



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

**Detección de *Cyprinid herpesvirus 3 (CyHV3)* en patos silvestres migratorios
de los géneros *Anas*, *Mareca* y *Spatula* en el altiplano mexicano**

TESIS

QUE PARA OPORTUNAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

PRESENTA:

OSCAR ABEL TORRES MEZA

TUTOR PRINCIPAL: **Dr. GARY GARCÍA ESPINOSA (FMVZ, UNAM)**
COMITÉ TUTORAL: **Dra. ELIZABETH LOZA RUBIO (INIFAP)**
Dr. JOSÉ JUAN MARTÍNEZ MAYA (FMVZ, UNAM)



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.

Dedicatoria

A mis padres, que siempre me han apoyado a seguir haciendo lo que me apasiona. Los amo con el corazón.

Para mis hermanos, que me han ayudado en cualquier situación adversa que se presenta y por todos los momentos buenos y malos que hemos pasado y pasaremos juntos.

A Ángela, quien involuntariamente siempre me recuerda lo importante que es mantener la mente tan abierta como un niño ante las dudas generadas por la naturaleza.

Para Carolina, quien me ha traído un paraíso al corazón desde que me enamoró con su tierna manera de ser conmigo. Una vida a óleo contigo.

Agradecimientos

A la UNAM por trabajar día a día para brindar una educación accesible y competente para las personas que desean

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia que ha sido mi casa durante los últimos siete años y dónde he conocido personas excepcionales.

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (Conacyt) por la beca otorgada para que yo pudiera realizar mis estudios.

Al proyecto PAPIIT IN218716 por el financiamiento para llevar a cabo el presente estudio.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el financiamiento para presentar el presente trabajo en un congreso extranjero.

A mi tutor Dr. Gary García Espinosa por seguir confiando en mí para llevar a cabo este trabajo y especialmente su dedicación para mi formación académica y personal.

A los miembros de mi comité tutorial; Dra. Elizabeth Loza Rubio y José Juan Martínez Maya por sus aportes a lo largo del posgrado que me ayudaron a tener una perspectiva más amplia del entorno.

A los miembros del jurado por invertir tiempo en revisar el presente trabajo y sus comentarios que contribuyeron a mejorar este escrito.

A mis compañeros de laboratorio; Dr. Luis Ramírez, Dr. Fernando Chávez, M. en C. Erika Ornelas, MVZ Mayra Araujo y MVZ David Rodríguez por el apoyo en el procesamiento y análisis de muestras.

A mi mejor amiga Elisa Espejel que sin importar nuestra larga ausencia seguimos conservando un cariño especial por el otro y la voluntad de hacernos mejores personas para apoyar al otro.

A mi mejor amigo Ernesto Méndez que siempre han sido un enorme apoyo en mis momentos más difíciles y han compartido muchas aventuras conmigo.

A todos mis compañeros, colegas y amigos que con su trabajo me ayudan a inspirarme para ser cada día mejor.

Abstract

A viromics study on the intestinal contents of migratory wild ducks of the genera *Anas*, *Mareca*, and *Spatula* during their winter stay in Mexico showed the presence of the family *Alloherpesviridae*. The genus *Cyprinivirus* is part of this family, and the species *Cyprinid herpesvirus 3* (CyHV3) is the etiological agent of the lethal disease known as koi herpesvirosis, which affects different varieties of *Cyprinus carpio*. In this study, 78 samples of wild duck intestinal contents were analyzed by endpoint polymerase chain reaction, of which seven samples were positive for the amplification of the *TK* gene fragment corresponding to CyHV3. These results contribute to the knowledge about the spread of the virus to other species of aquatic animals, where fish and ducks coexist.

Resumen

Un estudio sobre contenido intestinal de patos migratorios pertenecientes a los géneros *Anas*, *Mareca* y *Spatula* durante su estancia invernal en México, mostró presencia de la familia *Alloherpesviridae*. El género *Cyprinivirus* es parte de esta familia, mientras que *Cyprinid herpesvirus 3* (CyHV3) es el agente etiológico de la enfermedad letal conocida como herpesvirosis de la carpa koi, la cual afecta diferentes variedades de *Cyprinus carpio*. En este estudio, 78 muestra de contenido intestinal fueron analizadas mediante PCR punto final, de las cuales 7 muestras fueron positivas a la amplificación de fragmento de gen *TK* correspondiente a CyHV3. Estos resultados contribuyen al conocimiento sobre la propagación del virus a otras especies de animales acuáticos, donde coexisten peces y patos.

ÍNDICE

Contenido

Abstract	iv
Resumen.....	iv
Introducción	1
Herpesvirosis de la carpa koi.....	3
Detección de <i>Cyprinid herpesvirus 3</i>	5
Genoma de <i>Cyprinid herpesviru 3</i>	6
Distribución	7
Hipótesis.....	11
Objetivo específico	11
Objetivos particulares	11
Material y métodos	12
1) Control positivo.....	12
2) Estandarización testigo positivo TK	13
3) Estandarización control interno.....	14
a) Extracción de ADN.....	14
b) Estandarización de PCR punto final para IC-Intype DNA con Oligos IC-DNA Intype y Oligos para <i>Cyprinid herpesvirus 3</i>	15
4) Procesamiento de muestras	15
5) Contaminación por pUC57-TK.....	16
6) Amplificación de región distinta a TK.....	16
7) Purificación a partir de productos de PCR	17
8) Análisis con BLASTn.....	18
9) Análisis filogenético	18
Resultados	19
1) Control positivo.....	19
2) Estandarización del testigo positivo TK.....	20
3) Estandarización del control interno	21
4) Procesamiento de muestras	24
5,6,7) Detección de ADN <i>Cyprinid herpesvirus 3</i>	25
8) Análisis con BLASTn.....	30

9) Análisis filogenético	31
Discusión	32
Conclusión	35
Sugerencias	36
Referencias.....	37

Introducción

Los animales domésticos y silvestres sanos pueden tener en sus heces una amplia diversidad de familias y géneros virales que en su mayoría corresponden a virus de otros animales, plantas y bacterias (Phan et al. 2011; Ge et al. 2012; Fawaz et al. 2016). Los estudios que lo notifican se han realizado con técnicas de secuenciación masiva, también conocida como secuenciación de última generación y se han llevado a cabo en una cantidad reducida de animales en un tiempo y espacio específico. La cantidad de información obtenida a través de esta tecnología es tan amplia que es complejo entender la participación de los animales en la transmisión y dispersión de virus hacia la salud pública, salud animal, vegetal y ambiental.

Los patos silvestres, entre ellos los géneros *Anas*, *Spatula* y *Mareca* spp son aves acuáticas que en su mayoría migran durante el invierno hacia latitudes donde el clima es menos frío (Birds of North America 2017) y muchas de las especies se adaptan a hábitat pantanosos donde se pueden alimentar cerca de la superficie del cuerpo de agua, principalmente; moluscos, semillas, crustáceos, plantas y planctón (Reeber 2015). Por otra parte, desde los años 30's en Estados Unidos se conocen cuatro rutas migratorias principales en las zonas del Atlántico, Mississippi, Central y Pacífico (Lincoln 1935). Recientemente, en Norteamérica se han identificado regiones geográficas donde hay interacciones entre estas rutas y, con excepción de la del Atlántico, todas las rutas tienen comunicación con trayectos hacia México que los patos recorren desde el sur de Canadá y gran parte de Estados Unidos (Buhnerkempe et al. 2016). Éstas aves y su hábitat son consideradas reservorios naturales para el virus de *Influenza tipo A* y *Avulavirus aviard* (Thomas et al. 2007; Cuevas et al. 2009).

Un primer estudio realizado por Ramírez L. y colaboradores en invierno de 2015-2016 sobre virómica en contenido intestinal de los patos silvestres migratorios; cerceta alas azules (*Spatula discors*), cerceta alas verdes (*Spatula crecca*), cerceta canela (*Spatula cyanoptera*), pato mexicano (*Anas platyrhynchos diazi*), pato

golondrino (*Anas acuta*), pato panadero (*Mareca americana*), pato cucharón (*Spatula clypeata*), pato pinto (*Mareca strepera*) y pato tepalcate (*Oxyura jamaicensis*) en un humedal de las Ciénegas de Lerma, evidenció la presencia de diversas familias y géneros virales de aves, peces, plantas, invertebrados y bacterias. Donde se obtuvo una abundancia entre 1-11% de la familia *Alloherpesviridae* en las muestras de anátidos y con base a la identificación de especies con BLASTx se encontró presencia de *Cyprinid herpesvirus 1* (Ramírez-Martínez et al. 2018). Aunque es posible la presencia de otro virus perteneciente a la familia *Alloherpesviridae*.

El Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV, por sus siglas en inglés) clasifica dentro del orden *Herpesvirales* tres familias, entre ellas la familia *Alloherpesviridae*, en la que se encuentran los géneros; *Batrachovirus*, *Salmonivirus*, *Ictalurivirus* y *Cyprinivirus*, estos géneros incluyen algunos virus patógenos para organismos acuáticos como; carpas, anguilas, bagres, esturiones, salmones y un anfibio (ICTV 2015). Con base a la literatura actual, los virus del orden *Herpesvirales* son considerados específicos de especie y pueden causar diversas alteraciones en diferentes órganos y tejidos (MacLachlan and Dubovi 2011). Por otra parte, el género viral que infecta a carpas y anguilas se conoce como *Cyprinivirus*. Los virus de la familia *Alloherpesviridae* son envueltos, esféricos o pleomórficos, con un tamaño de 150-200 nm de diámetro. Su material genético es DNA lineal de doble cadena (dsDNA) y su tamaño es de 134 – 148 kb (MacLachlan and Dubovi 2011), sin embargo; una revisión de información en bases de datos oficiales, encontró que el tamaño de secuencias genómicas completas correspondientes a los *Alloherpesvirus* varían entre 134.15 – 295.15 kb .(Davison 1992; Davison et al. 2006, 2018; Aoki et al. 2007; Lee et al. 2016).

Se sabe que *Cyprinid herpesvirus 3* (CyHV3), miembro del género *Cyprinivirus*, afecta a la carpa común (*Cyprinus carpio carpio*), carpa koi (*Cyprinus carpio koi*) y especies híbridas de la misma, causando una enfermedad conocida como “Herpesvirosis de la carpa koi” de notificación obligatoria para la Organización

Mundial de Sanidad Animal (OIE) (OIE 2018a) ya que causa mortalidades que pueden llegar al 100% (Hedrick et al. 2000; Haenen et al. 2004). Así mismo, la carpa ocupó el cuarto lugar en producción nacional de acuicultura con 30,300 toneladas durante 2017 de acuerdo a datos publicados por SADER (CONAPESCA 2017). Mientras que otras especies que son huésped de Alloherpesvirus como anguilas, esturiones, bagres y salmones que tienen distribución en Asia, Europa y Norte América (FAO (Food & Agriculture Organisation) 2012). Por lo tanto, CyHV3 sería el virus más importante que se podría encontrar en las muestras de patos silvestres, además; se sabe que existen poblaciones de carpas en el cuerpo de agua donde se tomaron las muestras para el estudio de Ramírez y col.

Herpesvirosis de la carpa koi

Cyprinid herpesvirus 3 (CyHV3) causa una enfermedad conocida como nefritis intersticial, necrosis de las branquias o herpesvirosis de la carpa koi, en las variedades carpa común y carpa koi de *Cyprinus carpio* (Gotesman et al. 2013). Es una enfermedad que se caracteriza por presentar morbilidad de 100% con mortalidades de 70 a 80% y en algunos casos alcanzando hasta 100% (Hedrick et al. 2000; Haenen et al. 2004). Se han documentado signos inespecíficos en carpas de juveniles a adultas, como; letargia, anorexia, nado errático, enrojecimiento de aletas y cuerpo, aletas rotas, producción exacerbada de moco cutáneo, ojos hundidos y decoloración de branquias con necrosis en algunos casos (Hedrick et al. 2000; Sano et al. 2004; Tu et al. 2004; McCleary et al. 2011).

Mediante imagen de bioluminiscencia se ha comprobado que la principal puerta de entrada para CyHV3 es la piel, siendo la base de las aletas el primer sitio donde el herpesvirus ingresa al huésped. Así mismo, experimentalmente se ha comprobado que en el epitelio dérmico ocurre la primer replicación viral y posteriormente, entre 1 o 2 días ocurre una diseminación por el organismo causando una viremia que resulta en enfermedad sistémica (Costes et al. 2009). Los órganos donde principalmente se replica el alloherpesvirus son branquias, hígado, bazo, intestino y

riñón, en los cuales generalmente se pueden encontrar grandes cantidades de ADN viral durante el curso de la infección (Gilad et al. 2004). Se ha comprobado que durante los primeros días de infección se presenta anemia con linfocitosis, monocitosis y granulocitosis, mientras que las concentraciones séricas de sodio disminuyen y aumentan las de potasio y creatinina, representando una pérdida de funciones de osmorregulación en branquias, piel y riñón. Razón por la que se presenta alta mortalidad en infecciones agudas (Negenborn et al. 2015). Las carpas infectadas eliminan partículas virales por heces, orina, branquias y el mucus cutáneo (Gilad et al. 2004; Dishon et al. 2005; Negenborn et al. 2015).

