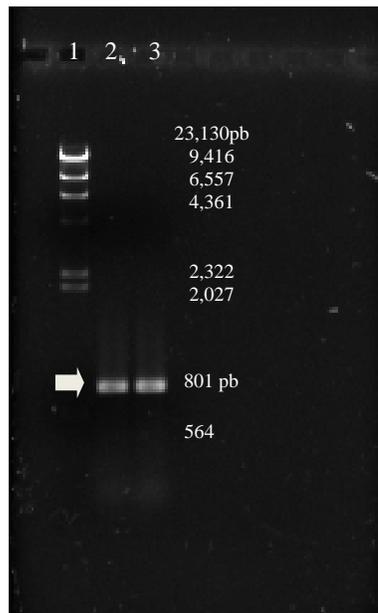


Figura 13. Fotografía de gel de agarosa al 1.2% en TAE teñido con Br-E, mostrando dos amplificados del control interno de 801 pb que corresponde al gen de la proteína verde fluorescente flanqueado con fragmentos de la secuencia del gen de la glucoproteína del vVPC. Carril1: M-marcador λ *Hind III*, carril 2: CI VPC-PVF-VPC1 y carril 3: CI VPC- PVF-VPC2.

El producto de la PCR CI VPC-PVF-VPC, fue verificado por medio de otra PCR y se demostró que si amplificaba al usar el juego de iniciadores para el vVPC (VSP-1) 5'AGA TGG TAT GGA CCC CAA TAC ATC de 24 pb y contrasentido VSP-2 5'TCT TGG AGC CAA ATA GCT CAA de 21 pb obteniéndose un amplificado de 801 pb verificado mediante un gel de agarosa (Figura 14).

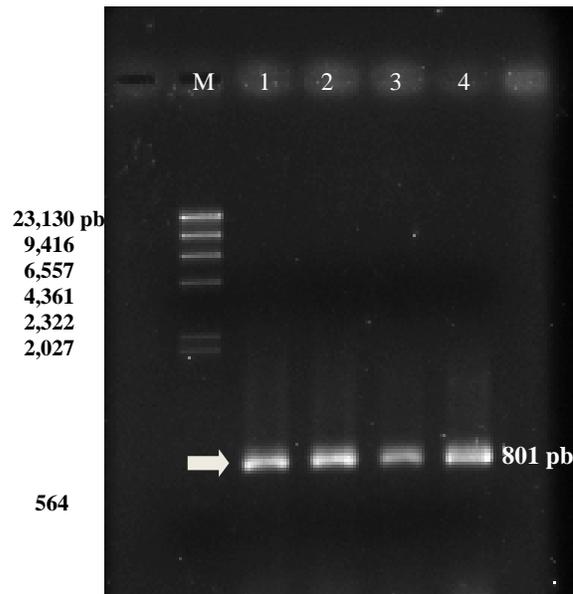


Figura 14. Fotografía de gel de agarosa al 1.2% teñido con Br-E, que muestra amplificadas de 801 pb que corresponden al CI VPC-PVF-VPC, que amplifican al usar el mismo juego de iniciadores para detectar el vVPC. Carril 1: (M) marcador λ Hind III y Carriles: 1-4 mostrando amplificadas del CI VPC-PVF-VPC.

6.7 VERIFICACIÓN DEL CI VPC-PVF-VPC EN EL SITIO DE CLONACIÓN DEL VECTOR pc-V5 CON RESPECTO AL pCMV.

Por otro lado, se requería saber si el CI VPC-PVF-VPC, se encontraba clonado en dirección con respecto al promotor/enhancer del citomegalovirus humano para poder llevar a cabo la transfección en células Hela. Por lo que se diseñó un iniciador de dirección, de esta forma se encontró que sólo una de las colonias transformadas con el plásmido recombinante presentaba el CI VPC-PVF-VPC (prCI) clonado en dirección correcta. En este caso, al emplear el iniciador VPC1 sentido (F) y VPC2 contrasentido (R) que corresponde al control del ensayo (líneas 1-4) y el iniciador de dirección(F) y el iniciador de

contrasentido VPC2 (R), carriles 7 a 8 se obtuvo el amplificado de 801 pb que corresponde al CI VPC-PVF-VPC. Mientras que, al agregar en otro tubo de PCR dos iniciadores de sentido, el de dirección (F) y el de VPC1 (F) carriles 9-11, no se generó ningún amplificado.

Por lo anterior, se concluyó que únicamente un plásmido pc-V5 contenía en el sitio de clonación el CI VPC-PVF-VPC en dirección con respecto al pCMV (Figura 15).

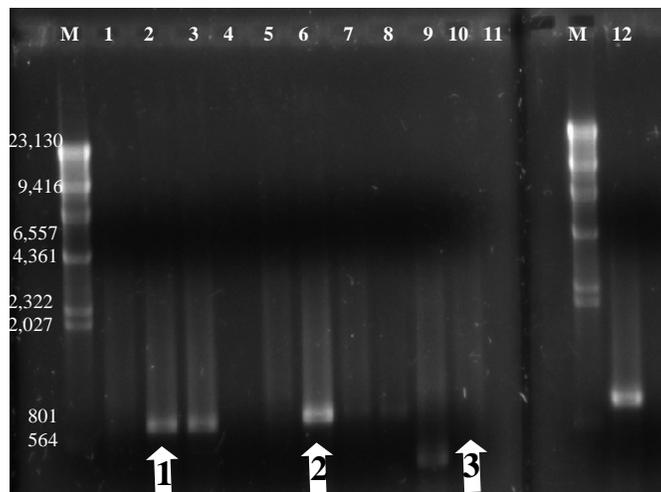


Figura 15. Fotografía de gel de agarosa al 1.2% en TAE teñido con Br-Et mostrando amplificado de 810 pb empleando iniciador de dirección para demostrar que el CI VPC-PVF-VPC se encuentra clonado en dirección en el sitio de clonación del pcV5 con respecto al promotor del CMV. Carril M: marcador λ *Hind III*, Carriles 1-4: se observa amplificado de PCR de 801 pb al emplear iniciadores VPC 1 (sentido) y VPC2 (Contrasentido), en el carril 2 (plásmido C) (flecha 1) y 3 (plásmido E). Carriles 5- 8: en el carril 6 amplificado de 801 pb al utilizar el iniciador de sentido (Sentido) e iniciador VPC2 (contrasentido) (flecha 2) y Carriles 9-12: no hubo amplificado al utilizar dos iniciadores de sentido (dirección de sentido y VPC1) (flecha 3).

Una vez que se identificó el prCI en dirección con respecto al pCMV, se cuantificó por electroforesis obteniendo un valor de 605 ng. Este valor indicó que se tenía la concentración suficiente para realizar la transfección con lipofectamina en células Hela.

Posteriormente, se realizó la purificación con el juego de reactivos de plásmido miniprep (Invitrogen) empleando columna de sílica y se visualizó en gel de agarosa al 1.2% en TAE teñido con Br-Et donde, se observó el prCI que está en dirección con respecto al pCMV (Figura 16) y se obtuvo una concentración de 450 ng al medirlo con el espectrofotómetro, la cual disminuida debido al procedimiento.

