



## Implementación de técnicas de Biología Molecular para la detección de patógenos en carpa común (*Cyprinus carpio*)

**Federico De Maio, Mariano Soricetti, Fredy Guardiola Rivas, Patricio Solimano, Daniel Barrio, Carolina Bellusci**

<sup>1</sup> Universidad Nacional de Río Negro - CONICET (Centro de Investigación y Transferencia Río Negro), Viedma, Río Negro, Argentina.

Correo electrónico del autor que expondrá el trabajo: [msoricetti@unrn.edu.ar](mailto:msoricetti@unrn.edu.ar)

### RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue implementar técnicas de Biología Molecular para evaluar el estado sanitario de poblaciones silvestres de carpa común (*Cyprinus carpio*). Partiendo de muestras de distintos órganos de peces capturados en el río Negro, se optimizaron tanto la purificación de ADN total como también ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) orientados a la detección de agentes virales que afectan a esta especie, los herpesvirus de ciprínidos. Se procesaron 102 individuos, consiguiéndose una alta proporción de purificados de ADN aptos para ser utilizados en ensayos enzimáticos. La prueba de detección viral consistió en una PCR anidada para amplificar segmentos genómicos conservados en los patógenos de interés. Así se habrían hallado dos casos positivos, con amplicones que están en proceso de ser caracterizados por secuenciación nucleotídica para una confirmación definitiva. El procedimiento establecido sentaría las bases para efectuar en nuestra región estudios epidemiológicos en especies ictícolas.

Palabras claves: CARPA COMÚN, PATÓGENOS, DETECCIÓN MOLECULAR.

### Introducción

La carpa común (*Cyprinus carpio*), originaria de Eurasia, se ha dispersado por cuerpos y cursos de agua dulce de casi todo el mundo debido a las prácticas humanas. Introducida en más de 120 países, su llegada a la Argentina se habría dado a mediados del siglo XIX con propósitos ornamentales y de acuicultura (Maiztegui et al., 2016). Actualmente se la encuentra en múltiples puntos del territorio nacional. Hacia el año 2002 habría sido introducida en el río Negro, donde se estableció hasta volverse abundante. Es así que resulta de interés generar conocimientos acerca del estado sanitario de sus poblaciones en el río Negro, apuntando a lograr una mejor comprensión de los factores que podrían actuar como reguladores de los tamaños poblacionales a nivel local. Por esto es que nos propusimos estudiar agentes virales que se encuentran entre los patógenos de carpa más reconocidos, los herpesvirus de ciprínidos (CyHV). Estos agentes virales pertenecen al género *Cyprinivirus* dentro de la familia *Alloherpesviridae* (orden *Herpesvirales*). Presentan un genoma a ADN doble cadena, lineal y no segmentado, de tamaño cercano a las 300 Kb. Se conocen dos herpesvirus que infectan tanto a la carpa común (*Cyprinus*

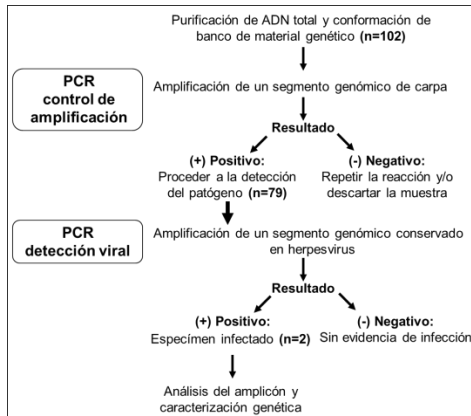
*carpio*) como a su variedad ornamental o carpa Koi (*Cyprinus carpio koi*), los cuales han sido designados como CyHV-1 y CyHV-3. Estos virus son altamente contagiosos, con una forma de transmisión que no necesitaría de contacto directo entre individuos, teniendo por puerta de entrada la piel que cubre aletas y cuerpo, y quizá también las branquias. Una característica central de estos patógenos es su capacidad de establecer infecciones latentes en aquellos individuos sobrevivientes a una infección primaria. El CyHV-1 puede causar una tasa de mortalidad que superaría el 90% en peces jóvenes. En los adultos, aunque el virus produce el desarrollo de papilomas, no llega a ser letal en la mayoría de los casos. Por otra parte, el CyHV-3 se asocia con un síndrome que incluye letargia, desplazamiento errático no controlado, necrosis branquial, aumento de la secreción de mucosidad, hemorragias en branquias e hígado e inflamación en los riñones, determinando la muerte de una alta proporción de animales infectados (Gotesman et al., 2013). Se trata de un virus emergente cuya infección ha sido incluida por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) en su lista de enfermedades notificables. Las características de estos CyHV han llevado a que se los postule como agentes para el control y manejo de la

carpa común como especie invasora, principalmente en Australia (Saunders et al., 2010).