Experimentos recientes han comprobado que peces ornamentales y peces silvestres sobrevivientes a la infección quedan como portadores al mantener material genético de CyHV3 de manera latente en células sanguíneas de la línea blanca, sin presentar secreción de partículas virales por branquias o excremento (Eide et al. 2011; Xu et al. 2013; Zheng et al. 2017). Así mismo; se ha concluido que las células B son el sitio principal para mantener ADN de forma latente (Reed et al. 2014). Se ha comprado que CyHV3 puede reactivar su actividad patógena en carpas, 2 a 16 días después de haber sido sometidas a temperaturas de 23°C (factor estresante) y presentar secreción de partículas virales en branquias y excremento con detección de 10 a 10³ copias de ADN (Eide et al. 2011).

Un factor ambiental determinante en la presencia de la enfermedad es la temperatura del agua, ya que se ha observado que los brotes han ocurrido principalmente en verano y otoño, en los que la temperatura del agua de estanques se encuentra entre 18 a 24°C (Bretzinger et al. 1999; Hedrick et al. 2000; Perelberg et al. 2003). En cultivo celular KF-1 (aletas koi 1, por sus siglas en inglés) el crecimiento óptimo sucede entre 20 y 25°C, pero este se detiene a temperaturas de 4 y 30°C y se limita a 10°C (Gilad et al. 2003). Algunos ensayos en campo y laboratorio han comprobado que las infecciones a bajas temperaturas ocurren sin presencia de signos clínicos. Sin embargo; cuando los peces son transferidos a

temperaturas de crecimiento del virus ocurren episodios agudos de mortalidad (Bretzinger et al. 1999; Gilad et al. 2003).

Mediante uso de PCR tiempo real se encontró la presencia de material genético en sedimento y agua del lago Biwa, Japón, donde se presentó un brote de nefritis intersticial en carpas silvestres durante 2004. Se demostró que las muestras de sedimento tuvieron concentraciones virales, aproximadamente 100 veces más altas que las muestras de agua tomadas del mismo sitio, con lo que se sugiere que el sedimento podría representar un reservorio natural para CyHV3 (Honjo et al. 2012).

También se sugiere que especies como *Carassius auratus auratus* (pez dorado o goldfish en inglés), *Ctenopharyngodon idella* (carpa herbívora o grass carp en inglés) y *Carasius carassius* (carpa cruciana) podrían tener un papel importante para la epidemiología de CyHV3, ya que se ha detectado presencia de ADN correspondiente al alloherpesvirus en ejemplares sin signos clínicos, algunos siendo importados de Asia a Alemania (Hedrick et al. 2006; El-Matbouli et al. 2007; Sadler et al. 2008; Bergmann et al. 2009). Sin embargo, solo se ha comprobado que el pez dorado puede transmitir CyHV3 a carpas comunes (El-Matbouli and Soliman 2011).

Detección de *Cyprinid herpesvirus 3*

En el Manual Acuático de la OIE 2012 en su capítulo “2.3.6. Herpesvirosis de la carpa koi” se describen los métodos de diagnóstico que se han empleado para detección directa e indirecta de CyHV3. Las técnicas inmunológicas, como ELISA e inmunohistoquímica, pueden ser adecuados para identificación y diagnóstico rápidos, pero no se han comprobado ni validado ampliamente. Por otra parte, el diagnóstico de herpesvirosis de la carpa koi se puede confirmar con aislamiento del virus en cultivo celular, no obstante; solo se ha logrado hacerlo en algunas líneas celulares y estas pueden ser difíciles de manejar (OIE 2012). Además, el aislamiento en cultivo celular no es tan sensible como los métodos moleculares para

detectar ADN de CyHV3 y no se recomienda como primera opción como técnica diagnóstica para la necrosis de las branquias (Haenen et al. 2004).

El principal método de detección se lleva a cabo mediante PCR punto final y su posterior secuenciación. Los principales protocolos se basan en detección de secuencias menores a 450 pb. El primero fue desarrollado por Bercovier y col. en 2005 y detecta un fragmento del marco de lectura abierto 55 (ORF, por sus siglas en inglés) con tamaño de 673 pb (pares de bases) que codifica para la enzima tiamin cinasa (TK). Los oligos fueron diseñados para detectar un fragmento de 410 pb y de acuerdo a los resultados de los autores es posible detectar hasta 10 fentogramos de ADN de CyHV3 correspondiente a 30 partículas virales (Bercovier et al. 2005). El segundo protocolo fue desarrollado por Gray y col. en 2002 y modificado por Yuasa y col. en 2005, detecta una secuencia que inicia en un sitio de restricción SphI-5 no codificable y una sección del ORF 54 (2,031 pb) que probablemente codifica para una proteína de 676 aminoácidos. Los iniciadores diseñados detectan un fragmento de 290 pb y el protocolo de ciclado tienen una sensibilidad suficiente para detectar hasta 100 fentogramos de ADN, el equivalente a 600 copias de material genético (Gray et al. 2002; Yuasa et al. 2005).

Finalmente, el manual acuático menciona que los fragmentos de amplificación deben purificarse y secuenciarse para su posterior comparación con secuencias de referencia.

Genoma de *Cyprinid herpesviru 3*

Las principales cepas de CyHV3 aisladas en Israel, Japón y Estados Unidos cuentan con un genoma de 295 Kb con 22Kb de secuencias repetidas terminales, por lo tanto; los 164 ORFs probables contemplan 8 ORFs repetidos que están en ambos extremos del genoma (Aoki et al. 2007). Mediante un estudio de espectrofotometría de masas se identificó que de 156 ORF probables, 40 corresponden a proteínas en viriones maduros, dentro de las que se incluyen 3 proteínas de cápside, 13 de envoltura, 2 de tegumento y 22 proteínas estructurales

que aún están por clasificarse (Michel et al. 2010). Tres genes involucrados en la síntesis de dNTPs (deoxinucleotidos) necesarios para sintetizar moléculas de ADN; timidilato monofosfato cinasa, ribonucleotido reductasa (RNR) y TK comparten homología con genes pox virus (Ilouze et al. 2006). Sin embargo; TK, RNR y otros genes involucrados en sintetizar ADN, como el gen que codifica para deoxiuridin trifosfato pirofosfatasa, no son esenciales para la replicación viral en línea celular CCB, pero son factores de virulencia importantes para la presencia de signos clínicos y mortalidad (Fuchs et al. 2011). En particular se ha probado que el gen TK (ORF 55) tiene un papel relevante en la patogenicidad ya que al inocular carpas con viriones atenuados en el gen TK se observaron mortalidades de 30-40% (Costes et al. 2008). En los últimos años se ha ocupado la secuencia completa del gen TK y regiones no codificantes a su alrededor para realizar análisis filogenéticos de CyHV3 debido a su importancia en la patogenicidad del alloherpesvirus (Sunarto et al. 2011; Yingying et al. 2014; Chen et al. 2018).

Distribución

Los primeros brotes importantes de esta enfermedad se reportaron en Israel y Estados Unidos. En Israel durante 1998 se registraron pérdidas en granjas de carpa común y carpa koi en estanques de todas las edades con temperatura de 22 a 24°C y en verano de 1999 se registraron mortalidades mayores a 50%. Mientras que en Estados Unidos el brote afectó carpas koi 10 a 15 días después de haber asistido a un show de carpas koi en 1998. En ambos casos se determinó la presencia de un *Cyprinivirus* diferente a los conocidos hasta esos años (*Cyprinid herpesvirus 1 y 2*) ya que al enfrentarlos con un suero de conejo anti *Cyprinid herpesvirus* no se logró su neutralización en cultivo celular KF-1. Adicionalmente, se detectó efecto citopático solamente en cultivo celular KF-1 inoculado con macerado de riñón, bazo y branquias provenientes de carpas infectadas. Hasta esos años solo se había detectado efecto citopático en cultivo celular FHM (Fathead Minnow) y EPC (Epitelioma papuloso cyprinido, por sus siglas en inglés) a causa de *Cyprinivirus*

(Hedrick et al. 2000). Posteriormente, los análisis de polipéptidos y fragmentos del genoma viral mostraron que los virus aislados en Estados Unidos e Israel eran idénticos entre ellos pero diferentes a *Cyprinid herpesvirus 1* (Gilad et al. 2002). Se ha estimado que para finales del 2000 la enfermedad se diseminó en el 90% de las granjas de carpas en Israel y para 2002 se calculó un costo de 3 millones de dólares en acuicultura debido a la necrosis de las branquias (Perelberg et al. 2003).

A partir de estos años se empezaron a reportar brotes en Europa, Asia y Estados Unidos. En 2004 un estudio publicado por la Asociación Europea de Patólogos en Peces (European Association of Fish Pathologists en inglés) mostró la situación de la enfermedad en Europa y Asia (donde se incrementaron los casos severos). Se detectó presencia de CyHV3 con brotes de la enfermedad en países de Europa como: Austria, Bélgica, Dinamarca, Francia, Alemania, Italia, Luxemburgo, Holanda, Suiza, Inglaterra, Gales y Polonia. Los reportes se encuentran entre 1998 y 2004, en algunos países se tenía sospecha de la enfermedad años antes, pero se confirmó posteriormente y en su mayoría los casos fueron confirmados por técnicas de PCR, PCR tiempo real e hibridación *in situ*. Mientras que los países de Asia que reportaron la enfermedad fueron: Indonesia, Israel, Japón, Sudáfrica, Taiwan, Sumatra, Estados Unidos y Tailandia. Los brotes fueron confirmados mediante PCR y PCR tiempo real entre 1998 y 2004 (Haenen et al. 2004).

Desde 2007 la “Herpesvirosis de la carpa koi” es una enfermedad de notificación para la OIE y actualmente forma parte de las Enfermedades, infecciones e infestaciones de la Lista de la OIE en vigor, del 2018 (OIE 2018a).

El Sistema Mundial de Información Zoonosaria (WAHIS, por sus siglas en inglés) de la OIE cuenta con registros a partir del 2005. Algunos países siguieron reportando brotes de la enfermedad y otros reportaron sus primeros brotes, los países europeos con nuevos brotes fueron; Republica Checa, Croacia, Irlanda, Lituania, Hungría, Rumania, Eslovenia, España y Suecia; los más recientes en Republica Checa, Irlanda y Croacia durante 2016. Los países de Asia que se

sumaron a la lista de naciones con brotes de la enfermedad fueron; Malasia, Singapur, Irán, Corea y Taipei Chino, siendo los últimos dos países en los que se presentaron los brotes más recientes (con reportes a partir de 2016). Mientras que el continente americano sumó a las naciones de Canadá (en 2016) y Trinidad y Tobago (en 2011 y 2013, respectivamente) a la lista de países con brotes de necrosis de las branquias. En Sudáfrica solo se han reportados dos brotes (OIE 2018b).

A la fecha los países o regiones que más reportes han emitido a la OIE sobre herpesvirosis de la carpa koi son; Holanda con 9, Reino Unido y Malasia con 8, Polonia, Corea y Dinamarca con 7 y Hong Kong con 6. Mientras que los países o regiones con menos reportes son; España, Irán, Trinidad y Tobago, Croacia, Luxemburgo, Taiwan y Lituania con 1, Alemania, Japón, Rumania, Israel y Austria con 2 (Figura 1).

Sobre México; la OIE, CONAPESCA, publicaciones en PubMed, Scopus y Redalyc no mencionan evidencia directa o indirecta sobre la presencia de CyHV3 (Torres Meza 2017). Actualmente la necrosis de las branquias causada por CyHV3 no se encuentra en el “Acuerdo mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos” elaborada por Senasica (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria), se menciona una “herpesvirosis de la carpa koi” en el grupo 1 de “Enfermedades exóticas de notificación obligatoria”. Sin embargo; se atribuye a un herpesvirus 1 (HV-1 o HVK) (SAGARPA 2016) posiblemente *Cyprinid herpesvirus 1* también miembro del género *Cyprinivirus*. Lo que podría atribuirse a un error al redactar la lista, ya que *Cyprinid herpesvirus 1* causa una enfermedad conocida como viruela de la carpa (Compendium 2011).

