

IDENTIFICACIÓN DE VIREMIA PRIMAVERAL DE LA CARPA (VPC) *Carassius auratus* EN SAN PABLO, BRASIL¹

Agar Costa Alexandrino^{2,4}

Maria José Tavares Ranzani-Paiva^{2,4}

Luis Alberto Romano³

1. INTRODUCCION

Durante muchos años la etiología de la denominada "ascitis infecciosa" de los ciprinidos fue muy controvertida hasta que FIJAN (7) separo dos entidades, una de origen viral, la Viremia Primavera de la Carpa (VPC), aislando en un virus denominado *Rhabdovirus carpio* y una enfermedad bacteriana denominada eritrodermatitis de la carpa (6).

Los virus de la familia Rhabdoviridae son ARN monocadena negativo, monosegmentado tienen capsida con 4 polipéptidos (vesiculovirus) o 5 polipéptidos (lyssavirus) (8, 17).

El virus que produce la VPC es un vesiculovirus. Con el microscopio electrónico la envoltura se observa con una característica en forma de bala

¹Aceptado para publicación en 04.06.1997.

²Instituto de Pesca, Secretaria de Agricultura. Av. Matarazzo, 455. CEP 05031- 900- São Paulo, Brasil.

³Centro de Biopatología Acuática. Universidad Bar-ilán, Buenos Aires, Argentina.

⁴Bolsista CNPq.

con algunas finas proyecciones en la superficie. Las partículas virales miden aproximadamente 120 x 60 nanómetros. Las propiedades "in vitro" y la estructura proteica de la capsida fueron estudiadas detalladamente por LEONAIR en 1973 y KINKELIN en 1974 (2, 9, 10).

La infección puede ocurrir a cualquier edad pero siempre en peces previamente no infectados. La reinfección no ocurre y esto ha generado el desarrollo de vacunas que inducen inmunidad permanente (20).

Los signos clínicos más significativos de la VPC son petequias y las hemorragias cutáneas y branquiales, exoftalmos y ascitis.

Los hallazgos histopatológicos más frecuentes son peritonitis fibrinosa, con abundantes hemorragias viscerales y necrosis de la mucosa intestinal. Frecuentemente se puede observar una infección secundaria por aeromonas o pseudomonas. Este último hecho fue la causa de la confusión de esta enfermedad con una septicemia bacteriana (12).

Nosotros estudiamos el primer brote de VPC registrada en Brasil en *Carassius auratus* provenientes de lago Nabuco de San Pablo que presentaban signos de VPC.

El diagnóstico se realizó por análisis de inmunoabsorción unida a enzimas (ELISA) en el suero, homogeneizado de hígado y pronefros.

Analizamos los cambios citohematológicos e histológicos con microscopía óptica y electrónica. Los resultados confirmaron el diagnóstico sospechado clínicamente. No se hallaron signos histopatológicos de infección bacteriana, igualmente realizamos análisis de extractos tisulares por medio del test de aglutinación con perlas de látex que descartó la sobreinfecciones por *Aeromonas* y *Pseudomonas*.

2. MATERIALES Y METODOS

Estudiamos 8 *Carassius auratus* adultos, provenientes de lago Nabuco de San Pablo, Brasil, que registraron una mortalidad de 70%. Los animales presentaban signos clínicos de VPC. Como controles negativos se estudiaron el suero y tejido renal y hepático de 8 *C. auratus* libres de enfermedad pertenecientes a nuestro bioterio.

Los peces se anesteciaron con paraminobenzoato de etilo (benzocaina) al 5%. La extracción de sangre se realizó por punción cardíaca en condiciones de asepsia, sin anticoagulante y a baja temperatura. Para el fraccionamiento sérico se dejó retraer el coágulo durante una hora a 4°C y luego se centrifugó a 3000 rpm y se alicuotó en unidades de 100 µL a -20°C para ser estudiado con la prueba de ELISA.