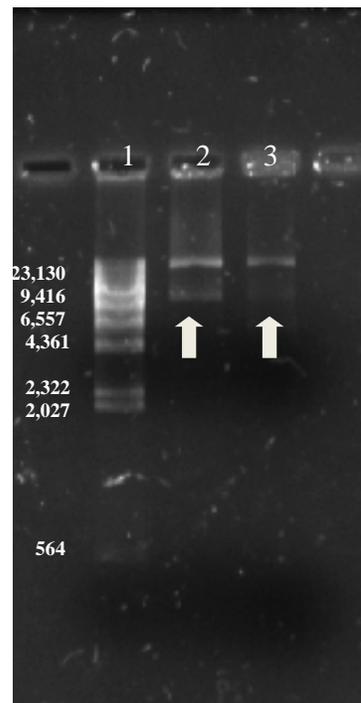


Figura 16. Fotografía de gel de agarosa al 1.2% teñido con Br-E, mostrando plásmido recombinante con el CI VPC-PVF-VPC purificado (Flechas), para ser empleado en la transfección de células Hela. Carril 1: M-marcador λ *Hind III*, Carril2: plásmido recombinante concentrado -PC y Carril 3: plásmido recombinante purificado en columna-PPC.

6.8 TRANSFECCIÓN CON LIPOFECTAMINA EN CÉLULAS HELA CON EL PLÁSMIDO RECOMBINANTE

En los ensayos de transfección se apreció que a las 6 horas aproximadamente el 50% de las células Hela estaban transfectadas, debido a que hubo expresión de la proteína verde fluorescente. Esta expresión se detectó por la bioluminiscencia de color verde, al emitir luz fluorescente azul de 495 nm sobre las células. A las 24 horas posteriores al cambio del MEM enriquecido, se conservó la bioluminiscencia inclusive hasta las 72 horas. Esto corroboró los hallazgos obtenidos a partir del empleo del iniciador de dirección, que el CI VPC-PVF-VPC si está clonado en dirección en pc-V5 y con respecto al promotor/enhancer del CMV. Por otro lado, la transfección con lipofectamina fue exitosa (Figura 17).

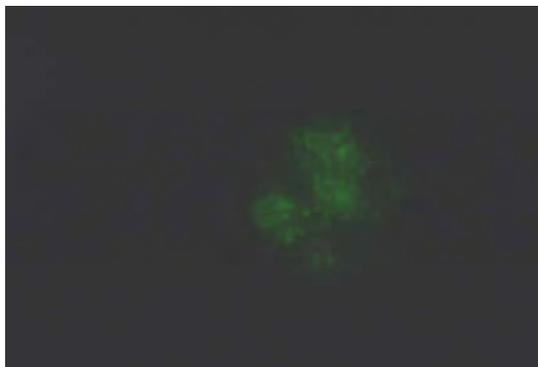
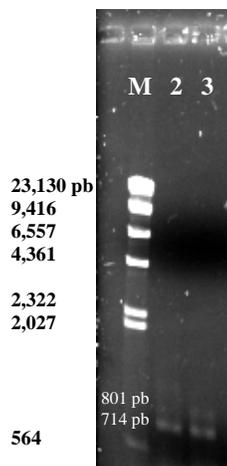


Figura 17. Fotografía que muestra la bioluminiscencia de la proteína verde fluorescente en células Hela transfectadas con el plásmido pc-V5 recombinante con el CI VPC-PVF-VPC clonado en dirección correcta con respecto al promotor/ enhancer CMV y que la transfección se llevó a cabo de manera correcta.

6.9 EXTRACCIÓN DEL ARN DE LAS MUESTRAS CLÍNICAS DE CARPAS Y COAMPLIFICACIÓN DEL CI VPC-PVF-VPC

Una vez demostrado que durante la transfección en células Hela se obtuvo la cantidad adecuada de ARNm (CI VPC-PVF-VPC), se realizó la extracción de ARN de las 7 muestras clínicas de carpa pertenecientes a todas las granjas, pero solo en dos localidades (CHI y TUN) con una concentración de ARN de 560 y 240 ng, respectivamente, se llevó a cabo la coamplificación, agregando 5 µl del CI junto con 2 µl de las muestras clínicas. De las dos muestras clínicas se obtuvieron dos amplificados: uno de 801 pb que corresponde al CI VPC-PVF-VPC y otro de 714 pb positiva para el vVPC. Con lo anterior se demostró, que el CI con la concentración obtenida, longitud del CI y con el mismo juego de iniciadores para vVPC, se logró la coamplificación del CI VPC-PVF-VPC al agregarlo a las muestras clínicas. Este hallazgo evidenció que los resultados obtenidos mediante ELISA que fueron negativos para vVPC en estas dos granjas fueron falsos negativos (Figura 19).



7.0 DISCUSIÓN.

La viremia primaveral de la carpa (VPC), es una enfermedad viral asociada a un Rhabdovirus de la familia Vesiculoviridae que causa cuantiosas pérdidas económicas a la industria acuícola. Con el fin de confirmar su presencia en México se seleccionaron de entre varias granjas, aquellas con problemas de mortalidad y signos clínicos sugerentes de enfermedades infecciosas.

En una de las granjas seleccionadas -TAll-, se presentó una mortalidad del 100% en carpas, de dos estanques de peces juveniles, durante el periodo de transición entre el invierno-primavera (marzo-abril), periodo en el cual se apreció un incremento en la temperatura de 0-10°C. Esta mortalidad elevada, edad de los individuos y el cambio en la temperatura del agua como factor desencadenante de la enfermedad, eran indicios claros de la presencia de VPC, considerando lo reportado por Fijan, 1972; Fijan *et al.*, 1984; Ahne *et al.*, 2002; OIE, 2009. En esta misma granja se apreciaron además, lesiones macroscópicas inespecíficas como el aumento de volumen de la cavidad celómica por líquido ascítico y exoftalmia, lo cual nuevamente era coincidente con VPC según lo reportado por Hadghighi *et al.*, 2008; OIE, 2009. En el laboratorio de patología se analizaron los tejidos de todos los animales, incluyendo aquellos pertenecientes a la granja TAll.

El análisis de las lesiones macroscópicas observadas en algunas carpas de las granjas de CH y LM sugería una posible etiología bacteriana y micótica (solo para la segunda granja). Para el caso de la granja TAll, se apreció palidez en la superficie corporal de las carpas (Ahne *et al.*, 2002; Hadghighi *et al.*, 2008; OIE, 2009). El cambio en la coloración de la piel se ha relacionado con una infinidad de condiciones como estrés, anemia, parasitosis y procesos infecciosos

bacteriano o virales. En el caso específico de vVPC, existen diversos reportes (Ahne *et al.*, 2002; Hadghighi *et al.*, 2008 y OIE, 2009) donde se menciona también que en animales infectados con este virus, se presentan macroscópicamente edema y hemorragias en tegumento, músculo esquelético, aletas, branquias, ojos y todas las vísceras, heces mucoides, edema y protrusión del coprodeo con salida de líquido sanguinolento. Si bien estas lesiones no se observaron en los animales colectados en el presente trabajo, su ausencia no es concluyente, pues en algunas ocasiones un incremento de la temperatura y oxigenación detiene la replicación del virus sin causar lesiones vasculares.