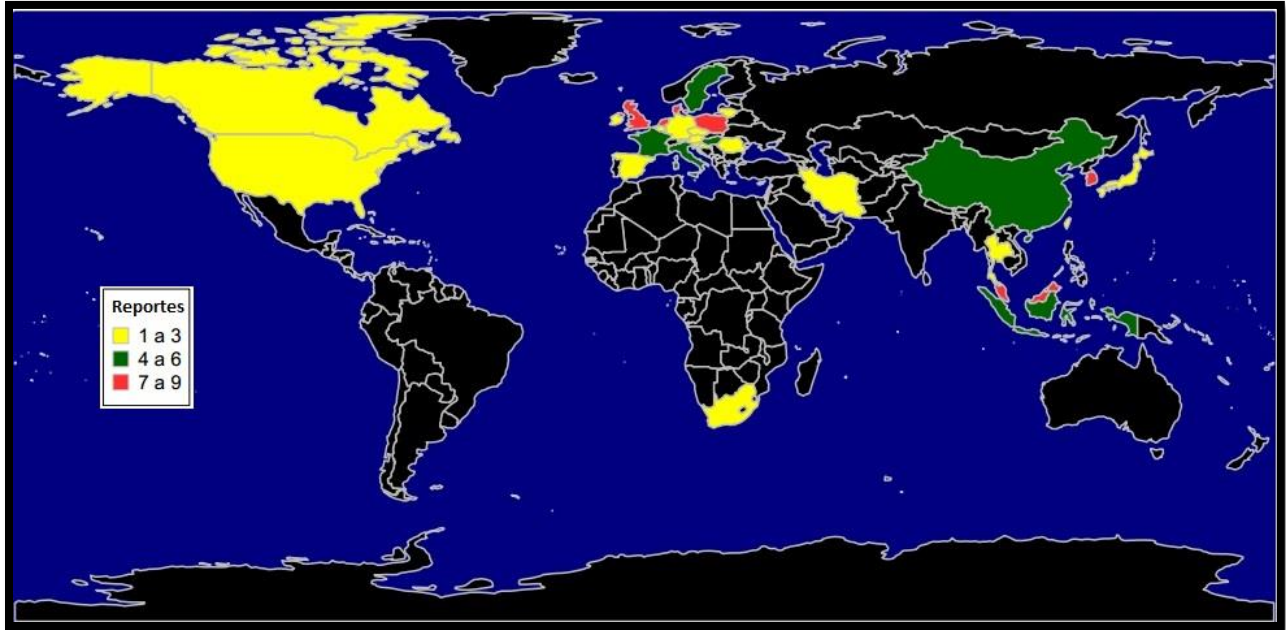


Figura 1. Mapa de la distribución mundial correspondiente al mínimo número de reportes sobre herpesvirosis de la carpa koi 2005-2017. Mapa de elaboración propia a partir de la base de datos WAHIS de la OIE (OIE 2018b) y programa R x64 versión 3.5.1.

Hipótesis

De acuerdo con la información publicada sobre la familia *Alloherpesviridae*, la distribución de los huéspedes de cada especie viral y las características migratorias de los patos silvestres de los géneros *Anas*, *Mareca* y *Spatula* spp se espera que al menos una muestra de contenido intestinal tendrá presencia de material genético correspondiente a *Cyprinid herpesvirus 3*.

Objetivo específico

Demostrar la presencia de material genético correspondiente a *Cyprinid herpesvirus 3* en al menos una muestra de contenido intestinal de patos silvestres mediante reacción de PCR-Punto final.

Objetivos particulares

- 1) Obtener un fragmento de gen sintético TK de *Cyprinid herpesvirus 3* que funcionará como control positivo.
- 2) Estandarizar las condiciones para la reacción de PCR en punto final para amplificar el fragmento de 410 pb correspondiente al gen TK de *Cyprinid herpesvirus 3*.
- 3) Estandarizar un control interno que corrobore la integridad del ADN purificado a partir de las muestras de contenido intestinal y compruebe la confiabilidad de las reacciones de PCR-punto final al descartar presencia de inhibidores de la reacción.
- 4) Procesar muestras de contenido intestinal correspondientes a patos silvestres de los géneros *Anas*, *Mareca* y *Spatula* spp con procedimientos estandarizados.
- 5) Probar ausencia de contaminación por plásmido pUC57-TK en muestras positivas a la amplificación de fragmento TK.

- 6) Amplificar una región genómica distinta a TK con oligos Sph en muestras positivas a fragmento TK.
- 7) Purificar el amplicón a partir de gel para su posterior secuenciación por método de Sanger.
- 8) Comprobar si el material genético amplificado corresponde a *Cyprinid herpesvirus 3* mediante comparación de secuencia obtenida con base de datos GenBank.
- 9) Realizar un análisis filogenético a partir de las secuencias con mayor identidad a la posible secuencia obtenida.

Material y métodos

1) Control positivo

El testigo positivo utilizado en la técnica de PCR fue un plásmido pUC57 al que se le insertó un fragmento del gen TK de CyHV3. La secuencia del gen TK (GenBank AB375391) fue sintetizada y clonada por la empresa GenScrip (Estados Unidos). El aumento de la cantidad de plásmido se trabajó en el Departamento de Biotecnología en Salud animal del CENID- Microbiología Animal del Inifap (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias).

El plásmido recombinante pUC57-TK fue clonado en bacterias *E.coli* DH-5 α de acuerdo al protocolo de Hanahan (Sambrook and Green 2012) que se describe brevemente a continuación:

Transformación. Mediante choque térmico se transformaron bacterias *E.coli* DH-5 alfa con el plásmido recombinante. Se inocularon dos medios semisólidos LB-ampicilina con 20 y 50 μ L (respectivamente) y se dejaron en incubación 10 horas a 32°C. Las colonias presentes fueron transformadas con plásmido pUC57-TK.

Multiplicación. Una vez obtenidas las colonias, se eligieron de acuerdo a su tamaño para ser sembradas en 500 ml de medio líquido LB con ampicilina que se incubaron en una agitadora horizontal (Lab-Line-3527-Orbit-Environ-Shaker) a 300 rpm y 37°C entre 8 y 15 horas.

La purificación del ADN del plásmido recombinante se realizó utilizando el kit HiSpeed Plasmid Midi Kit 25 (QIAGEN, Alemania, Cat. No. 12643) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Al final del procedimiento se hizo una cuantificación del eluido mediante el uso de un NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific).

Electroforesis. Se comprobó la presencia de material genético en un gel de agarosa al 1% usando solución TAE, agua destilada y agarosa UltraPure Low Melting Point (Invitrogen, Alemania, número de catálogo 16520100). La elución de ADN se combinó con buffer de carga constituido por: azul de bromofenol al 0.25%, xylencyanol 0.25% y glicerol 30%, a una razón de 4:1. La mezcla y marcador de peso molecular GeneRuler 100 bp (Thermo scientific, Estados Unidos, número de catálogo SM0241) se procesaron a 100 volts durante 1 hora, una vez terminada se sumergió en colorante Green Medori (75 microLitros Green Medori + 500 mL Agua) por 20 minutos y al terminar se observó el gel en fotodocumentador Gel Doc XR+.

2) Estandarización testigo positivo TK

Reacción de PCR punto final. La reacción se estandarizó utilizando el Kit Top Taq Master Mix 250 (QIAGEN, Alemania, número de catálogo 200403), la secuencia de oligos utilizados se observa en el cuadro 1 (elaborados por Sigma-Aldrich, México). El termociclador a ocupar fue “Thermo Hybaid PCR *Express*” que se programó a una temperatura de desnaturalización inicial de 94°C durante 3 minutos, desnaturalización de ciclo a 95°C durante 1 minuto, alineación a 52°C durante 1 minuto, extensión a 72°C durante 1 minuto (40 ciclos) y extensión final a 72°C durante 10 minutos (OIE 2012).

Electroforesis. Se elaboró un gel de agarosa al 1% usando solución TBE, agua destilada y agarosa UltraPure Low Melting Point (Invitrogen, Alemania, número de catálogo 16520100) y teñido con SYBR Safe (Invitrogen, S33102, Estados Unidos) 10 microlitros por 100 mL de gel. Los productos de amplificación y marcador de peso molecular TRACK IT 100bp ladder (Invitrogen, Estados Unidos, número de catálogo 10488058) se procesaron a 100 volts durante 1 hora, para posteriormente visualizarlos en un transluminador GelLogic120.

3) Estandarización control interno

a) Extracción de ADN

Se estandarizó el control interno IC-Intype DNA (QIAGEN, número de catálogo 289980, Alemania) utilizando tres muestras de contenido intestinal de patos silvestres *Spatula discors* de la temporada invernal 2014-2015 (muestra 1 pato 12, muestra 2 pato 1, muestra 3 pato 13), estas fueron diluidas 1:10 con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y almacenadas a -70°C desde su colecta. Para llevar a cabo la extracción de ADN las 3 muestras se descongelaron a temperatura ambiente dentro de un gabinete de bioseguridad (NUAIRE, Biosecurity cabinet). Una vez descongeladas, se tomaron 200 µL de muestra con una repetición técnica de cada muestra. Posteriormente, se dió un tratamiento enzimático solamente a la repetición técnica con TURBO DNase (Invitrogen, número de catálogo AM2238, Estados Unidos) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El procedimiento de extracción ADN se llevó a cabo usando QIAamp MinElute Virus Spin Kit(QIAGEN, número de catálogo 57704) de acuerdo a las especificaciones del fabricante, adicionalmente se agregó en el buffer de lisis 0.5 µL por muestra de Intype- IC-DNA (QIAGEN, número de catálogo 289980, Alemania). Al terminar el proceso de purificación de ADN, se cuantificó la elución de cada muestra usando el NanoDrop 1000.

Electroforesis. Para comprobar la presencia de material genético, se elaboró un gel de agarosa al 1% usando solución TBE, agua destilada y agarosa UltraPure Low Melting Point (Invitrogen, Alemania, número de catálogo 16520100) y fue teñido con SYBR Safe (Invitrogen, S33102, Estados Unidos) 10 microlitros por 100 mL de gel. Se mezclaron 2 µL de buffer de carga BlueJuice Gel Loading Buffer 10X (Invitrogen, Estados Unidos, número de catálogo 10816015) y 8 µL de cada elución de ADN. La mezcla y marcador de peso molecular TRACK IT 100bp ladder (Invitrogen, Estados Unidos, número de catálogo 10488058) se procesaron a 100 volts durante 1 hora, para posteriormente visualizarlos en un transluminador GelLogic120.

b) Estandarización de PCR punto final para IC-Intype DNA con Oligos IC-DNA Intype y Oligos para *Cyprinid herpesvirus 3*.

Se utilizó como control interno IC-DNA Intype (QIAGEN, número de catálogo 289980, Alemania), las secuencias de oligos empleadas se observan en el cuadro 1 (elaborados por Sigma-Aldrich, México). Se ocuparon los mismos reactivos y condiciones (ciclado y electroforesis) bajo las que se estandarizó el testigo positivo TK y se esperaba una banda de amplificación de aproximadamente 177 pb. También se probó llevar a cabo una reacción de PCR punto final en dúplex, oligos IC-Intype DNA y oligos para CyHV3.

4) Procesamiento de muestras

Se ejecutaron los protocolos estandarizados (extracción de ADN con IC-Intype DNA y PCR punto final para amplificar fragmento de gen TK) a 87 muestras de contenido intestinal obtenidas de patos silvestres de los géneros *Anas*, *Mareca* y *Spatula spp* de la temporada invernal 2015-2016. Estas fueron diluidas en una relación 1:10 con buffer fosfato salino (PBS) y almacenadas a -70 °C desde su fecha de colecta entre enero y febrero de 2016 (Ramírez-Martínez et al. 2018).

5) Contaminación por pUC57-TK

Las muestras positivas a amplificación de fragmento TK se procesaron con PCR-punto final para descartar contaminación con plásmido pUC57-TK (control positivo) con oligos específicos para sitio de clonación (MCS, siglas en inglés) correspondiente al control positivo (cuadro 1). Se emplearon los mismos reactivos y equipo que se utilizaron para amplificar el fragmento del gen TK y las condiciones de ciclado fueron las siguientes; desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos, 40 ciclos de; desnaturalización a 94°C durante 60 segundos, alineamiento a 56 °C por 60 segundos y extensión final a 72°C por 60 segundos, concluyendo con extensión final a 72°C durante 10 minutos. La temperatura de alineamiento se calculó con base a la fórmula propuesta por Wallace *et al.* (Wallace et al. 1979).

La electroforesis se llevó a cabo bajo las mismas condiciones y reactivos empleados para electroforesis de productos amplificados TK.

6) Amplificación de región distinta a TK

Se utilizaron los mismos reactivos y equipo que se ocupó para amplificaciones de fragmento TK. Las muestras positivas a la amplificación de fragmento TK se procesaron de acuerdo al segundo protocolo de amplificación por PCR-punto final con oligos Sph referido por la OIE (cuadro 1). Las condiciones de ciclado fueron desnaturalización inicial a 94°C durante 30 segundos, 40 ciclos de; desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, alineamiento a 63°C por 30 segundos y extensión final a 72°C por 30 segundos, concluyendo con extensión final a 72°C durante 7 minutos (OIE 2012).

La electroforesis se llevó a cabo bajo las mismas condiciones y reactivos empleados para electroforesis de productos amplificados antes mencionados del fragmento TK.

7) Purificación a partir de productos de PCR

Una de las muestras positivas al fragmento TK (410 pb) y negativas a contaminación con plásmido pUC57-TK se procesó mediante PCR punto final con oligos para amplificar fragmento y gen completo TK (cuadro 1). Se emplearon los mismos reactivos y equipo que se utilizaron para amplificar el fragmento del gen TK y las condiciones de ciclado para el gen completo fueron las siguientes; desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, 40 ciclos de; desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, alineamiento a 52, 55 y 58°C por 30 segundos y extensión final a 72°C por 30 segundos, concluyendo con extensión final a 72°C durante 10 minutos, mientras que para el fragmento de gen TK fueron las mismas que se mencionaron anteriormente.

La electroforesis se llevó a cabo bajo las mismas condiciones y reactivos empleados para electroforesis de productos amplificados TK.