Por lo antes expuesto, se decidió dar inicio al actual proyecto que tiene por meta implementar técnicas para la detección molecular de patógenos en carpa común.

## Metodología y Resultados

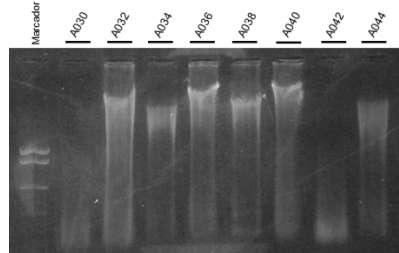
La captura de los peces se realizó en diversos puntos geográficos del curso inferior del río Negro. Porciones de intestino, branquias y cerebro de 102 individuos obtenidos durante dos ciclos anuales de muestreo (2016 - 2017) fueron procesadas como *pool* de órganos para la extracción de ADN total. Estos tejidos fueron elegidos por ser material apropiado para la detección de CyHV en carpa, según diferentes estudios que señalan a estos órganos entre aquellos recomendados para diagnosticar al patógeno mediante ensayos de PCR (Liu, 2016). Se utilizó el sistema de purificación por columna "DNeasy Blood & Tissue Kit" de la marca QIAGEN, partiendo de 25-30 mg totales de tejidos disgregados. En la Figura 1 se presenta la estrategia a seguir para detectar la infección por herpesvirus.



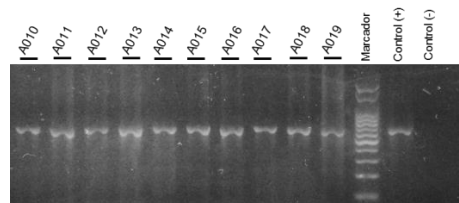
**Fig. 1.** Estrategia para la detección molecular en carpa común de herpesvirus de ciprínidos. Se indica el número de casos (n) correspondiente a cada instancia del procedimiento.

La calidad del material genético purificado fue evaluada en términos de integridad y rendimiento de recuperación mediante corrida electroforética en gel de agarosa (Figura 2). Satisfactoriamente, para la mayoría de las muestras, se obtuvo ADN con importante

proporción de fragmentos de alto peso molecular. Los ADN purificados se utilizaron como molde para una PCR dirigida contra el genoma de carpa (PCR control de amplificación). Las condiciones de reacción fueron puestas a punto en base a lo descrito por Minamoto et al. (2017) para el gen de la glucoquinasa (GK). De esta manera, se verificó que los ADN purificados no presenten inhibidores enzimáticos y sean moldes aptos para los subsiguientes ensayos de PCR. En la Figura 3 se muestran los resultados de amplificación para diferentes muestras, observándose el amplicón esperado (607 pb) en 79 de un total de 102 casos analizados (77,45%). Con estos ADN purificados se inició la conformación de un banco de material genético de fauna silvestre. Para asegurar su conservación a largo plazo, este material se encuentra almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , quedando disponible para futuros estudios.



**Fig. 2.** Material genético purificado. Ejemplos de ADN total recuperado a partir de pool de órganos de carpa. Corrida electroforética en gel de agarosa 1%, buffer TAE. Banda superior del marcador de peso molecular: 2000 pb. Códigos A030 - A044: Distintas muestras procesadas, similar a lo presentado en figuras subsiguientes.

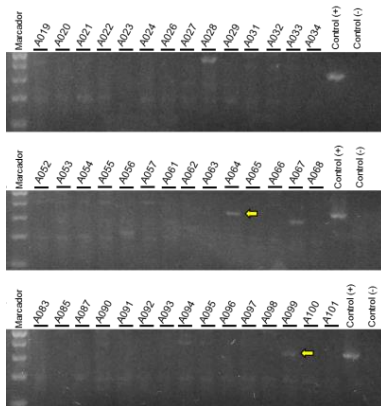


**Fig. 3.** Productos de PCR control de amplificación. Ejemplos de ensayos en los que se amplificó un segmento genómico (607 pb) de carpa común. Corrida electroforética en gel de agarosa 2%, buffer TAE. Marcador de peso molecular: Ladder 100 pb. Control (+): ADN total de carpa previamente verificado con calidad para PCR. Control (-): Agua.