Las lesiones observadas en los estudios histopatológicos de las carpas de las granjas de TUN, CHI, TAI, LM, TIA y VV estuvieron asociadas con ecto y endoparasitos y con la calidad del agua. Las lesiones asociadas con la deficiente calidad de agua se observaron mayormente en las branquias, donde principalmente se encontró hiperplasia epitelial, hiperplasia de células caliciformes y telangiectasia. Estos cambios patológicos en las branquias nos refieren un status de salud en organismos acuáticos y son indicadores eficientes de la calidad del agua (Evans, 1987; Scharamm *et al.*, 1999). En este caso nuevamente una calidad deficiente en el agua de los estanques favorecería la presentación de infecciones virales, a través principalmente de erosión de epitelios e inmunosupresión. Cabe mencionar en este punto que una gran parte de las granjas de ciprinocultura nacionales son rústicas y de policultivo, la mayor parte de las veces con instalaciones que permiten el libre contacto de los peces con especies silvestres, favoreciendo el desarrollo de ciclos de distintos parásitos, por lo que no es raro encontrar infestaciones

parasitarias. Pfeil y Baath, 1978 en su estudio mencionan que los parásitos como crustáceos e hirudíneos pudiesen ser vectores de vVPC, en nuestro caso no se encontraron crustáceos ni hirudíneos en las granjas muestreadas, aclarando que no se buscaron de forma exhaustiva.

Por otra parte, la mala calidad del agua y la existencia de parásitos generan estrés, inmunosupresión, como ya se ha mencionado, provocando que los peces sean susceptibles a una invasión secundaria por otros microorganismos como *Aeromonas hydrophila* (Fijan *et al.*, 1971 y Fijan, 1972). En nuestro estudio, todos los tejidos analizados mostraron la presencia de este agente, conformando esta situación.

En los cortes histológicos de las carpas pertenecientes a la granja TALL no se encontraron parásitos, sin embargo las lesiones microscópicas como edema, necrosis, inflamación heterofílica, linfocitaria e histiocítica y cuerpos de inclusión intranucleares en hepatocitos sugirieron que estaban asociados a un complejo virus-bacteria. En esta granja como se menciona en el párrafo anterior el cultivo bacteriológico mostro la presencia de *A. hydrophila*. No obstante, se debe de mencionar que este agente está presente en todos los cuerpos de agua dulce no contaminadas y suele ser más abundante en agua con alta carga orgánica (Hazen *et al.*, 1978, Heuschmann, 1978 y Karper *et al.*, 1981) como en los cultivos de cipericultura, también es un componente de la flora normal del tracto gastrointestinal de las especies acuáticas (Trust *et al.*, 1974) y solo cuando existe inmunosupresión se comporta como un patógeno en organismos poiquilotermos, homeotermos e inclusive del hombre (Fraire, 1978; Salton y Schnick, 1973) Para el caso de esta granja, las lesiones

histológicas indicaban que la infección bacteriana se había presentado secundaria a una infección viral.

Las lesiones histológicas observadas en las carpas de la granja TAI1 fueron principalmente edema, necrosis e inflamación en todos los tejidos. Negele, 1977 y Hadghighi *et al.*, 2008 mencionan que las lesiones histológicas asociadas con el vVPC son principalmente de tipo vascular como degeneración fibrinoide de los vasos sanguíneos, vasculitis y perivasculitis, dilatación y necrosis de los vasos linfáticos, hemorragia y edema en todos los tejidos. También se mencionan cambios degenerativos y necrosis en riñón, bazo, páncreas, músculo esquelético, hígado y corazón, reacción inflamatoria en intestino, páncreas, corazón, músculo esquelético y encéfalo e hiperplasia del retículoendotelial y centros melanomacrófagos del bazo. Si bien en este trabajo, no se observaron lesiones vasculares principalmente, cabe mencionar que los reportes mencionados establecen estas lesiones en animales afectados únicamente con vVPC, la asociación con otro agente como *A. hydrophila*, pudiera ocasionar entonces que las lesiones sean enmascaradas ocultando aquellas asociadas directamente con vVPC o que estas lesiones fueron provocadas por otra entidad viral.

Un dato relevante en este trabajo fue la presencia de cuerpos de inclusión intranucleares en el hígado de las carpas de TAI1, sugerentes de un proceso viral, a la fecha este hallazgo no ha sido asociado a VPC (Negele, 1977; Ahne *et al.*, 2002; OIE, 2009). Solamente se han reportado cuerpos de inclusión intranucleares en el epitelio tubular del riñón asociados con vVPC (Negele, 1977), los cuales no fueron observados en este estudio.

Con el fin de establecer de forma directa la presencia de vVPC, se emplearon otras pruebas de laboratorio complementarias. La primera de las metodologías utilizadas para establecer la presencia de vVPC en las muestras analizadas fue un ELISA (Test-Line).

Los resultados obtenidos con las muestras de las carpas de la granja TALL, fueron positivos para el vVPC, para el resto de las granjas CH, TUN, LM, TIA y VV los resultados fueron negativos. En el manual de la OIE, 2009 se menciona que el ELISA es una prueba que no puede ser todavía aceptada como prueba rutinaria y que posteriormente a la realización de ésta, se debe de verificar el resultado por aislamiento viral, sin embargo este es laborioso y consume mucho tiempo (Koutná *et al.*, 2003, OIE, 2009). El ELISA tampoco es aceptado por la OIE como única prueba diagnóstica debido a que todavía no se conocen las respuestas serológicas de los peces con respecto a las infecciones virales. El sistema comercial de ELISA Test-line empleado en este trabajo es una prueba de captura y es muy sensible ($10^{2.8}$ - $10^{3.5}$ TCID₅₀ por 0.1 ml), sin embargo es poco específica pudiendo existir reacciones cruzadas con otros rhabdovirus de ciprinidos como el del pez Lucio (Clerx y Horzinek, 1978; Clerx *et al.*, 1978; Jorgensen *et al.*, 1989; Way, 1991; Ahne *et al.*, 1998 y Dixon y Longshaw, 2005). Además existen 4 genogrupos de vesiculovirus en peces, el vVPC esta incluido en el genogrupo 1, este grupo a su vez esta dividido en 4 subgenogrupos con antigenicidad cruzada, lo cual incrementa la probabilidad de emitir resultados falsos positivos (Dixon y Longshaw, 2005).

Por otra parte Adams y Thompson, 2008 mencionan que la prueba de ELISA de sándwich, es útil en la detección de patógenos durante la enfermedad

clínica, pero su aplicación se ve limitada al utilizarlo en infecciones subclínicas, como lo observado en este trabajo.

El manual de la OIE, 2009, refieren que al realizar una prueba de ELISA para el diagnóstico de VPC, el resultado debe de ser confirmado por RT-PCR. Los resultados de ELISA se corroboraron por RT-PCR que incluyó un CI VPC-PVF-VPC, demostrando ser la prueba de elección para realizar el diagnóstico del vVPC empleando muestras clínicas de todas las granjas. Se debe enfatizar en este punto que el CI fue un diseño original en este trabajo.

Empleando este control con muestras de carpas de dos estanques particulares de los municipios de CH y TUN se logró obtener un amplificado de 714 pb que corresponde al gen de la glucoproteína del vVPC, es decir fueron positivas al vVPC, en estos mismos ensayos se logro la amplificación de 801 pb correspondiente al CI VPC-PVF-VPC, estableciéndose la utilidad del CI en el diagnóstico de esta enfermedad.