Se cortaron las bandas con un escarpelo estéril y se hizo un mezclado de las bandas correspondientes a cada muestra (pool muestra) para llevarse a cabo la purificación de las bandas con el kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit 50 (QIAGEN, número de catálogo 28704, Alemania) de acuerdo a las especificaciones del producto. El proceso de secuenciación por el método de Sanger se llevó a cabo en el Instituto de Fisiología Celular UNAM, en la Unidad de Biología Molecular con la Dra. Laura Ongay-Larios como responsable.

Cuadro 1. Oligos utilizados en cada ensayo. Secuencias, ADN blanco y tamaño de amplicón esperado de oligos utilizados en las reacciones de PCR punto final para amplificar fragmentos de IC-DNA Intype, gen TK (fragmento y completo), ORF54 y MCS. pb: pares de bases.

ADN blanco	Nombre	Secuencia	Tamaño esperado
IC-DNA Intype	EGFP-F	5'GAC CAC TAC CAG CAG AAC AC3'	177pb
	EGPF-R	5'-CTT GTA CAG CTC GTC CAT GC-3'	
Fragmento gen TK	TK-F	5'GGG TTA CCT GTA CGA G 3'	410 pb
	TK-R	5'CAC CCA GTA GAT TAT GC 3'	
ORF 54	Sph-F	5'GAC ACC ACA TCT GCA AGG AG 3'	292 pb
	Sph-R	5'GAC ACA TGT TAC AAT GGT CGC 3'	
Sitio de clonación (MCS)	MCS-F	5'GTA AAA CGA CGG CCA GTG 3'	510 pb
	MCS-R	5'GGA AAC AGC TAT GAC CAT G 3'	
Gen completo TK	TKcom-F	5'GTA AAA CGA CGG CCA GTG3'	997-1007 pb
	TKcom-R	5'GGA AAC AGC TAT GAC CAT G3'	

8) Análisis con BLASTn

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la base de datos en línea GenBank mediante el uso de Herramienta Básica de Búsqueda de Alineación Local (Basic Local Alignment Search Tool, BLAST por sus siglas en inglés).

9) Análisis filogenético

Se llevó a cabo el alineamiento de la secuencia obtenida con secuencias de genes parciales TK con mayor identidad (de acuerdo a la herramienta BLAST) mediante el algoritmo ClustalW. Se calcularon los cambios y diferencias entre las secuencias utilizando el modelo Kimura de 2 parámetros. Posteriormente, con base al alineamiento previo se construyó un árbol filogenético por el método de Neighbor-Joining, mientras que las estimaciones estadísticas de la filogenia se calcularon con el método Bootstrap con 1000 simulaciones. Todo se realizó utilizando el programa

Análisis de Genética Evolutiva Molecular (MEGA, por sus siglas en inglés) (Kumar et al. 2018).

Resultados

1) Control positivo

Multiplicación de bacterias *E.coli* DH-5 alfa transformadas con pUC57-TK en medio semisólido LB con ampicilina, bacterias sobreviven en presencia de ampicilina ya que el plásmido pUC57-TK contiene el gen de resistencia a ampicilina (Amp) (GenScrip 2018) (Fig 2).

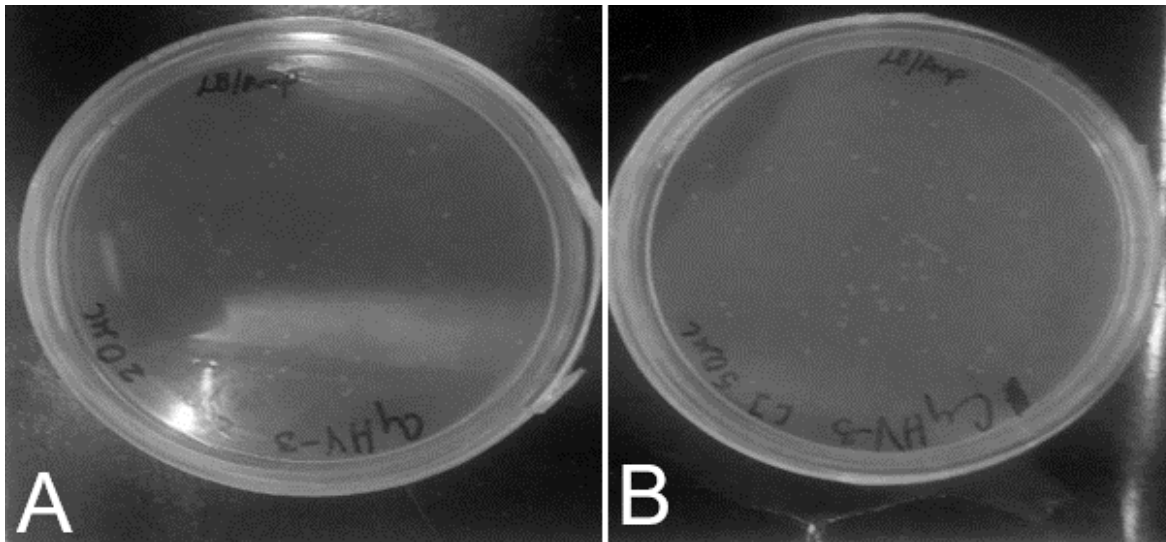


Figura 2. Transformación de bacterias *E.coli* DH-5 alfa con el plásmido pUC57-TK. A) Crecimiento de inóculo 20 µL de *E.coli* con pUC57-TK en medio LB con ampicilina por 10 horas y B) Crecimiento de inóculo 50 µL de *E.coli* con pUC57-TK en medio LB con ampicilina por 10 horas.

Plásmido pUC57-TK purificado a partir de bacterias *E. coli* transformadas que se utilizó como testigo positivo para la detección de CyHV3 (Fig. 3).



Figura 3. Plásmido pUC57-TK. Carril 1) Marcador de peso molecular. Carril 2) testigo sin pUC57-TK y carril 3) testigo pUC57-TK.

pb: pares de bases.

2) Estandarización del testigo positivo TK

Se corroboró la presencia del fragmento de gen TK CyHV3 presente en el plásmido pUC57-TK a través de estandarizar el protocolo PCR punto final de referencia en la OIE para detectar CyHV3 (OIE 2012) (Fig. 4).

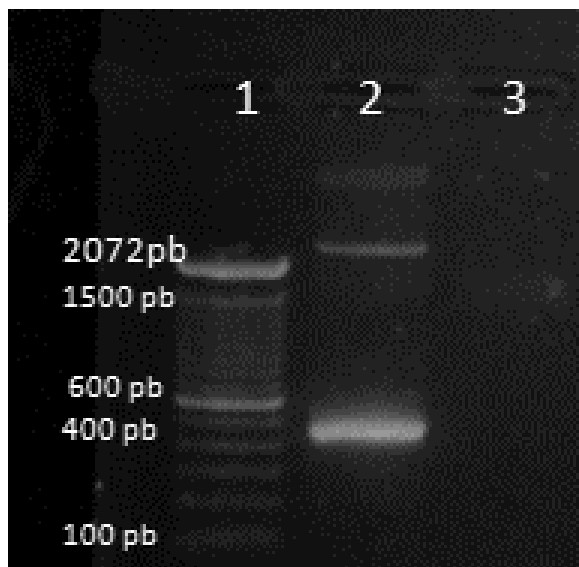


Figura 4. PCR punto final del gen TK. Carril 1) Marcador de peso molecular. Carril 2) banda de amplificación de aproximadamente 400 pb (pUC57-TK). Carril 3) testigo sin pUC57-TK.
pb: pares de bases

3) Estandarización del control interno

La visualización de la extracción de ADN total del contenido intestinal de 3 patos silvestres migratorios, *Spatula discors*, de la temporada invernal 2014-2015, que recibieron tratamiento o no con enzimas DNAsas previo a la extracción muestran que el uso de enzimas disminuye la cantidad del ADN extraído (Fig. 5).

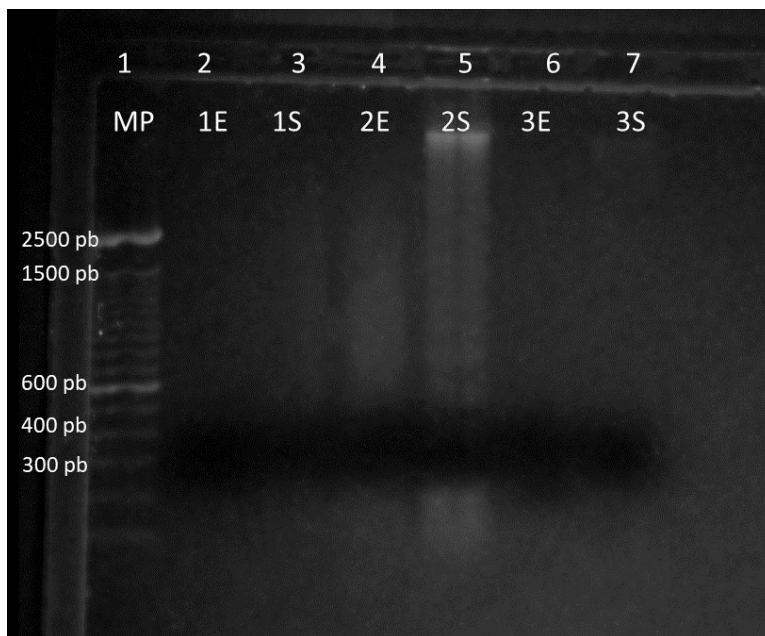


Figura 5. ADN total extraído de contenido intestinal de la especie *Spatula discors*. Carril 1). Marcador de peso molecular. Carril 2 y 3) ADN del ejemplar 12 con (1E) y sin (1S) tratamiento de enzimas respectivamente. Carril 4 y 5) ADN del ejemplar 1 con (2E) y sin (2S) tratamiento de enzimas respectivamente. Carril 6 y 7 del ejemplar 13 con (3E) y sin (3S) tratamiento de enzimas.
pb: pares de bases

b) Estandarización de PCR punto final para IC-DNA Intype con Oligos IC-DNA Intype y Oligos para *Cyprinid herpesvirus 3*

La visualización del gen exógeno (IC-Intype DNA) previo a la extracción de ADN total de contenido intestinal, de 3 patos silvestres migratorios de la temporada invernal 2014-2015 *Spatula discors*, que recibieron tratamiento o no con enzimas DNAsas previo a la extracción muestran que el gen exógeno no es degradado por el contenido de la muestra y permanece en la elución final de ADN. Por otra parte, la amplificación de la banda correspondiente al gen exógeno (177 pb) es claramente visible al usar el protocolo de referencia por parte de la OIE para CyHV3 TK, sin embargo; se han llegado a observar bandas de amplificación inespecíficas mayores a 600 pb (Fig. 6), eso puede explicarse debido a la temperatura de alineamiento baja (52°C) que se utiliza para amplificar el gen TK.

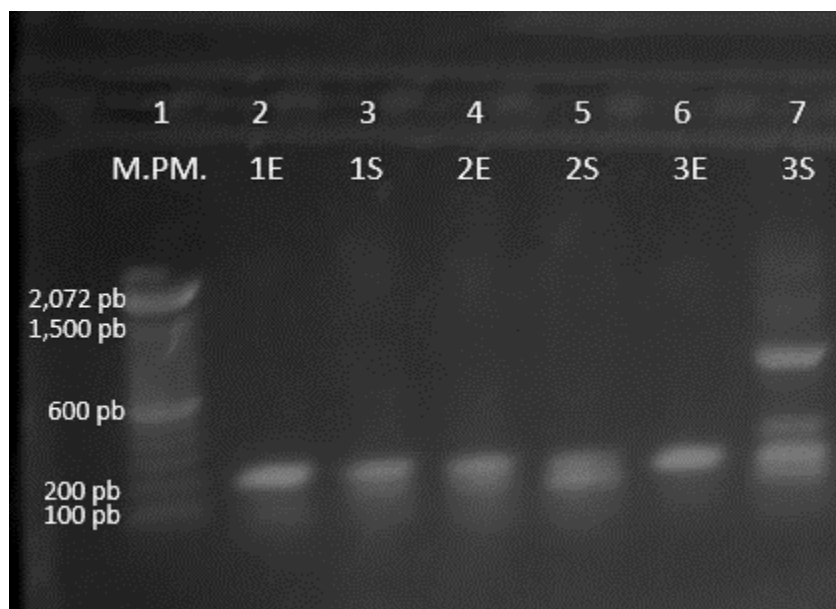


Figura 6. Bandas de amplificación de aproximadamente 177 pb, correspondientes al fragmento IC-Intype DNA. Carril 1) Marcador de peso molecular. Carril 2 y 3) IC-intype en ADN del ejemplar 12 con (1E) y sin (1S) tratamiento de enzimas respectivamente. Carril 4 y 5) IC-intype en ADN del ejemplar 1 con (2E) y sin (2S) tratamiento de enzimas respectivamente. Carril 6 y 7) IC-intype en ADN del ejemplar 13 con (3E) y sin (3S) tratamiento de enzimas. El carril 7 muestra la amplificación de una banda inespecífica mayor a 600 pb.
pb: pares de bases.