Se tomaron muestras de tejido, branquial, cutáneo, muscular, hepático, esplénico, peritoneal, intestinal pro y mesonefros. En condiciones

de esterilidad, fragmentos de tejido hepático y renal se homogenizaron en un mortero de cerámica con PBS pH 7,2, el homogeneizado se centrifugo a 3.000 rpm en una centrifuga Sorbal refrigerada y el sobrenadantes se utilizo para la prueba de ELISA.

2.1. Producción de anticuerpos, purificación de gamaglobulinas y conjugación enzimática

Diez conejos fueron inmunizados con virus frescos purificados durante una semana. Se tomaron muestras de sangre del pabellón auricular durante el período de. Posteriormente se purifico y se conjugo la gamaglobulina (anticuerpo anti- VPC) con fosfatasa alcalina mediante el método descrito por WAY y DIXON (21).

2.2. Análisis de inmunoabsorción unido a enzimas (ELISA) en suero y homogeneizados de hígado y pronefros

Se utilizo un procedimiento standard para detectar antígenos del virus de VPC. Cada well de la placa de ELISA fue cubierto con 200 µL de gama-globulina (5 µg/mL en buffer carbonato- bicarbonato, pH 9.6) e incubada a 37°C durante 6 horas. Posteriormente se hicieron 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS conteniendo 0,05% Tween 20 (PBST), de esta forma las placas estuvieron listas para su uso. Los welles fueron lavados con PBST (3 de 3 min). Posteriormente se agregaron 200 µL de gama- globulina conjugada con fosfatasa alcalina e incubados durante 15 min a temperatura ambiente. Luego los welles se lavaron con PBST (3 de 3 min) y se le agrego 300 µL de p- nitrofenil fosfato en 10 % de buffer dietanolamina, pH 9.8, luego se incubo a temperatura ambiente. La reacción fue detenida a los 45 min por la adición de 50 µL de 3M NaOH en cada well. La prueba fue considerada antígeno positiva si a simple vista aparecía un color amarillo y por fotometría si la absorbancia fue de 405 o más nm.

2.3. Examen citohematológico

Se realizaron extendidos de sangre periférica e improntas de pronefros que se fijaron en alcohol metilico y se colorearon con la técnica de May- Grunwald Giemsa. Tanto en los extendidos de sangre periférico como en las improntas se realizo un análisis morfométrico para elaborar curvas de Prince- Jones descrita en una trabajo anterior (16).

En las muestras tisulares de pronefros se cuantificaron melanomacrofagos por mm² de tejido. Para este estudio se utilizó un analizador de imágenes constituido por una cámara de video montada sobre un microscopio un digitalizador Frame, una computadora PC AT IBM compatible y un Bioescan OPTIMAS 4.1 (Software, Bioescan, Edmonds, WA) recientemente utilizado para análisis de células y tejidos (19). Para un análisis comparativo se estudiaron extendidos de sangre periférica e improntas de pronefros de los 5 animales controles.

2.4. Microscopía óptica

Se estudiaron tejido branquial, cutáneo, muscular, hepático, esplénico, intestinal pro y mesonefros. Las muestras tisulares se fijaron con en líquido de Bouin durante 3 horas, luego se procesó en forma convencional y se incluyó en paraplast.

Las secciones histológicas se tiñeron con hematoxilina y eosina, tricromico de Masson, reticulina de Gomori y PAS (16).

2.5. Microscopía electrónica

Fragmentos milimétricos de tejido renal y hepático fueron fijados en glutaraldehído al 2%, e incluidos en EPON 812; los cortes tisulares se realizaron en un ultramicrotomo LKB y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo, por último se observaron en un microscopio electrónico Zeiss M109.

2.6. Test de aglutinación con perlas de látex

Fragmentos de tejido hepático y renal se analizaron con un kit de aglutinación por perlas de látex (Micrologix Sidney, British Columbia) para diagnóstico de *Aeromonas hidrofila* y *Pseudomonas fluorescens*. Estos kit están contituídos por:

1. Perlas de látex con anticuerpos policlonales hecho en conejo contra antígenos de superficie de *Pseudomonas fluorescens* MT 26, *Aeromonas hidrofila* MT 802.