El RT-PCR ha sido empleado en una infinidad de reportes para el diagnóstico de VPC en diferentes especies de peces (Sanders *et al.*, 2003; Grove *et al.*, 2006; Rowley *et al.*, 2001). Este ensayo es más sensible y específico que el resto de las pruebas diagnósticas, tiene la ventaja de que amplifica numerosas copias y el diagnóstico se obtiene rápidamente (OIE, 2004; Adams y Thompson, 2008; Neumaier *et al.*, 1998; Cunningham, 2002). No obstante lo anterior, en la RT-PCR pueden surgir dudas si los resultados negativos realmente sean por ausencia del virus debido a que durante la extracción del ARN de las muestras clínicas, se contamine con inhibidores como grasa, hemoglobina y enzimas que impidan la amplificación, que ocurran errores durante la extracción de los ácidos nucleicos, en la mezcla de los reactivos o

durante el RT-PCR por mal funcionamiento del termociclador o que hayan variaciones en la ejecución de los ciclos de RT-PCR o pobre actividad de la ADN polimerasa (Hoofar *et al.*, 2004; Villanova *et al.*, 2007; Adams y Thompson, 2008; Cunningham, 2002). Por lo anterior, se requiere de la validación de un método molecular con un CI que evite la posibilidad de obtener resultados falsos negativos (Adams y Thompson, 2008), éste debe ser estable, económico, no infeccioso, ausente en las muestras clínicas y capaz de verificar la eficiencia del procedimiento en cada uno de los pasos (Niesters, 2004; Pasloske *et al.*, 1998).

En las muestras colectadas de TAI que mostraron lesiones sugerentes a una entidad viral y que fueron positivas por ELISA para vVPC, no se apreció amplificado correspondiente al virus ni coamplificado del CI en la RT-PCR, al igual que para el resto de las muestras de otras granjas. Por lo tanto, no se puede afirmar que las muestras de estas granjas sean negativas al vVPC, debido a que tampoco se amplificó el CI. En este caso el CI ayudo a establecer aquellos resultados falsos negativos, de forma clara.

En el presente trabajo se diseñó un control interno CI VPC-PVF-VPC obteniendo el coamplificado de 801 pb en muestras de carpa pertenecientes a dos estanques del estado de Hidalgo, esto se logró debido que el CI VPC PVF VPC tiene un tamaño adecuado y está en la concentración correcta con respecto al de la muestra. Así mismo, funciona con el mismo juego de iniciadores empleados para la amplificación del vVPC. Hoofar *et al.*, 2004 menciona que en el caso de los controles internos competitivos, puede existir la competencia entre el CI y la muestra, pero al controlar estos tres factores se logrará la coamplificación. Se han realizado pocos estudios de RT-PCR

empleando CI en peces, Maldonado (2009), empleó un CI que contiene el gen de la β -actina humana flanqueado con la proteína VP2 de IPNV para RT-PCR tradicional e Hirayama *et al.*, 2005 utilizó CI constituido por el gen GAPDH para RT-PCR de tiempo real para el diagnóstico de birnavirus, ambos lograron el amplificado de los CI. Maldonado (2009), construyó el CI y lo clonó en pcDNA3.1 V5-His-TOPO que es un plásmido de expresión, éste lo empleó para la transfección con lipofectamina en células Hela, determinando la cantidad total necesaria de ARN para amplificar el CAI, pero no logró determinar la cantidad de células Hela transfectadas, ya que su CI no contaba con un gen reportero. En el presente estudio, se realizó el procedimiento de clonación empleando el mismo plásmido de expresión y se construyó el CI VPC-PVF-VPC pero en este caso se empleó como cuerpo del CI un gen reportero constituido por el gen de la proteína verde fluorescente.

Hoofar *et al.*, 2004 desarrolló una técnica denominada iniciadores compuestos, en donde realizó un PCR de tiempo real agregando a la mezcla de reactivos ADN no relacionado con *Salmonella* sp.; en este caso de virus de pez para constituir el cuerpo del control interno y agregó iniciadores compuestos para obtener el flanqueado por fragmentos de *Salmonella entérica*, obteniendo una quimera de ADN que denominó IAC. Posteriormente empleó el mismo juego de iniciadores para *S. enterica*, logrando el amplificado de ambos componentes. La ventaja de este diseño es que ambas secuencias deben de ser heterólogas para aumentar el límite de detección. El procedimiento es semejante al realizado en el presente estudio, sin embargo no existen informes de que se haya empleado en el cuerpo del control interno un gen reportero siendo el primer trabajo en comprobarlo. El CI diseñado para este estudio tiene varias

ventajas: fue empleado como control interno competitivo, ya que esta flanqueado con fragmentos del gen de la glucoproteína de VPC y al emplear el mismo juego de iniciadores amplificó junto con muestras positivas de las dos granjas antes mencionadas. Por otro lado, al estar clonado en el plásmido pcDNA 3.1V5-His-TOPO, éste tiene integrado río abajo del sitio de clonación al promotor/enhancer del CMV. Como el plásmido prCI se transfectó en células Hela, este promotor/enhancer tiene la propiedad de generar gran cantidad de ARNm del producto clonado (CI VPC-PVF-VPC). Posteriormente el ARNm fue extraído a partir de las células Hela tranfectadas. Este procedimiento se realizó, porque para lograr el amplificado del CI VPC-PVF-VPC se requiere de gran cantidad de ARN, obteniendo 663 ng, cantidad suficiente para que se amplificara el CI.

Por último, Maldonado, 2009 no logró conocer el número real de células Hela transfectadas, sin embargo en este trabajo al emplear el mismo vector de expresión y como en el cuerpo del CI VPC-PVF-VPC se incluyó el gen reportero de la proteína verde fluorescente (Phillips, 1997 y Tsien, 1998), se pudo verificar la eficiencia de la transfección por lipofectamina en células Hela, ya que éstas emiten fluorescencia y se aprecian de color verde, pudiendo realizar con certeza el conteo de células Hela que fueron transfectadas exitosamente.

A partir de estos hallazgos, no se puede realizar un reporte de la presencia de VPC, ya que se requiere confirmar todavía el resultado de RT-PCR por secuenciación y por aislamiento viral (Ahne et al., 2002; OIE, 2009), se continuará trabajando para implementar el aislamiento viral en el laboratorio de

Microbiología agropecuaria de la UAM-Xochimilco que no fueron contemplados en el presente estudio.

Para el diagnóstico de enfermedades en peces es necesario desarrollar un procedimiento diagnóstico empleando una prueba como la histopatología junto con pruebas complementarias como ELISA, PCR o RT-PCR y aislamiento viral para determinar con precisión el diagnóstico final y así poder tomar medidas sanitarias y administrar tratamientos oportunos.

Por último, los resultados obtenidos en este estudio indican que se cumplieron los objetivos planteados y se aceptó la hipótesis, ya que se identificaron lesiones histológicas sugerentes con un complejo virus-bacteria y la intervención de otros factores que ocasionaron estrés, como mala calidad del agua por ser cultivos rústicos, presencia de parásitos e infección bacteriana por *Aeromonas hydrophila* condiciones que favorecen el desarrollo de un brote viral. Se diagnosticó la granja de TALL positiva a vVpC por ELISA y los estanques particulares de Chilcuahutla y Tunititlán por RT-PCR junto con el coamplificado del CI VPC-PVF-VPC confirmando la veracidad de los hallazgos.