Los ensayos de PCR punto final dúplex mostraron interferencia en la amplificación de las bandas esperadas de 177 pb para IC-Intype DNA y 410 pb para TK CyHV3, debido a una competencia por los componentes de la reacción. Las bandas de amplificación no se muestran o se muestran en menor proporción, además de generarse en algunas ocasiones bandas artefacto observadas en la amplificación de IC-Intype DNA al usar 52°C como temperatura de alineamiento. Adicionalmente, la muestra del ejemplar 13 (3) *Spatula discors* mostró una banda de amplificación de aproximadamente 400 pb en la reacción con oligos para TK, también se observó una banda de tamaño similar en la muestra del ejemplar 1 *Spatula discors* en la reacción dúplex pero al estar ausente en la reacción con oligos TK se considera como un artefacto (Fig. 7).

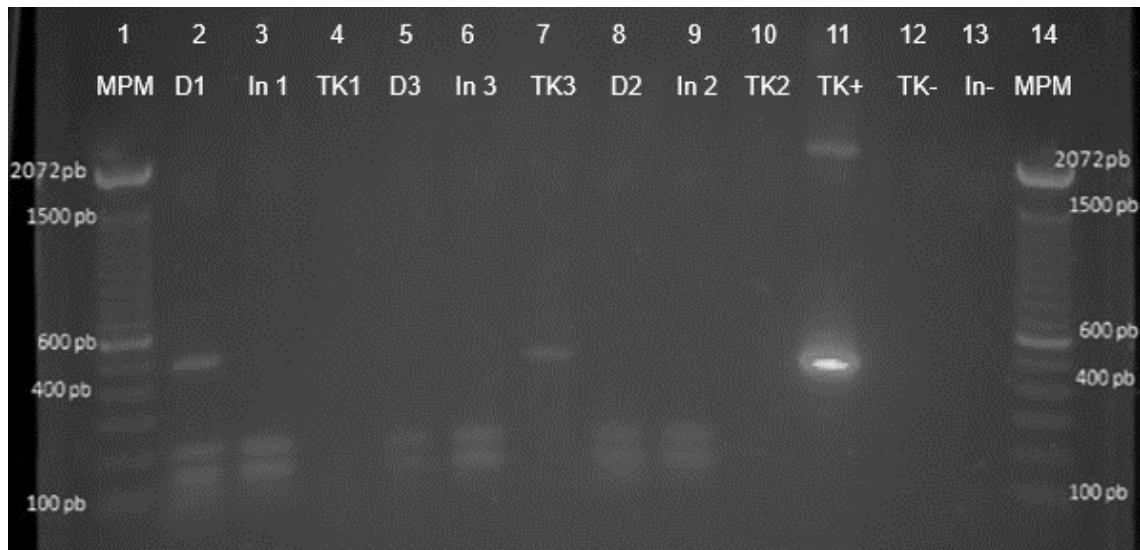


Figura 7. Reacciones de PCR dúplex y sencillas de IC-Intype DNA y TK en 3 eluciones de ADN de contenido intestinal de patos *Spatula discors* con amplificación TK en pato 13 (3). Carril 1 y 14) Marcador de peso molecular. Carriles 2, 5 y 8) Reacciones dúplex de ejemplares 12 (D1), 13 (D3) y 1 (D2). Carriles 3, 6 y 9) Reacciones sencillas de IC-Intype DNA de ejemplares 12 (In1), 13 (In3) y 1 (In2. Carriles 4, 7 y 10) Reacciones sencillas TK de ejemplares 12 (TK1), 13 (TK3), 1 (TK2). Carril 11) Testigo positivo pUC57-TK. Carril 12) Testigo sin pUC57. Carril 13) Testigo sin IC-Intype DNA. En el carril 7 se observa la amplificación de una banda que podría haber sido amplificada por los oligos *Cyprinid herpesvirus 3*.
pb: pares de bases.

4) Procesamiento de muestras

Extracción de ADN. Las concentraciones de ADN que se obtuvieron fueron de 14 a 2,269.80 ng/ μ L, en cerca del 74% de las muestras fueron menores a 500 ng/ μ L (datos no mostrados).

Control interno Intype. A partir de 87 reacciones (una por cada muestra) de PCR punto final para amplificar el fragmento del Control Interno Intype (DNA-IC), se obtuvieron 9 muestras negativas, las cuales quedaron fuera del estudio al no ser aptas para la técnica de PCR y por lo tanto el número de muestras se redujo a 78 (Figura 8).

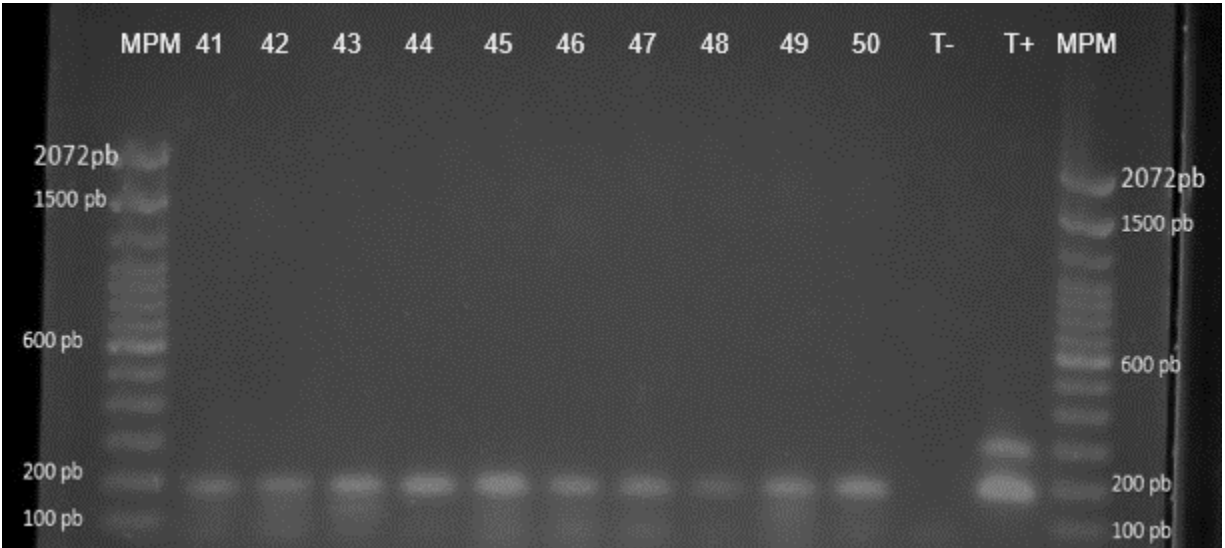


Figura 8. Muestras 41 a 50 positivas a Intype. Carril 1 y 14) Marcador de peso molecular. Carriles 2-11) Muestras 41-50 con banda de aproximadamente 200 pb. Carril 12) Control negativo (sin ADN Intype). Carril 13) Control positivo.

pb: pares de bases. T-: control negativo. T+: Control positivo.

5,6,7) Detección de ADN *Cyprinid herpesvirus 3*

A partir de las 78 muestras procesadas se obtuvieron 13 positivas al fragmento del gen TK, con tamaño de 410 pb. pero ninguna de las 13 fue positiva a ORF54 con oligos Sph (imagen 9). Por otra parte, cuatro resultaron ser positivas al sitio de clonación MCS-TK en pUC57-TK y dos más mostraron un amplificado inespecífico (cerca a 300 pb) en la prueba de contaminación con plásmido (figuras 10 y 11), por lo tanto; únicamente se consideraron 7 muestras positivas al fragmento TK de CyHV3 (figura 12).

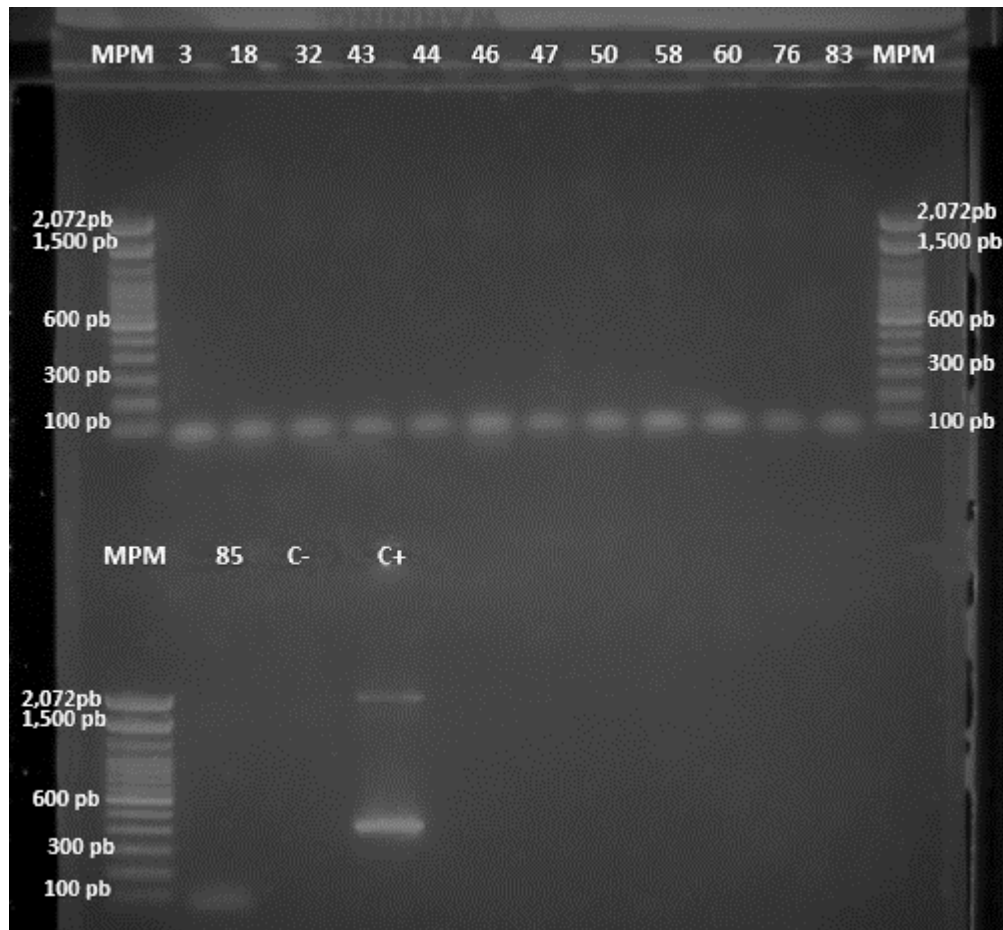


Figura 9. Muestras negativas a PCR con oligos Sph. Carriles 1, 14 y 15) Marcador de peso molecular. Carriles 2-13 y 16) Muestras negativas a ORF 54 con banda inespecífica menor a 100 pb. Carril 17) Testigo negativo con oligos TK. Carril 18) Testigo positivo con oligos TK y ADN pUC57-TK. Numeración de carriles de izquierda a derecha de arriba hacia abajo.
pb: pares de bases. C-: control negativo. C+: control positivo.