2. Antígenos para control positivo obtenido de antígenos totales de las mencionadas bacterias con 0,01% de mertiolate.

3. Buffer extractor: Glicina y buffer salino con EDTA más 0,01% de mertiolate.

4. Placa para aglutinación.

2.7. Método estadístico

Cuando fue necesario los resultados fueron comparados por ANOVA y el test de contraste de Scheffé.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

Los signos clínicos fueron trastornos de la natación, aumento de la frecuencia respiratorio, ascitis, discreto exoftalmos y hemorragias cutáneas (Fig. 1).

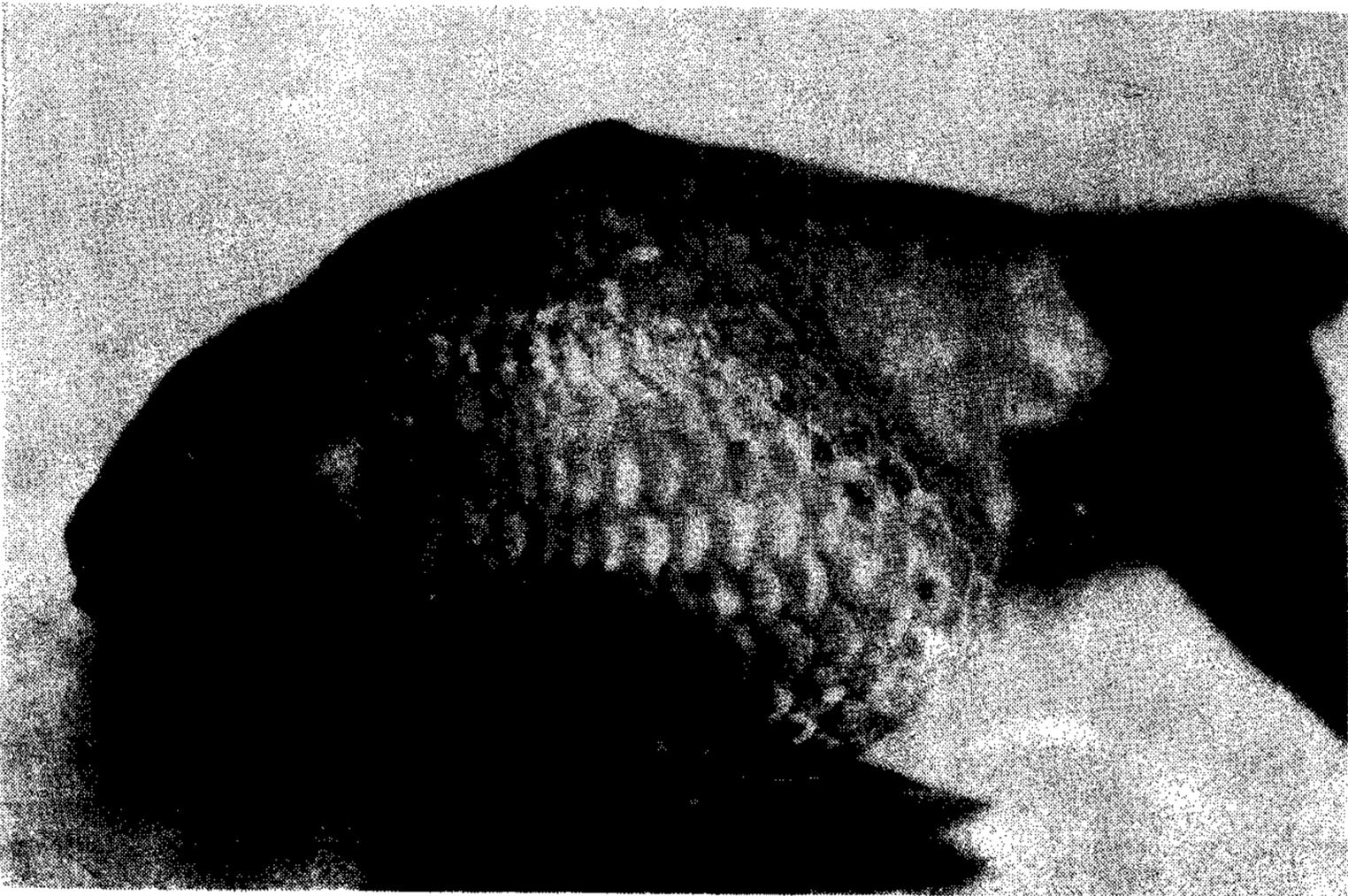


FIGURA 1: *Carassius auratus* con abdomen abultado por la ascitis.

En la necropsia se halló abundante líquido amarillento en la cavidad abdominal. Se pudo observar palidez de todas las vísceras abdominales y material de aspecto fibrinoide en peritoneo. En las branquias se observaron petequias aisladas.

3.1. Examen citohematológico

En la sangre periférica se observaron abundantes linfocitos, alguno de ellos inmaduros, de la misma forma se hallaron células de la serie eritroide inmaduras (Fig. 2a).



FIGURA 2a: Extendido de sangre periférica con linfocitos inmaduros (flecha). May-Grunwald Giemsa 1200 x. **2b:** Impronta de pronefro con abundantes linfocitos inmaduros (*). May-Grunwald Giemsa 1400 x. **2c:** Mucosa intestinal sin necrosis del epitelio y con densos infiltrados inflamatorios en la submucosa. H-E 70 x. **2d:** Infiltrados inflamatorios en la submucosa constituídos por linfocitos y macrofagos. H-E 100 x.