8.0 CONCLUSIONES

- I. A partir de las lesiones histológicas se identificó que las carpas de la granja de TAll presentaban lesiones sugerentes de un complejo virus-bacteria y en el resto de las granjas asociados con múltiples factores como calidad del agua, presencia de parásitos e infección bacteriana secundaria por *Aeromonas hydrophila*, que podrían favorecer el desarrollo de enfermedades virales.
- II. Con la prueba de ELISA se confirmaron los hallazgos identificados por histopatología en las carpas de TAll siendo positivas para el vVPC y el resto de las granjas negativas.
- III. El control interno CI VPC-PVF-VPC, demostró ser eficiente en la detección de falsos negativos al realizar el RT-PCR, en las muestras de carpas de los estanques de Chilcuahutla y Tunititlán, que mostraron lesiones histológicas sugiriendo una entidad viral y fueron negativos en la ELISA.
- IV. Se determinó que la extracción del ARNm y la mezcla de los reactivos para RT-PCR fueron realizados de forma correcta, al apreciarse el amplificado del control interno y demostrando en dos granjas de Hidalgo la presencia del vVPC.
- V. El RT-PCR realizado en el presente estudio puede ser empleado por otros laboratorios en el diagnóstico de la VPC.

9.0 PERSPECTIVAS

- 1) De los hallazgos por RT-PCR se confirmaran los resultados por secuenciación y se efectuará el aislamiento viral empleando células de FHM y EPC.
- 2) La prueba de ELISA deberá ser estandarizada empleando otras muestras clínicas, ya que puede ser utilizada como diagnóstico presuntivo de vVPC según la OIE.
- 3) En las muestras de carpas del resto de las granjas, en donde no hubo amplificado del control interno en el RT-PCR, se repetirán los ensayos para evitar la emisión de resultados falsos negativos y confirmar los hallazgos histopatológicos y de ELISA.
- 4) Se generará mayor cantidad del ARNm al transfectar cajas de cultivo de células Hela y se analizará la eficiencia de la transfección por tiempo y haciendo conteo de células tranfectadas.
- 5) Se determinará el límite de detección del CI y de la concentración viral para establecer la sensibilidad del RT-PCR y la especificidad empleando muestras clínicas de otras especies de peces.
- 6) Se implementará en el diagnóstico rutinario la prueba de ELISA y RT-PCR en el Departamento de Patología de la FMVZ-UNAM.
- 7) Los resultados obtenidos en el aislamiento viral se confirmaran por ELISA y RT-PCR como lo indica la OIE.
- 9) El aislamiento viral será implementado en el laboratorio de Microbiología agropecuaria de la UAM-Xochimilco.

10) Por histopatología, se tratará de identificar si las lesiones que ocasiona el vVPC son enmascaradas por *Aeromonas hydrophila* empleando peces libres de patógenos inoculados por separado con estos dos agentes.

10.0 ANEXO

10.1 ANEXO 1

1. PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA LA PRUEBA DE ELISA TEST-LINE LTD.

- 1) Antes de realizar la prueba, los reactivos deben de estar a temperatura ambiente.
- 2) Solución de lavado: Se diluyó 1:20 ml.
- 3) Dilución del suero y del conjugado: El suero de conejo antiVPC (RAVPC) se diluyó 1:30 con diluyente.
- 4) Cromógeno: Listo para usarse.

2. DESARROLLO DE LA PRUEBA

El juego de reactivos contiene 1 placa con 96 pozos.

- 1) Se colocaron 50 µl del diluyente en todos los pozos.
- 2) Se tomaron otros 50 µl del diluyente para el pozo A1 que corresponde al blanco.
- 3) Se colocaron 50 µl del antígeno testigo negativo en 2 pozos.
- 4) Después 50 µl del antígeno testigo positivo en 2 pozos.
- 5) Se agregaron 50 µl de las muestras por duplicado en todos los demás pozos y se mezclaron los contenidos.
- 6) Las placas se cubrieron para evitar su deshidratación y se incubaron por 60 minutos a 37 °C.
- 7) Después de la incubación, se retiró el contenido de los pozos. En seguida se realizaron 3 lavados con la solución de lavado y se quitó el

exceso golpeando la placa energéticamente en una toalla de papel sobre una superficie firme.

8) Se agregaron 50 µl de anticuerpo de conejo anti VPC.

9) Se hicieron 3 lavados con solución de lavado y se retiró el exceso.

10) La placa se incubó nuevamente por 60 minutos a 37 °C.

11) Se agregó el conjugado constituido por anticuerpos de suino anti conejo.

12) Se repitió la incubación de la placa por otros 60 minutos a 37 °C.

13) Se volvieron a hacer 3 lavados con solución de lavado, se retiró el exceso en una toalla de papel golpeando fuertemente sobre una superficie firme.

14) Se aplicó el sustrato cromogénico TMB: 100 µl en todos los pozos y se incubó en la oscuridad por 10 minutos a 20 °C.

15) Por último se detuvo la reacción agregando 100 µl de ácido sulfúrico contenido en el juego de reactivos.

16) La placa se colocó en un lector de ELISA a 450 nm, documentando la información.

3. VALIDACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LA PRUEBA:

Los resultados son validos si la media de la absorbancia en los pozos con antígenos negativos es menor a 0.1 y cuando la media de la absorbancia en los pozos con antígeno positivo es mayor a 0.5. Para la interpretación de los resultados estos serán positivos si la media de la absorbancia de la muestra es mayor a 0.1 y al menos lo doble que la media de la absorbancia del testigo negativo.

11.0 LITERATURA CITADA

1. Adams A y Thompson KD. Recent applications of biotechnology to novel diagnostics for aquatic animals. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 2008; 27(1): 197-209.
2. Ahne W. Evidence for the systemic character of *Rhabdovirus carpio* infection. *Bull Off Int Epizoot* 1977; 87: 435-436.
3. Ahne W. Uptake and multiplication of spring viremia of carp virus in carp, *Cyprinus carpio* L. *J Fish Dis* 1978; 1: 265-268.
4. Ahne W. *Rhabdovirus carpio* infection beim karpfen (*Cyprinus carpio*) Untersuchungen über reaktionen des wirtsorganismus. *Fortschr Veterinarmed* 1980; 30: 180-183.
5. Ahne W. Untersuchungen zur Tenazität der Fischviren. *Fortschritte in der Veterinärmedizin* 1982b; 35: 305-309.
6. Ahne W. *Argulus foliaceus* L., and *Piscicola geometra* L. as mechanical vectors of spring viraemia of carp virus (SVCV). *J. Fish Dis* 1985; 8: 241-242.
7. Ahne W. The influence of environmental temperature and infection route on the immune response of carp (*Cyprinus carpio*) to spring viremia of carp virus (SVCV). *Vet Immunol and Immunopathol* 1986; 12: 383-386.
8. Ahne W, Kurath G y Winton JR. A ribonuclease protection assay can distinguish spring viremia of carp virus from pike fry rhabdovirus. *Bull eur Assoc Fish Pathol*; 18: 220-224.
9. Ahne W, Bjorklund HV, Essbauer S, Fijan N, Kurath G y Winton JR. Spring Viremia of Carp (SVC). *Dis Aquat Organ* 2002; 52: 261-272.