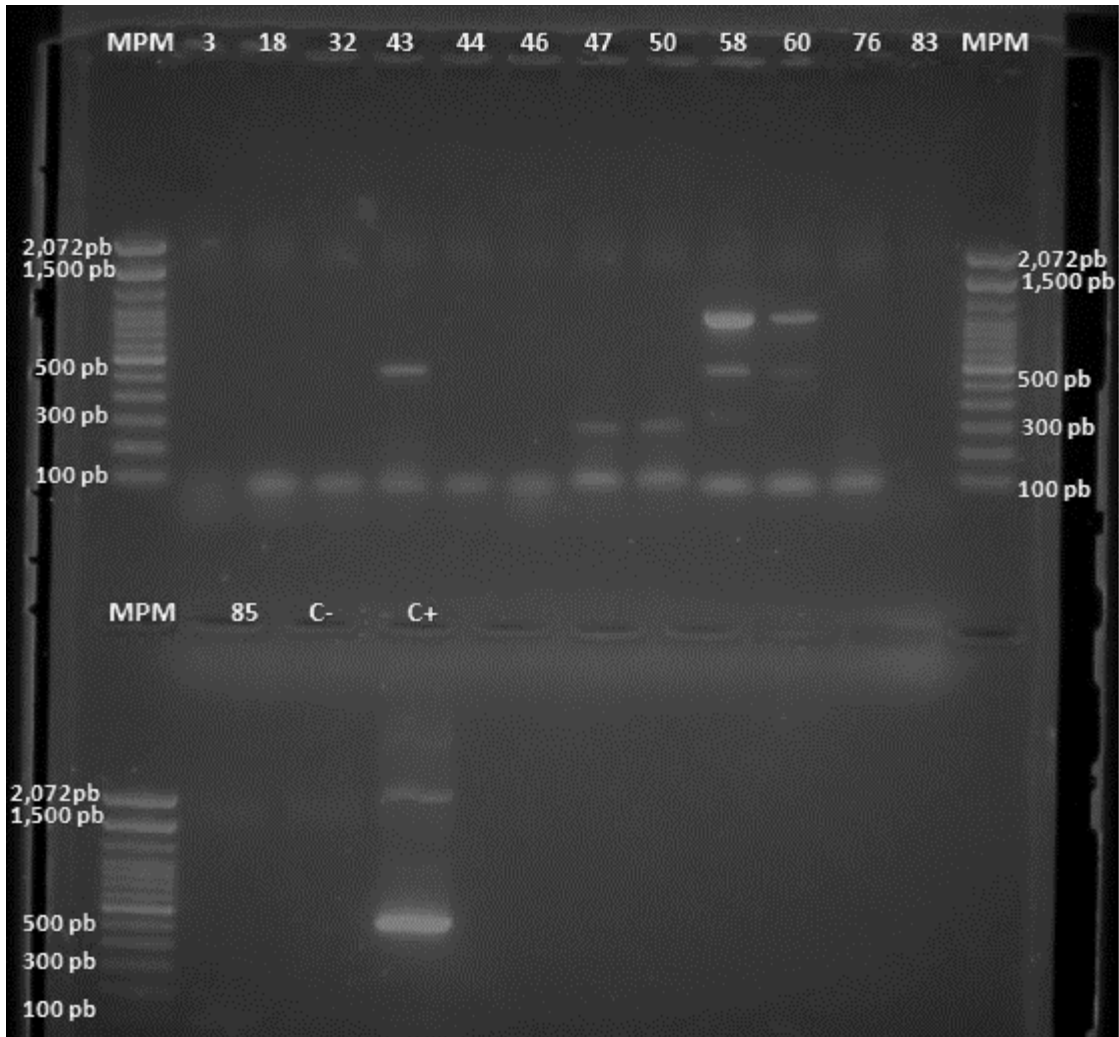


Figura 10. Contaminación con plásmido pUC57-TK 1. Carriles 1, 14 y 15) Marcador de peso molecular. Carriles 5 (muestra 43), 10 (muestra 58) y 11 (muestra 60) positivas a MCS por contaminación con plásmido pUC57-TK. Carriles 8 (muestra 47) y 9 (muestra 50) con bandas de amplificación inespecíficas menores a 300 pb. Carril 17) Testigo negativo con oligos MCS y sin ADN. Carril 18) Testigo positivo con oligos MCS y plásmido pUC57. Numeración de carriles de izquierda a derecha de arriba hacia abajo.

pb: pares de bases. C-: control negativo. C+: control positivo.

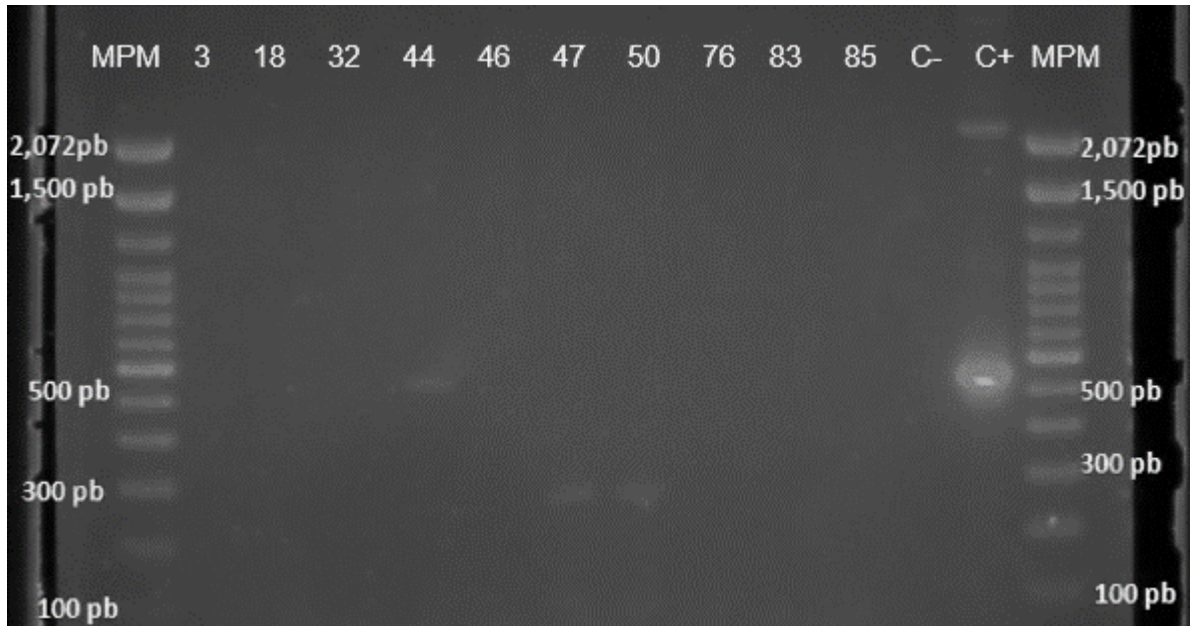


Figura 11. Contaminación con plásmido pUC57-TK 2. Carriles 1 y 14) Marcadores de peso molecular. Carril 5 (muestra 44) positiva a MCS por contaminación con plásmido pUC57-TK. Carriles 7 (muestra 47) y 8 (muestra 50) con bandas de amplificación inespecíficas menores a 300 pb. Carril 13) Testigo negativo con oligos MCS y sin ADN. Carril 14) Testigo positivo con oligos MCS y plásmido pUC57. Numeración de carriles de izquierda a derecha.
 pb: pares de bases. C-: control negativo. C+: control positivo.

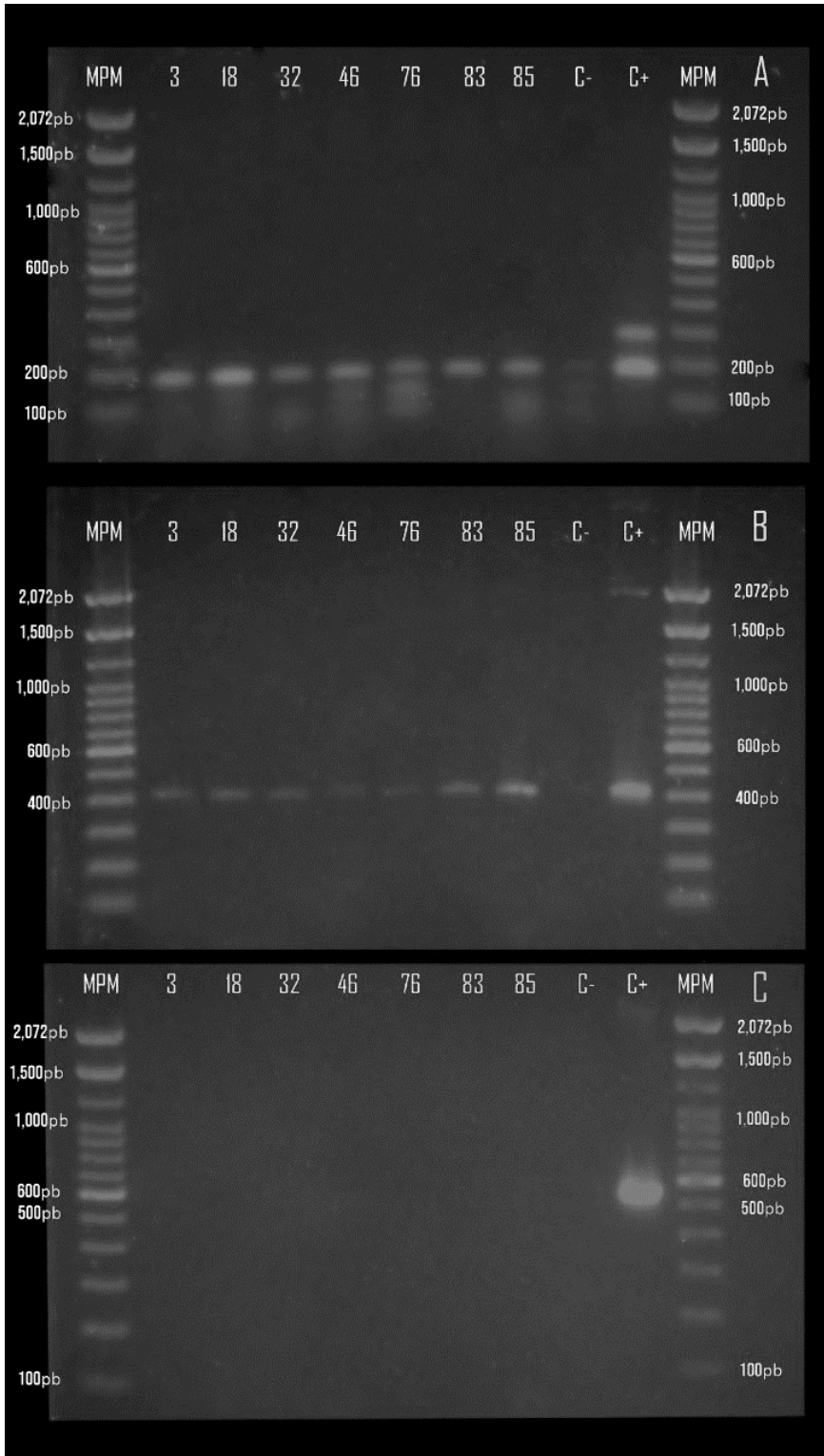


Figura 12. Muestras positivas a fragmento de gen TK. A) Amplificación de control interno Intype (210 pb). B) Amplificación de fragmento gen TK (410 pb). C) Amplificación de sitio de clonación MCS-TK (510 pb). MPM: marcador de peso molecular. C-: Control negativo. C+: Control positivo. pb: pares de bases.

De acuerdo a las fechas en que se realizaron los muestreos (10 de enero a 21 de febrero de 2016), se observa que en cada día de colecta se obtuvo al menos una muestra de contenido intestinal positiva a ADN de CyHV3 (cuadro 2).

Cuadro 2. Muestras positivas a fragmento de gen TK. Porcentaje de muestras positivas a fragmento de gen TK de acuerdo al número de muestras colectada fecha de muestreo. N=78

	Fechas de colecta					
	10/01/16	17/01/16	24/01/16	7/02/16	14/02/16	21/02/16
Muestras	(1/13)	(1/6)	(1/19)	(1/14)	(1/20)	(2/6)
positivas	7.69%	16.66%	5.26%	7.14%	5%	33.33%

Así mismo, la proporción de muestras positivas en relación con las especies de patos no muestran algún patrón por especie (cuadro 3).

Cuadro 3. Especies positivas a fragmento de gen TK. Porcentaje de especies positivas a fragmento de gen TK de acuerdo al número de individuos muestreados por especie. N=78

	Especies colectadas									
	<i>Anas acuta</i>	<i>Mareca americana</i>	<i>Spatula clypeata</i>	<i>Anas crecca</i>	<i>Spatula cyanoptera</i>	<i>Anas diazi</i>	<i>Spatula discors</i>	<i>Mareca strepera</i>	<i>Oxyrura jamaicensis</i>	
Muestras	(0/8)	(2/12)	(1/18)	(1/2)	(0/6)	(0/8)	(0/2)	(3/15)	(0/7)	
positivas	0%	16.6%	5.55%	50%	0%	0%	0%	20%	0%	

Amplificación de gen completo TK. Las 7 muestras positivas al fragmento de gen TK fueron seleccionadas para amplificar el gen completo TK, sin embargo; no se obtuvo amplificación del gen completo TK.

8) Análisis con BLASTn

A partir de la muestra 85 correspondiente a un pato *Mareca strepera*, con fecha de colecta 21 de febrero 2016, se obtuvo una secuencia de 410 pb (GenBank MN586859). De acuerdo a la herramienta BLAST esta tuvo similitud y cobertura de 100% con secuencias de genes parciales, genes completos y genomas en su región ORF 55 correspondientes a CyHV3 (Cuadro 2).

Cuadro 2. Número de secuencias similares a la secuencia de la muestra MS85

*Región ORF 55

Fecha de alineamiento con BLAST: 21 de octubre 2019.

Tipo de secuencia	Número de secuencias
Genes parciales	12
Genes completos	10
Genoma completo*	21

De acuerdo a la información de GenBank las secuencias de genes parciales fueron obtenidas en Japón, China, Vietnam, Estados Unidos y México por su parte; los genes completos se obtuvieron en China, Holanda, Irán e Inglaterra, mientras que los genomas completos fueron obtenidos en Bélgica, Reino Unido, Taiwán, Japón, China, Israel, Indonesia, Polonia y Estados Unidos.

9) Análisis filogenético

De acuerdo con el árbol filogenético que se obtuvo por el método Neighbor-Joining, se encontró que la secuencia obtenida en este estudio está relacionada con las secuencias de genes parciales TK reportadas para CyHV3, ya que ambas comparten un nodo en común. Las secuencias con mayor relación son las reportadas en México, Japón y China, sin embargo; se sabe que para establecer relación filogenética válida se debe hacer a partir de secuencias que contemplen el gen completo y sus regiones no codificantes a los extremos para evitar resultados sesgados.