En la impronta de pronefros y bazo se encontró una hiperplasia linfoide con abundantes formas inmaduras (Fig. 2b) respondiendo con un aumento del diámetro medio de eritrocitos circulantes, $21,5 \pm 1,3 \mu\text{m}$, en relación a los ejemplares controles, $12,8 \pm 1,2 \mu\text{m}$ ($P < 0,05$) (Fig. 4). De la misma forma en las improntas de pronefros se pudo observar un aumento del tamaño medio de células linfoides, $15,8 \pm 0,9 \mu\text{m}$, en relación a los controles, $7,8 \pm 1,7 \mu\text{m}$ (Fig. 5).

Los melanomacrofagos se hallaron aumentados, $36,7 \pm 1,3 \mu\text{m}$ por mm^2 de tejido, en relacion a los controles $12,8 \pm 1,7 \mu\text{m}$ por mm^2 ($P < 0,05$).

3.2. *Detección de VPC con (ELISA)*

Tanto en el suero como en el homogeneizado de pronefros e hígado la prueba de ELISA fue visualmente positiva, de todas formas se utilizo un fotometro y los resultados no mostraron diferencias, ambos detectan antigenos a una dilución de 1: 5.080 (22). En los animales controles los resultados fueron negativos.

3.3. *Microscopía óptica*

Los lesiones histopatológicas se remitieron al la cavidad abdominal donde se pudo observar densos infiltrados inflamatorios peritoneales y en la submucosa de todo el tracto intestinal sin necrosis del epitelio (Fig. 2c). Estos infiltrados eran predominantemente mononucleares con linfocitos y macrofagos (Fig. 2d). No se observaron lesiones hepáticas, esplenicas ni en pronefros.

3.4. *Microscopía electrónica*

En el hígado se observaron aislados linfocitos entre los células hepáticas. Algunos hepatocitos contenían material electrodens, en algunos de estructura irregular dispuesto en forma lineal (Fig. 3a), y en otros formando cuerpos redondos u ovals (Fig. 3b).

Con mayor aumento se pudo bservar que estas inclusiones tenían una membrana simple y que presentaban forma de bala recordando a rabdovirus (Fig. 3c).

En el pronefros se observaron melanomacrofagos con abundante melanina (Fig. 3d).