10. Ahne W y Held C. Investigations of the virucidal activity of Actomar K30 on pathogenic viruses of fish *Tieraerztl. Umsch* 1980; 35: 308-319.
11. Banerjee AK. Transcription and Replication of Rhabdoviruses. *Microbiol Rev* 1987; 51: 66-87.
12. Baudouy AM, Danton M and Merle G. Experimental infection of susceptible carp fingerlings with spring viremia of carp virus, under wintering environmental conditions. In: Ahne, W editor: *Fish Diseases*. Berlin: Springer-Verlag; 1980 a: 23-27.
13. Baudouy AM, Danton M, and Merle G. Viremie printaniere de la carpe: etude experimentale de l'infection evoluant a differentes temperatures. *Ann Virol* 1980 b; 131E: 479-488.
14. Baudouy AM, Danton M y Merle G, Experimental infection of susceptible carp fingerlings with spring viremia of carp virus under wintering environmental conditions. In: Ahne, W editor: *Fish Diseases*. Berlin: Springer-Verlag; 1980 c: 23-27.
15. Bearzotti M, Delmas B, Lemoureux A, Loustau, AM, Chilmonczyk, S y Bremont M. Fish Rhabdovirus cell entry is mediated by fibronectin. *J of Virology* 1999; 73: 7703-7709.
16. Békési L and Csontos L. Isolation of spring viraemia of carp virus from asymptomatic broodstock carp, *Cyprinus carpio L.* *J Fish Dis* 1985; 8: 471-472.
17. Bishop DHL y Smith MS. Rhabdoviruses In: Nayak DP editor. *Molecular biology of animal viruses*. New York: Marcel Dekker, 1977: 167-280.
18. Björklund HV, Higman KH y Kurath G. The glycoprotein genes and gene junctions of the fish rhabdoviruses spring viremia of carp virus and hirame

- rhabdovirus: analysis of relationships with other rhabdoviruses. *Virus Res* 1996; 42: 65-80.
19. Bootsma R, Fijan N, y Blommaert J. Isolation and preliminary identification of the causative agent of carp erythrodermatitis. *Vet Arh* 1977; 47: 291-302.
20. Bussereau F, De Kinkelin P y Le Berre M. Infectivity of fish rhabdoviruses for *Drosophila melanogaster*. *Ann Microbiol (Paris)* 1975; 126a: 389-395.
21. Cabrera JJA y García CJL, El estado de la acuicultura en México al término de 1982. (citado 2006). Disponible de: <http://www.fao.org/docrep/005/ad020s/ad020s09.htm>.
22. Cahil MM. Bacterial flora of fishes: a review. *Microbial Ecology* 1990; 19: 21-41.
23. Cipriano R C. *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. *Fish disease leaflet* 2001; 68: 1-23.
24. Clerx JPM y Horzinek MC. Comparative protein analysis of non salmonid fish rhabdoviruses. *J Gen Virol* 1978; 40: 287-295.
25. Clerx JPM, Horzinek MC y Osterhaus ADM. Neutralization and Enhancement of Infectivity of Non-salmonid fish Rhabdoviruses by Rabbit and Pike Immune Sera. *J Gen Virol* 1978 b; 40: 297-308.
26. Cunningham CO. Molecular diagnosis in fish and shellfish diseases: present status and potential use in disease control. *Aquaculture* 2002; 206: 19-55.
27. Dikkeboom AL, Radi C, Toohey-Kurt K, Marcquenski S, Engel M, Goodwin EA, Way K, Stone MD y Longshaw C. First report of spring viremia of carp virus in wild Common carp in North America. *J of Aquat Animal Health* 2004; 16: 169-178.

28. Dixon P. Immunization with viral antigens: viral diseases of carp and catfish. *Dev Biol Stand* 1997; 90: 221-232.
29. Dixon PF y Longshaw CB. Assessment of commercial test kits for identification of spring viraemia of carp virus. *Dis Aquat Org* 2005; 67: 25-29.
30. Essbauer S y Ahne W. Viruses of Lower Vertebrates. *J Vet Med B* 2001; 48: 403-475.
31. Evans HD. The fish gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. *Environ Health Perspect* 1987; 71: 47-58.
32. Fijan N, Matasin Z, Jeney Z, Olah J, y Zwillenberg LO. Isolation of *Rhabdovirus carpio* from sheatfish *Silurus glanis* fry. En: Olah J, Molnar K, and Jeney Z (eds). *Proceedings of an International Seminar on Fish: Pathogens and Environment in European Polyculture Hungary, Hungary; 1981: 48-58.*
33. Fijan N, Petrinc Z, Sulimanovic D y Zwillenberg LO. Isolation of the viral causative agent from the acute form of infectious dropsy of carp. *Vet Arh* 1971; 41: 125-138.
34. Fijan N. Infectious dropsy in carp-a disease complex. *Symp Zool Soc Lond* 1972; 30: 39-51.
35. Fijan N. Diseases of ciprinids in Europe. *Fish Pathol* 1976; 10: 129-134.
36. Fijan N, Matasin Z, Jeney Z, Olah A, Zwillenberg LO. Isolation of *rhabdovirus carpio* from shethfish (*Silurus glanis*) fry. *Symp Biol Hung* 1984; 23: 17-24.
37. Fijan N. Spring Viraemia of Carp. En: Woo P y Bunol D (eds). *Fish Diseases and Disorders Volume III. Viral, Bacterial and Fungal Infections.* London:CABI Publishing; 1999 : 177-244.

38. Flint SJ, Enquist LW, Racaniello VR y Skalka AM. Principles of Virology Molecular Biology, Pathogenesis and Control of Animal Viruses. 2nd ed. Washington: ASM Press, 2001.
39. Fraire AJ. *Aeromonas hydrophila* infection. J Am Med Assoc 1978; 239: 192-194.
40. Garver K, Dwilow A, Richard J, Booth T, Beniac D y Souter B. First detection and confirmation of Spring viraemia of Carp virus in Common Carp, *Cyprinus carpio* L., from Hamilton Harbour, Lake Ontario, Canada. J of Fish Dis 2007; 30: 665-671.
41. Goodwin AE. First Report of spring viremia of carp virus (SVCV) in North America. J of Aquat Animal Health 2002; 14: 161-164.
42. Grove S, Faller R, Baekken K, Dannevig BH. Absolute quantification of RNA by a competitive real-time RT-PCR method using piscine nodavirus as a model. J. of Virol Meth 2006; 132: 104-112.
43. Gupta KC y Roy P. Alternate capping mechanisms for trascription of spring viremia of carp virus: evidence for independent mRNA initiation. J Virol 1980; 33: 292-303.
44. Gupta DC y Roy P Synthesis of capped and uncapped methylated oligonucleotides by the virion transcriptase of spring viremia of carp virus, a rhabdovirus. Proc Natl Acad Sci 1981; 78: 4758-4762.
45. Haghghi KA, Bandehpour M, Sharifnia Z y Kazemi B. The first Report of spring viraemia of carp in some rainbow trout propagation and breeding by pathology and molecular techniques in Iran. Asian J of Animal and Vet Adv 2008; 3 (4): 263-268.

46. Haenen OLM y Davidse A. Comparative pathogenicity of two strains of pike fry rhabdovirus and spring viremia of carp virus for young roach, common carp, grass carp and rainbow trout. *Dis Aquat Org* 1993; 15: 87-92.
47. Hartman K, Yanong, R, Francis-Floyd R, Riggs A y Petty D, Spring viremia of Carp (SVCV) and Koi Herpes virus (KHV) Emerging Diseases of Koi: Workshop Summary an FAQs. 2004. (Citado 2004). Disponible en: www.pondkeeper.com.
48. Hazen TC, Fliermans CB, Hirsch RP y Esch GW. Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the United States. *Appl Envir Micro* 1978; 36: 731-738.
49. Heuschmann B. Aeromonads of the hydrophila-punctata group in fresh water fishes. *Archives Für Hydrobiologie* 1978; 83: 99-125.
50. Hill, BJ; Underwood BO, Smale CJ y Brown F. Physicochemical and serological characterization of five rhabdoviruses infecting fish. *J Gen Virol* 1975; 27: 369-378.
51. Hirayama T, Imajoh M y Oshima S. Quantification of Aquabirnaviruses isolated from different host species by real-time RT-PCR. *Microbiol Immunol* 2005; 49: 361-371.
52. Hoffman B, Schütze H y Mettenleiter CT. Determination of the complete genomic sequence and analysis of the gene products of the virus of spring viremia of carp, a fish Rhabdovirus. *Res Vir* 2002; 84: 89-100.
53. Hoofar J, Malorny B, Abdulmawjood A, Cook N, Wagner M y Fach P. Practical considerations in design of Internal Amplification Controls for Diagnostic PCR Assays. *J of Clin Microbiol*. 2004; 42: 1863-1868.