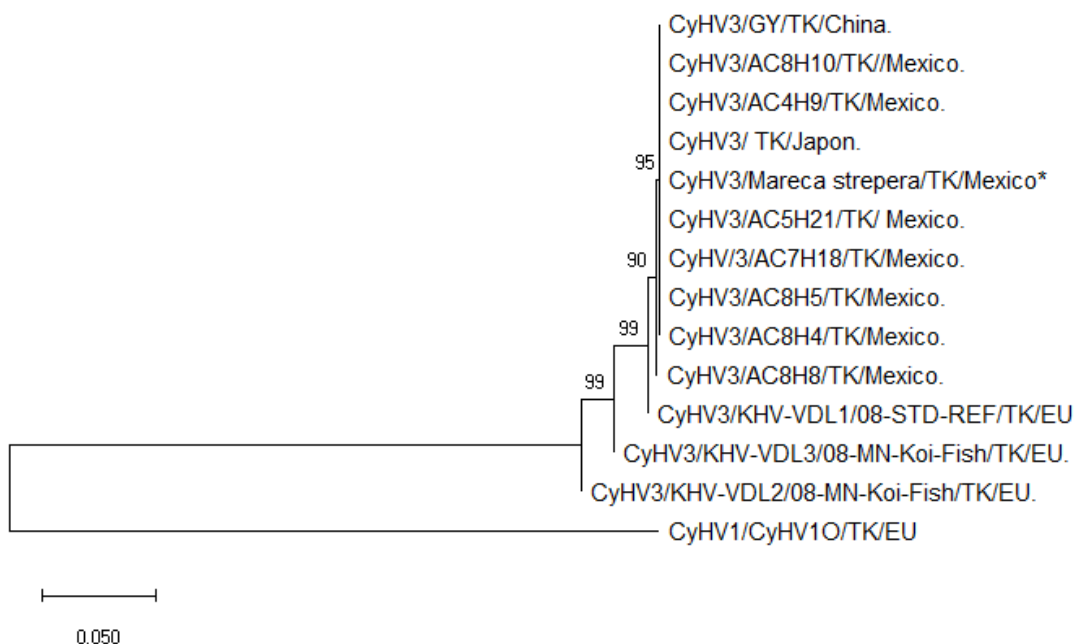


Figura 2. **Árbol filogenético de genes parciales TK correspondientes a CyHV3 y secuencia obtenida de pato silvestre.**

Las secuencias ocupadas de genes parciales tienen identidad y cobertura de 100% (de acuerdo con la herramienta BLAST) con la secuencia de pato silvestre. Se ocupó una secuencia de *Cyprinid herpesvirus 1* para comprobar la pertenencia a CyHV3. Los números en cada nodo representan la probabilidad obtenida por el modelo Neighbor-Joining.

CyHV3: *Cyprinid herpesvirus 3*. CyHV1: *Cyprinid herpesvirus 1*. TK: Tiaminin cinasa.

* Secuencia obtenida a partir de pato silvestre GenBank MN586859.

Discusión

Cyprinid herpesvirus 3 es el agente etiológico de una enfermedad altamente contagiosa y letal para las variedades común y koi de *Cyprinus carpio*. Desde sus primeros reportes en Estados Unidos e Israel a finales de los años 90 se ha distribuido por Asia, Europa y algunos países en América (Hedrick et al. 2000; Haenen et al. 2004; Sano et al. 2004; Antychowicz et al. 2005; OIE 2018b). Algunos reportes están relacionados con importación de ejemplares ciprinidos originarios de Asia a Europa (Haenen et al. 2004; McCleary et al. 2011), por lo que este ha sido

un factor importante para la diseminación rápida del virus. Por otra parte, aunque se ha detectado a CyHV3 en carpas silvestres (Matsui et al. 2008), poco se ha estudiado sobre su participación en la diseminación hacia otras especies de animales silvestres.

El estudio sobre virómica en contenido intestinal de patos silvestres migratorios de los géneros *Anas*, *Mareca* y *Spatula*, en un humedal de las Ciénegas de Lerma proporciona la primera evidencia sobre la posible presencia de *Cyprinid herpesvirus 1* en México (Ramírez-Martínez et al. 2018) Sin embargo; con el presente trabajo se comprueba la existencia de material genético correspondiente al agente causal de Herpesvirosis de la carpa koi en México, así mismo; presencia de ADN en contenido intestinal de especies que no son peces.

Los resultados obtenidos en este trabajo no se contraponen a lo reportado por Ramírez (Ramírez-Martínez et al. 2018), ya que a la fecha no se ha comprobado que exista reacción cruzada en las técnicas de PCR entre *Cyprinid herpesvirus 1* y 3 (Bercovier et al. 2005) y por lo tanto, es posible la presencia de ambas especies de cyprinivirus en las muestras.

La baja frecuencia de muestras positivas puede explicarse de la siguiente manera:

- 1) Se desconoce la cantidad de partículas virales ingeridas por los anátidos y la relación entre la cantidad de CyHV3 ingeridos y expulsados vía rectal
- 2) Aunque se ha demostrado que los viriones envueltos por una bicapa lipídica (como el virus de influenza) logran transitar a través de los diferentes pH en tracto digestivo de anátidos y causar infección (Nayak et al. 2013), se desconocen los cambios morfológicos que pudieran sufrir los viriones de CyHV3 o su posible desintegración al transitar por el aparato digestivo de los patos migratorios.
- 3) Al ser CyHV3 un miembro del orden *Herpevirales* es específico de especie y dada la divergencia taxonómica a nivel de Clase entre aves y peces óseos, es poco probable su replicación en patos anátidos. Por lo tanto, el material genético detectado en este

estudio no representa ADN a partir de replicación viral, sino el ingerido vía oral por los patos.

Así mismo, la sensibilidad reportada por Bercovier para la técnica molecular que se empleó fue de al menos 30 partículas virales o 10 fentogramos (Bercovier et al. 2005), por lo que las muestras negativas podrían contener menos de esta cantidad o no tener presencia de ADN *Cyprinid herpesvirus 3*. En cuanto a los resultados negativos que se obtuvieron a partir de los ensayos con el protocolo diseñado por Gray y col. y modificado por Yuasa y col. (con oligos Sph), es posible que la cantidad de material genético en las muestras sea menor a 100 fentogramos, ya que es la sensibilidad reportada por este protocolo (Yuasa et al. 2005). Los resultados negativos en la amplificación del gen completo TK pueden explicarse por la baja cantidad de material genético de CyHV3 en el ADN de las muestras.

Estudios previos han descrito que muestras positivas a CyHV3 por PRC tienen bajos porcentajes de infección en cultivo celular (0-33%). En un estudio de peces sanos se detectó el virus por PCR en 4 de 11 peces, pero en ninguno se logró el aislamiento en la línea celular KF-1 (McCleary et al. 2011). En un estudio experimental se inocularon 6 carpas con CyHV3, de las cuales 3 murieron y fueron positivas por PCR, pero el aislamiento viral se logró en 1 muestra positiva por PCR (Sano et al. 2005). Los resultados en estos estudios muestran que no todas las muestras positivas por PCR permiten un aislamiento viral.

El origen genético y geográfico de CyHV3 en el mundo se agrupa principalmente en las cepas europeas, asiáticas y estadounidenses, ya que en esas regiones fue donde ocurrieron los primeros brotes y aislamientos con su respectiva secuenciación de genoma completo (Bretzinger et al. 1999; Hedrick et al. 2000; Aoki et al. 2007). En estudios donde se ha determinado el origen filogenético de CyHV3 se ha ocupado la secuencia completa del gen TK y sus regiones no codificantes a los extremos, que a su vez han sido secuencias obtenidas a partir de aislamientos virales (Sunarto et al. 2011; Yingying et al. 2014; Chen et al. 2018), ya que esta

región del genoma viral de CyHV3 es una secuencia altamente conservada que tiene un papel importante en la patogenicidad característica de CyHV3 (Costes et al. 2008). En el presente estudio no fue posible establecer relación filogenética con las cepas principales, debido a la poca cantidad de ADN CyHV3 en las muestras. Es por ello que el aislamiento de CyHV3 tiene un papel importante cuando se desea conocer las cepas con mayor cercanía filogenética, ya que a partir de un aislamiento se puede obtener mayor cantidad de ADN CyHV3 y de esa manera secuenciar el gen completo TK y sus regiones no codificantes a los extremos.

Conclusión

La obtención de 7 muestras positivas de 78 analizadas (8.97%) por PCR para amplificar el fragmento de gen TK correspondiente a CyHV3, confirma la hipótesis planteada al inicio de la investigación, donde se consideraba obtener al menos una muestra positiva a ADN de CyHV3. Mediante el uso del control interno y el protocolo de amplificación para el fragmento de gen *TK* señalado por la OIE se pudieron evitar errores de falsos negativos y falsos positivos, respectivamente.

El porcentaje de muestras positivas podría considerarse bajo para un proceso infeccioso, sin embargo; desde el punto de vista epidemiológico son resultados importantes ya que de acuerdo con SENASICA este virus está clasificado como exótico en nuestro país. Así mismo; es un descubrimiento importante en la ecología de CyHV3 ya que es la primera vez que se detecta material genético de este virus en una especie animal acuática diferente a un pez, siendo contenido intestinal de patos silvestres migratorios las muestras analizadas.

Estos resultados aportan información valiosa sobre la ecología y epidemiología de la herpesvirosis de la carpa koi, ya que a la fecha no se han llevado a cabo estudios donde se pruebe la presencia de material genético de CyHV3 en especies que no sean peces. Así mismo, es importante considerar que los patos silvestres de los géneros *Anas*, *Mareca* y *Spatula* no son huéspedes para CyHV3 y estas aves podrían

tener un papel aún no definido en la ecología y epidemiología del *Alloherpesvirus* o haber ingerido de manera estocástica CyHV3.

Sugerencias

Para poder conocer la participación que podrían tener los patos silvestres migratorios se necesitan llevar a cabo más estudios que monitoreen de manera paralela distintos humedales de descanso invernal donde se evalúe el aislamiento viral, caracterización genómica, viabilidad de partículas y carga virales que los patos podrían estar eliminando. Así mismo; extender el estudio en carpas que pudieran estar en los humedales o unidades productoras cercanas a humedales de descanso para las aves migratorias.

Hasta que no se conozca como participan los patos silvestres migratorios en la ecología de CyHV3 se recomienda a los productores evitar la presencia de estas aves en sus unidades de producción. En cuanto a MVZ oficiales se sugiere llevar a cabo una metodología rigurosa para los diagnósticos que involucren tasas elevadas de mortalidad ya que podrían estar asociadas a brotes de herpesvirosis de la carpa koi.

Referencias

- Antychowicz J, Reichert M, Matras M, Bergmann SM, Haenen OL. Epidemiology, pathogenicity and molecular biology of koi herpesvirus isolated in Poland. *Bull Vet Inst Pulawy*. 2005;49(4):367–73.
- Aoki T, Hirono I, Kurokawa K, Fukuda H, Nahary R, Eldar A, et al. Genome Sequences of Three Koi Herpesvirus Isolates Representing the Expanding Distribution of an Emerging Disease Threatening Koi and Common Carp Worldwide. *J Virol* [Internet]. 2007;81(10):5058–65. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.00146-07>
- Bercovier H, Fishman Y, Nahary R, Sinai S, Zlotkin A, Eyngor M, et al. Cloning of the koi herpesvirus (KHV) gene encoding thymidine kinase and its use for a highly sensitive PCR based diagnosis. *BMC Microbiol*. 2005;5:1–9.
- Bergmann SM, Schütze H, Fischer U, Fichtner D, Riechardt M, Meyer K, et al. Detection of koi herpes virus (KHV) genome in apparently healthy fish. *Bull Eur Assoc Fish Pathol*. 2009;29(5):145–52.
- Birds of North America. Browse Species [Internet]. 2017 [cited 2018 Apr 3]. Available from: <https://birdsna.org/Species-Account/bna/species>
- Bretzinger A, Fischer-Scherl T, Oumouna M, Hoffman R, Truyen U. Mass mortalities in koi carp, *Cyrinus carpio*, associated with gill and skin diseases. *Bull Eur Assoc Fish Pathol*. 1999;19(5):182–5.
- Buhnerkempe MG, Webb CT, Merton AA, Buhnerkempe JE, Givens GH, Miller RS, et al. Identification of migratory bird flyways in North America using community detection on biological networks. 2016;26(3):740–51.
- Chen J, Li Y, Yang R, Wang K, Geng Y, Huang X, et al. Isolation and identification of a koi herpesvirus and phylogenetic analysis from Sichuan Province. *J Fish China* [Internet]. 2018 [cited 2018 Nov 13];42:141–8. Available from: http://www.scxuebao.cn/jfcen/ch/reader/view_abstract.aspx?flag=1&file_no=2

0161210653&journal_id=scxuebao

Compendium A. Cyprinid herpesvirus 1 infection [Internet]. CABI. 2011 [cited 2018 Oct 5]. Available from:

<http://www.cabi.org.pbidi.unam.mx:8080/ac/datasheet/86264>

CONAPESCA. Anuario Estadístico de Pesca y Acuicultura 2017 de la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. Sinaloa, México: SAGARPA; 2017. p. 306.

Costes B, Fournier G, Michel B, Delforge C, Raj VS, Dewals B, et al. Cloning of the Koi Herpesvirus Genome as an Infectious Bacterial Artificial Chromosome Demonstrates That Disruption of the Thymidine Kinase Locus Induces Partial Attenuation in *Cyprinus carpio koi*. *J Virol*. 2008;

Costes B, Raj VS, Michel B, Fournier G, Thirion M, Gillet L, et al. The Major Portal of Entry of Koi Herpesvirus in *Cyprinus carpio* Is the Skin. *J Virol* [Internet].