Las muestras que superaron la instancia de PCR control de amplificación fueron utilizadas en ensayos de detección viral (PCR detección viral). A tal fin, se llevó a cabo una PCR en dos rondas que utiliza primers genéricos dirigidos tanto contra CyHV-1 como contra CyHV-3. Las condiciones para estos ensayos fueron puestas a punto en nuestro laboratorio partiendo de lo publicado por Engelsma et al. (2013) para el gen de la polimerasa viral. Los primers utilizados se detallan en la Tabla 1. De los 79 ensayos realizados, en 2 casos se obtuvo la banda de amplificación esperada (339 pb) coincidente con el control positivo utilizado (Figura 3). Para una confirmación definitiva y caracterización genética de estos positivos, se procederá a la secuenciación de los productos de PCR y posterior análisis filogenético.

Reacción	Nombre primers	Secuencia primers (5' - 3')	Tamaño del producto	Blanco de amplificación
Control de amplificación	CcGkIfor	AAA CTC ATA GCA CAC TGC AAA TCT	607 pb	Gen de la glucocinasa (C. carpio)
	CcGkRrev	ACT GCG AGT GGA GAC ACA TGA T		
Detección viral (1ª ronda)	CyHV/polIforent	CCA GCA ACA TGT GCG ACG G	361 pb	Gen de la ADN polimerasa (CyHV)
	CyHV/polIrext	CCG TAR TGA GAG TTG GCG CA		
Detección viral (2ª ronda)	CyHV/polIforint	GGA GGG VGG YAT CAG CCC	339 pb	
	CyHV/polIreint	GAG TTG GCG CAY ACY TTC ATC		

**Tabla 1.** Primers utilizados en los ensayos de PCR. Se indica tamaño de los productos y los genes blanco de amplificación.



**Fig. 4.** Productos de PCR detección viral. Resultado para múltiples ensayos realizados. Flechas: Banda de amplificación esperada. Corrida electroforética en gel de agarosa 2%, buffer TAE. Marcador de peso molecular: Ladder 100 pb. Control (+): Material genómico CyHV-3. Control (-): Agua.

## Conclusiones

El presente trabajo sentaría las bases para el desarrollo de estudios de monitoreo sanitario en especies ictícolas de agua dulce, a través de la conformación de un banco de material genético y la implementación de técnicas de detección molecular de patógenos. Además, brindaría datos preliminares respecto de la existencia de agentes virales en las carpas del norte patagónico.

Los herpesvirus de ciprínidos son considerados importantes herramientas para el biocontrol y la recuperación de ambientes invadidos por la carpa común (Saunders et al., 2010). Disponer de recursos técnicos para evaluar su presencia y, eventualmente, indagar sobre su origen, virulencia y posible impacto sobre la fauna autóctona es esencial para delinear pautas de manejo y programar futuras acciones a nivel regional.

La carpa común presenta un avance territorial muy importante en la Argentina (Maiztegui et al., 2016), su abundancia y buena condición en el río Negro, límite sur de su actual distribución, indicaría que su dispersión hacia latitudes más altas es casi inminente (Soricetti et al., en prensa). En este contexto, se hace necesario buscar alternativas de manejo para la erradicación de esta especie, dados los impactos críticos que podría generar al conquistar nuevos ambientes.

## Referencias

- Engelsma M.Y. et al. 2013. Detection of novel strains of cyprinid herpesvirus closely related to koi herpesvirus. *Dis Aquat Organ*, 107(2):113-20.
- Gotesman M. et al. 2013. CyHV-3: the third cyprinid herpesvirus. *Dis Aquat Organ*, 105(2):163-74.
- Liu D. (Editor) 2016. *Molecular Detection of Animal Viral Pathogens*. CRC Press.
- Maiztegui, T. et al. 2016. Invasion status of the common carp *Cyprinus carpio* in inland waters of Argentina. *Journal of fish biology*, 89(1), 417-430.
- Minamoto T. et al. 2017. Nuclear internal transcribed spacer-1 as a sensitive genetic marker for environmental DNA studies in common carp *Cyprinus carpio*. *Mol Ecol Resour*, 17(2):324-333.
- Saunders, G. et al. 2010. Modern approaches for the biological control of vertebrate pests: an Australian perspective. *Biological control*, 52(3), 288-295.