54. Huizinga HW, Esch GW y Hazen TC. Histopathology of red sore disease *Aeromonas hydrophila* in naturally and experimentally infected largemouth bass *micropterus salmoides* (Lecepede). J of Fish Diseases 1979; 2: 263-277.
55. Hunt, M. Virology-chapter four: RNA virus replication strategies. 2008. (Citado 2008). Disponible en: <http://pathmicro.med.sc.edu/mhunt/RNA-HO.htm>.
56. Iowa State University and OIE. Viremia Primavera de la Carpa. (Citado 2007). Disponible en: http://SCV_A0707.
57. Jeney Z y Jeney G. Recent achievements in studies on diseases of common carp (*Cyprinus carpio L.*). Aquaculture 1995; 129: 397-420.
58. Johnson C y Weber W. Spring Viremia, United States. APHIS VS Tech Notes, CEI Impact Worksheet. Federal Register OIE 2004; 69 (95): 1-3.
59. Johnson MC, Maxwell JM, Loh PC y Leong JC. Molecular Characterization of the glycoproteins from two warm water rhabdoviruses: snakehead rhabdovirus (SHRV) and Rhabdovirus of penneid shrimp (RPS)/ spring viremia of carp virus (SVCV). Vir Res 1999; 64: 95-106.
60. Jorgensen PEV, Olesen NJ, Ahne W, Lorenzen N. SVCV and PFR viruses: serological examination of 22 isolates indicates close relationship between the two fish rhabdoviruses. En: Ahne W, Kursted E (eds). Viruses of lower vertebrates. Berlin:Springer Verlag 1989: 349-366.
61. Juárez PR. La acuicultura en México, importancia social y económica. En: Desarrollo Pesquero Mexicano 1986-1987. México: Secretaría de Pesca, 1987: 219-232.

62. Kanellos T, Sylvester ID, D'Mello F, Howard RC, Mackie A, Dixon, FP, Chang K, Ramstad A, Midtlyng JP y Russell HP. DNA vaccination can protect *Cyprinus carpio* against spring viraemia of carp virus. *Vaccine* 2006; 24: 4927-4933.
63. Karper JB, Lockman H y Colwell RR. *Aeromonas hydrophila*: Ecology and toxigenicity of isolates for an estuary. *J of Appl Bacter* 1981; 50: 359-377.
64. Kirpichnikov VS y Faktorovich KA. Increase in the resistance of carp to dropsy by means of breeding. Communication II The course of the selection and evaluation of the breeding groups select. *Sov Genet* 1972; 8: 592-600.
65. Kiuchi A y Roy P. Comparison of the primary sequence of spring viremia of carp virus M protein with that of vesicular stomatitis virus. *Virol* 1984; 134: 238-43.
66. Koutná M, Vesely T, Psikal I y Hulova J. Identification of spring viraemia of carp virus (SVCV) by combined RT-PCR and nested PCR. *Dis Aquat Organ* 2003; 55: 229-235.
67. Kurath G, Higman KH, Björklund HV. Distribution and variation of NV genes in fish rhabdoviruses. *J. Gen Virol* 1997; 78: 113-117.
68. Lenoir G. Structural proteins of spring viremia virus of carp. *Biochem Biophys Res Commun* 1973; 51: 895-898.
69. Lenoir G y De Kinkelin P. Fish rhabdoviruses: comparative study of protein structure. *J Virol* 1975; 16: 259-262.
70. Liu, H, Gao L, Shi X, Gu T, Jiang y Chen, H. Isolation of spring viremia of carp virus (SVCV) from cultured koi (*Cyprinus carpio koi*) and common carp (*C. carpio carpio*) in PR China. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 2004; 24: 194-202.

71. Maldonado CE. Estandarización de un método de diagnóstico molecular para la necrosis pancreática infecciosa en los salmónidos utilizando controles internos (Tesis de maestría) México DF: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 2009.
72. Manual INVITROGENE vector pCDNA3.1CT-GFP-TOPO. 2004: 1-29
73. Manual INVITROGENE vector pcDNA3.1V5-His-TOPO. 2004: 1-37
74. Manual SVCV Ag ELISA Test-Line Ltd Clinical Diagnostics 2000: 1-7
75. Matlin KS, Reggio H, Helenius A, Simons K. Pathway of vesicular stomatitis virus entry leading to infection. *J Mol Biol* 1982; 156: 609-631.
76. Mauzeaud MM y Mauzeaud F. Adrenergic Responses to Stress in fish. En: AD Pickering editor. London: Academic Press, 1981: 49-75.
77. McAllister PE, Lidgerding BC, Herman RL, Hoyer, LC and Hankins J. Viral diseases of fish: First report of carp pox in golden ide (*Leuciscus idus*) in North America. *J Wildlife Dis* 1985; 21:199-204.
78. Michel C. Health Control Policies in fish viral diseases. *Vet Res* 1995; 26: 369-373.
79. Moiseenko TI y Sharova ON. Physiological mechanisms of degradation of fish populations in acidified water bodies. *Rus J of Ecol* 2006; 4: 287-293.
80. Montero RA. Freshwater fish seed resources in Mexico. En: Bondad RM editor. Assessment of fresh water fish seed resources for sustainable aquaculture. Rome: FAO Fisheries Technical Paper, 2007.
81. Montero RA. Información de producción de crías de peces de agua dulce. Informe; México, 2006: 1-24.

82. Negele RD. Histopathological changes in some organs of experimentally infected carp fingerlings with Rhabdovirus carpio. Bull Off Int Epiz 1977; 87: 449-450.
83. Neumaier M, Braun A y Wagener C. Fundamentals of quality assessment of molecular amplification methods in clinical diagnostics. Clin Chem 1998; 44: 12-26.
84. Niesters HGM. Molecular and diagnostic clinical virology in real time. Clin. Microbiol Infect 2004; 10: 5-11.
85. Noga E. Fish Disease Diagnosis and Treatment. United States of America: Mosby, 1996.
86. Norma Oficial Mexicana NOM-010 PESCA-1993.
87. Office of International Animal Health (OIE). Manual of Diagnostic Tests of Aquatic Animals. (Cited 2006). Disponible de: http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A_00021.htm
88. Office of International Animal Health (OIE). Manual of Diagnostic Tests of Aquatic Animals. (Cited 2009). Disponible de: <http://www.oie.int>.
89. Oficina Internacional de Sanidad Animal (OIE). Manual de la OIE sobre animales terrestres. (Citado 2004). Disponible de: http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/1.1.04_Validacion_y_control_de_calidad.pdf
90. Osadcaja EF y Ruderho AP. Patogenmost virusov, vydelennyh pri krasnube (vesennej viremii) karpov i kliniko-morfogiejheskaja karakteristika estestvennogo techenija bolezni i v eksperimente. In: Woo P y Brunol D (eds). Fish Diseases and Disorders Volumen III. Viral, Bacterias and Fungal Infections. London: CAB International, 1999: 181-244.