2009;83(7):2819–30. Available from:

<http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.02305-08>

Cuevas ED, González SG, Quintana j. L, Loza, E R, González CR, García GE.

Detección de orthomyxovirus H7N3 en anátidos del Estado de México (Detection of orthomyxovirus H7N3 in waterfowl from the State of Mexico).

Rev electrónica Vet. 2009;10.

Davison AJ. Channel catfish virus: a new type of herpesvirus. *Virology* [Internet].

1992 Jan [cited 2019 Apr 30];186(1):9–14. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1727613>

Davison AJ, Cunningham C, Sauerbier W, McKinnell RG. Genome sequences of two frog herpesviruses. *J Gen Virol* [Internet]. 2006 Dec 1 [cited 2019 Apr

30];87(12):3509–14. Available from:

<http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.82291-0>

Davison AJ, Kurobe T, Gatherer D, Cunningham C, Korf I, Fukuda H, et al.

Cyprinid herpesvirus 2 strain ST-J1, complete genome - Nucleotide - NCBI

[Internet]. NCBI. 2018 [cited 2019 Apr 30]. Available from:
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_019495.1

Dishon A, Perelberg A, Bishara-Shieban J, Ilouze M, Davidovich M, Werker S, et al. Detection of carp interstitial nephritis and gill necrosis virus in fish droppings. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(11):7285–91.

Eide KE, Miller-Morgan T, Heidel JR, Kent ML, Bildfell RJ, LaPatra S, et al. Investigation of Koi Herpesvirus Latency in Koi. *J Virol* [Internet]. 2011;85(10):4954–62. Available from:
<http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.01384-10>

El-Matbouli M, Saleh M, Soliman H. Detection of cyprinid herpesvirus type 3 in goldfish cohabiting with CyHV-3-infected koi carp (*Cyprinus carpio koi*). *Vet Rec* [Internet]. 2007 Dec 8 [cited 2018 Apr 15];161(23):792–3. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18065817>

El-Matbouli M, Soliman H. Transmission of Cyprinid herpesvirus-3 (CyHV-3) from goldfish to naïve common carp by cohabitation. *Res Vet Sci*. 2011;90(3):536–9.

FAO (Food & Agriculture Organisation). Fishery and Aquaculture Statistics. *Fao* [Internet]. 2012;1–230. Available from: <http://www.fao.org/3/a-i5716t.pdf>

Fawaz M, Vijayakumar P, Mishra A, Gandhale PN, Dutta R, Kamble NM, et al. Duck gut viral metagenome analysis captures snapshot of viral diversity. *Gut Pathog*. 2016;8(1):1–8.

Fuchs W, Fichtner D, Bergmann SM, Mettenleiter TC. Generation and characterization of koi herpesvirus recombinants lacking viral enzymes of nucleotide metabolism. *Arch Virol* [Internet]. 2011 Jun 9 [cited 2018 Nov 13];156(6):1059–63. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00705-011-0953-8>

Ge X, Li Y, Yang X, Zhang H, Zhou P, Zhang Y, et al. Metagenomic Analysis of

Viruses from Bat Fecal Samples Reveals Many Novel Viruses in Insectivorous Bats in China. *J Virol* [Internet]. 2012;86(8):4620–30. Available from: <http://jvi.asm.org/lookup/doi/10.1128/JVI.06671-11>

GenScrip. pUC57 plasmid DNA [Internet]. 2018 [cited 2018 May 15]. Available from: https://www.genscript.com/vector/SD1176-pUC57_plasmid_DNA.html

Gilad O, Yun S, Adkison MA, Way K, Willits NH, Bercovier H, et al. Molecular comparison of isolates of an emerging fish pathogen, koi herpesvirus, and the effect of water temperature on mortality of experimentally infected koi. *J Gen Virol*. 2003;84(10):2661–8.

Gilad O, Yun S, Andree KB, Adkison MA, Zlotkin A, Bercovier H, et al. Initial characteristics of koi herpesvirus and development of a polymerase chain reaction assay to detect the virus in koi, *Cyprinus carpio* koi. *Dis Aquat Organ*. 2002;48(2):101–8.

Gilad O, Yun S, Zagmutt-Vergara FJ, Leutenegger CM, Bercovier H, Hedrick RP. Concentrations of a Koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally infected *Cyprinus carpio* koi as assessed by real-time TaqMan PCR. *Dis Aquat Organ*. 2004;60(3):179–87.

Gotesman M, Kattlun J, Bergmann SM, El-matbouli M. CyHV-3: the third cyprinid herpes virus. *Dis Aquat Organ*. 2013;105(2):163–74.

Gray WL, Mullis L, Lapatra SE, Groff JM, Goodwin A. Detection of koi herpesvirus DNA in tissues of infected fish. *J Fish Dis*. 2002;25(3):171–8.

Haenen OLM, Way K, Bergmann SM, Ariel E. The emergence of koi herpesvirus and its significance to European aquaculture. *Bull Eur Assoc Fish Pathol*. 2004;24(6):293–307.

Hedrick RP, Gilad O, Yun S, Spangenberg J V, Marty GD, Nordhausen RW. A Herpesvirus Associated with Mass Mortality of Juvenile and Adult Koi , a Strain of Common Carp. *J Aquat Anim Health*. 2000;12:44–57.

- Hedrick RP, Waltzek TB, McDowell TS. Susceptibility of Koi Carp, Common Carp, Goldfish, and Goldfish × Common Carp Hybrids to Cyprinid Herpesvirus-2 and Herpesvirus-3. *J Aquat Anim Health* [Internet]. 2006 Mar [cited 2018 Apr 15];18(1):26–34. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1577/H05-028.1>
- Honjo MN, Minamoto T, Kawabata Z. Reservoirs of Cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3) DNA in sediments of natural lakes and ponds. *Vet Microbiol*. 2012;155(2–4):183–90.
- ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses [Internet]. 2015 [cited 2017 Oct 18]. Available from: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>
- Ilouze M, Dishon A, Kahan T, Kotler M. Cyprinid herpes virus-3 (CyHV-3) bears genes of genetically distant large DNA viruses. *FEBS Lett*. 2006;580(18):4473–8.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*; 2018. p. 1547–9.
- Lee X, Yi Y, Weng S, Zeng J, Zhang H, He J, et al. Transcriptomic analysis of koi (*Cyprinus carpio*) spleen tissue upon cyprinid herpesvirus 3 (CyHV3) infection using next generation sequencing. *Fish Shellfish Immunol* [Internet]. 2016 Feb [cited 2019 Apr 30];49:213–24. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1050464815302655>
- Lincoln FC. The waterfowl flyways of North America. Documento histórico. 1935. p. 12.
- MacLachlan J, Dubovi E. Fenner's Veterinary Virology. 4ta Edició. MacLachlan JN, Dubovi EJ, editors. Elsevier; 2011.
- Matsui K, Honjo M, Kohmatsu Y, Uchii K, Yonekura R, Kawabata Z. Detection and significance of koi herpesvirus (KHV) in freshwater environments. *Freshw Biol*. 2008;53(6):1262–72.

- McCleary S, Ruane NM, Cheslett D, Hickey C, Rodger HD, Geoghegan F. Detection of koi herpesvirus (KHV) in koi carp (*Cyprinus carpio* L .) imported into Ireland . Bull Eur Assoc Fish Pathol. 2011;31(3):124–8.
- Michel B, Leroy B, Raj VS, Lieffrig F, Mast J, Wattiez R, et al. The genome of cyprinid herpesvirus 3 encodes 40 proteins incorporated in mature virions. J Gen Virol. 2010;91(2):452–62.
- Nayak D, Shivakoti S, Balogun RA, Lee G, Zhou H. Structure, disassembly, assembly, and budding of influenza viruses. In: Webster RG, Monto AS, Braciale T j., Lamb RA, editors. Textbook of Influenza. 2da Edició. 2013. p. 35–56.
- Negenborn J, van der Marel MC, Ganter M, Steinhagen D. Cyprinid herpesvirus-3 (CyHV-3) disturbs osmotic balance in carp (*Cyprinus carpio* L.)-A potential cause of mortality. Vet Microbiol [Internet]. 2015;177(3–4):280–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.03.018>
- OIE. Manual Acuático de la OIE 2012 HERPES VIROSIS DE LA CARPA KOI . Ámbito de aplicación. 2012;1–19. Available from: http://www.oie.int/esp/normes/fmanual/2.3.06_KHVD.pdf
- OIE. Enfermedades, infecciones e infestaciones de la Lista de la OIE [Internet]. 2018a [cited 2018 Jan 12]. Available from: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-la-lista-de-la-oie-2018/>
- OIE. Sistema Mundial de Información Zoonosaria (WAHIS) [Internet]. 2018b [cited 2018 Mar 8]. Available from: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home/indexcontent/newlang/es
- Perelberg A, Smirnov M, Hutoran M, Diamant A. Epidemiological Description of a New Viral Disease Afflicting Cultured *Cyprinus Carpio* in Israel. Isr J Aquac. 2003;55(1):5–12.

- Phan TG, Kapusinszky B, Wang C, Rose RK, Lipton HL, Delwart EL. The fecal viral flora of wild rodents. *PLoS Pathog.* 2011;7(9):1–21.
- Ramírez-Martínez LA, Loza-Rubio E, Mosqueda J, González-Garay ML, García-Espinosa G. Fecal virome composition of migratory wild duck species. *PLoS One.* 2018;13(11).
- Reeber S. *Waterfowl of North America, Europe and Asia. An identification guide.* Hong Kong: Princeton University Press; 2015.
- Reed AN, Izume S, Dolan BP, LaPatra S, Kent M, Dong J, et al. Identification of B Cells as a Major Site for Cyprinid Herpesvirus 3 Latency. *J Virol [Internet].* 2014;88(16):9297–309. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.00990-14>
- Sadler J, Marecaux E, Goodwin AE. Detection of koi herpes virus (CyHV-3) in goldfish, *Carassius auratus* (L.), exposed to infected koi. *J Fish Dis.* 2008;31(1):71–2.
- SAGARPA. Acuerdo mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatorias de los animales terrestres y acuáticos. *Diario Oficial de la Federación*; 2016.
- Sambrook J, Green MR. The Hanahan Method for Preparation and Transformation of Competent *E. coli*: High-Efficiency Transformation. In: *Molecular Cloning: a laboratory manual.* 4th Editio. 2012. p. 162–8.
- Sano M, Ito T, Kurita J, Miwa S, Iida T. Diagnosis of Koi Herpesvirus (KHV) Disease in Japan. *Fish Pathol.* 2005;(2):59–64.
- Sano M, Ito T, Kurita J, Takanori Y, Watanabe N, Miwa S, et al. First Detection of Koi Herpesvirus in Cultured Common Carp *Cyprinus carpio* in Japan. *Fish Pathol [Internet].* 2004;39 (3)(2002):165–7. Available from: <papers2://publication/uuid/45FE8361-1DD2-4F3A-84C1-FD7D35592948>

- Sunarto A, McColl KA, Crane MSJ, Sumiati T, Hyatt AD, Barnes AC, et al. Isolation and characterization of koi herpesvirus (KHV) from Indonesia: Identification of a new genetic lineage. *J Fish Dis.* 2011;34(2):87–101.
- Thomas NJ, Hunter DB, Atkinson CT. *Infectious diseases of wild birds.* Blackwell Publisher; 2007.
- Torres Meza OA. Estudio propectivo de Alloherpesviurs encontrados en patos silvestres del género *Anas* spp. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México; 2017.
- Tu C, Weng MC, Shiau JR, Lin SY. Detection of koi herpesvirus in koi *Cyprinus carpio* in Taiwan. *Fish Pathol* [Internet]. 2004;39(2):109–10. Available from: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jstfp1966/39/2/39_2_109/_pdf
- Wallace RB, Shaffer J, Murphy RF, Bonner J, Hirose T, Itakura K. Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to ϕ X 174 DNA: The effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Res.* 1979;6(11):3543–58.
- Xu JR, Bently J, Beck L, Reed A, Miller-Morgan T, Heidel JR, et al. Analysis of koi herpesvirus latency in wild common carp and ornamental koi in Oregon, USA. *J Virol Methods* [Internet]. 2013;187(2):372–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.11.015>
- Yingying L, Qing W, Weiwei Z, Houjun P, Yingying W, Chun L, et al. Isolation and identification of koi herpesvirus(GZ1301)from diseased koi(*Cyprinus carpio*). *J Fish China.* 2014;38(8):1159–66.
- Yuasa K, Sano M, Kurita J, Ito T, Iida T. Improvement of a PCR Method with the Sph Set the Detection of Koi Herpesvirus. *Fish Pathol.* 2005;40(1):37–9.
- Zheng S, Wang Q, Bergmann SM, Li Y, Zeng W, Wang Y, et al. Investigation of latent infections caused by cyprinid herpesvirus 3 in koi (*Cyprinus carpio*) in southern China. *J Vet Diagnostic Investig.* 2017;29(3):366–9.