91. Pal R y Wagner RR. Rhabdovirus membrane and maturation. In: Wagner RR, editor. The rhabdoviruses. New York: Plenum Press 1987: 75-128.
92. Pasco L, Torchy C y De Kinkelin P. Infection experimentale de l'álevin de silure (*Silurus glanis* L.) par le virus de la viremie printamiere de la carpe (V.P.C). Bull Fr Peche Piscis 1987; 307: 84-88.
93. Pasloske BL, Walkerpeach CR, Obermoeller RD, Winkler M y Dubois DB. Armored RNA technology for production of ribonucleasa-resistan viral RNA controls and standards J Clin Microbiol 1998; 36: 3590-3594.
94. Peters G. Zur Interpretation des begriffs "Stress" beim fisch. Fisch Umwelt 1979; 7: 23-45.
95. Peters, F and Neukirch M. Transmission of some fish pathogenic viruses by the heron *Ardea cinerea*. J Fish Dis 1986; 9: 539-544.
96. Petty B, Riggs A, Klinger R, Yanong R y Francis-Floyd R. Spring Viremia of Carp. (Cited 2002). Disponible de: <http://edis.ifas.ufl.edu>.
97. Pfeil-Putzien C y Baath C. Demonstration of *rhabdovirus carpio* infection among carp in the autumn. Berl Munch tierarztl Wocheensch 1978; 91: 445-447.
98. Pfeil-Putzien C. New results in the diagnosis of spring viraemia of carp caused by experimental tranamission of *Rhabdovirus carpio* with carp louse (*Argulus foliaceus*). Bull Off Int Epiz 1977; 87: 457.
99. Phillips NG. Structure and dynamics of green fluorescent protein. Cur Op in Struct Biol 1997; 7: 821-827.
100. Robertsen B. The interferon system of teleost fish 2006; 20: 172-191.

101. Rottman RW y Shireman JV. Hatchery manual for grass carp and other riverine cyprinids. Florida USA: Bulletin 244, Florida Cooperative Extension Service, 1990.
102. Rowley H, Graham AD, Campbell S, Way K, Stone MD, Curran LW y Bryson GD. Isolation and characterization of fish rhabdovirus from wild common bream *Abramis brama*, roach *Rutilus rutilus*, farmed brown trout *Salmo trutta* and rainbow trout *Onchorynchus mykiss* in Northern Ireland. Dis Aquat Org 2001; 48: 7-15.
103. Roy P y Clewley JP. Phosphoproteins of spring viremia carp virus and other rhabdoviruses. In: Mahy BW y Barry R.D. (eds). Negative strand viruses and host cells, New York: Academic Press, 1978:116-125.
104. Roy P. Phosphoproteins of spring viremia of carp virus. Virol 1981; 112: 274-281
105. Salgado MC. Necrosis pancreática infecciosa: enfermedad emergente en la truticultura de México. Vet. Méx 2006; 37(4): 467-477.
106. Salton R y Schnick S. *Aeromonas hydrophila* peritonitis. Cancer Chem Rep 1973; 57: 489-491.
107. Sambrook J, Fritsh EF and Maniatis T. Molecular cloning a Laboratory Manual, 2 ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.
108. Sanders GE, Batts WN y Winton JR. Susceptibility of zebrafish (*Danio rerio*) to a model pathogen, spring viremia of carp virus. Comp Med 2003; 53: 514-521.
109. Schramm M, Behrens A, Baunbeck T, Eckwert H, Köhler RH, Conradt J. Cellular, histological and biochemical biomarkers. En: Gerhardt A ed.

- Biomonitoring of polluted water. Switzerland:Trans Tech Publications; 1999: 33-64.
110. Shchelkunov IS y Shchelkunova TI. *Rhabdovirus carpio* in herbivorous fishes: isolation, pathology and comparative susceptibility of fishes. En: Ahne W y Kurstak E (eds). Virus of lower vertebrates, Berlin:Spinger Verlag; 1989: 333-348.
111. Shchelkunov IS, Yukhimnko LN, Schelkunova TI, Trombitskii ID y Mantsu A.P. O vedelenii virusa ot belogo tolsolobika c Sindromom krasnukhi. Rybnoe khozyistvo. Ehkspress-informatsia seriya: rybokhozyaistvennoy o splezovanie vnutrenkh vodoyomov. Moskva 1984; 4: 3-7.
112. Siwicki AK, Vergnet C, Charlemagne J y Dunier M. Monoclonal-antibodies against goldfish (*Carassius auratus*) immunoglobulin-application to the quantification of immunoglobulin and antibody secreting cells by elispot and seric immunoglobulin and antibody levels by ELISA in carp (*Ciprinus carpio*). Vet Res 1994; 25: 458-467.
113. Sniesko SF. The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. J Fish Biol 1974; 6: 197-208.
114. Sokol F y Koprowski H. Structure function relationships and mode of replication of animal rhabdoviruses. Proc. Natl. Acad Sci 1975; 22: 933-936.
115. Stankiewicz EB. Fish culture in water heated by thermal effluents. Gospodarka Rybna 1979; 31: 11-13.
116. Stoskopf M. Fish Medicine. United States of America: W.B. Saunders Company; 1993: 482-484.

117. Svetlana J, Ivetic V y Radosavljevic. *Rhabdovirus carpio* as a causative agent of disease in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*-Walbaum). *Acta Vet* 2006; 56: 553-558.
118. Trust TJ, Bull LM, Currie BR y Buckley JT. Obligate anaerobic bacteria in the gastrointestinal microflora of the grass carp (*Ctenopahyngodon idella*), gold fish (*Carassius auratus*), and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. of the Fisher Res Board of Can* 1974; 36: 1174-1179.
119. Tsien, RT. The Green Fluorescent protein. *Annu Rev biochem* 1998; 67: 509-544.
120. Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Mniloff J, Mayo MA, McGeorch DJ, Pringle, CR. *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International committee on Taxonomy of Viruses.* New York: Academic Press, 2000.
121. Villanova VG, Gardiol D, Taborda AM, Reggiardo V, Tanno H, Rivadeneira DE, Perez RG y Giri AA. Strategic Approach to produce low-cost, efficient and stable competitive internal controls for detection of ARN viruses by use of reverse transcription-PCR 2007; 45: 3555-3563.
122. Wagner R. *The Rhabdoviruses.* New York: Plenum Press, 1987.
123. Wagner RR. *Rhabdoviridae and Their Replication.* New York: Raven Press, 1991.
124. Walker PJ, Benmansour A, Calisher CH, Dietzgen R. Family Rhabdoviridae. *En: Van Regenmortel MHV, editor: The Seventh Report of the International Committee for Taxonomy of Viruses.* San Diego, CA: Academic Press, 2000: 563-583.

125. Way K. Rapid detection of SVC virus antigen in infected cell cultures and clinically diseased carp by the enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA). *J Appl Ichtyol* 1991; 7: 95-107.
126. Wolf K. *Fish viruses and Fish Viral Diseases*. Ed. USA: Comstock Cornell University Press. 1988.
127. Woo P y Brunol D. *Fish Diseases and Disorders Volumen III. Viral, Bacterias and Fungal Infections*. London: CABI Publishing, 1999.
128. Wunner WH, Calisher CH, Dietzgen RG, Jackson AO, Kitajima EW y Lafon MF. Family Rhabdoviridae. In: *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of viruses, sixth report of the international Committee on Taxonomy of viruses*. New York: Springer Verlag. 1995: 275-288.