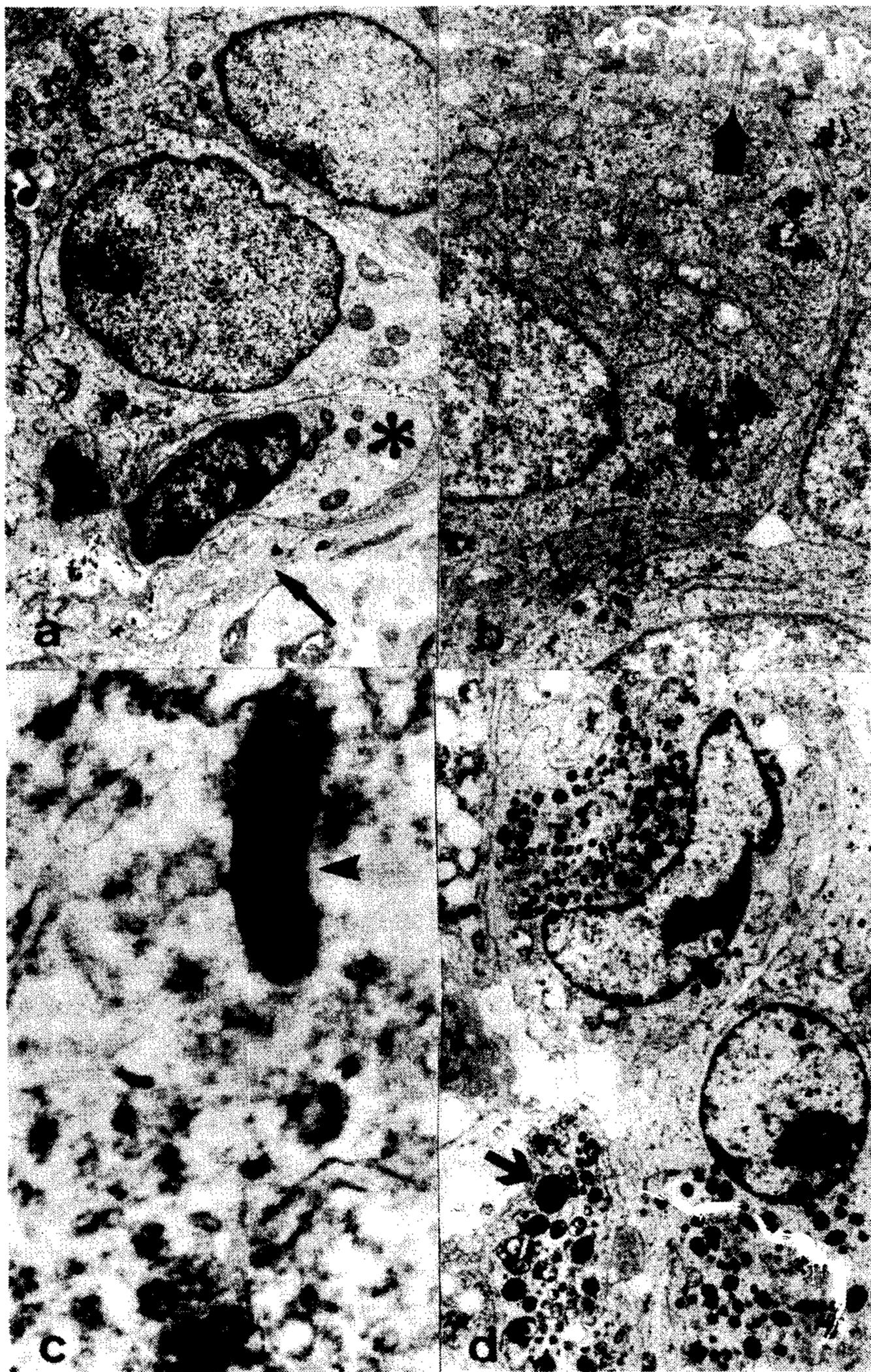
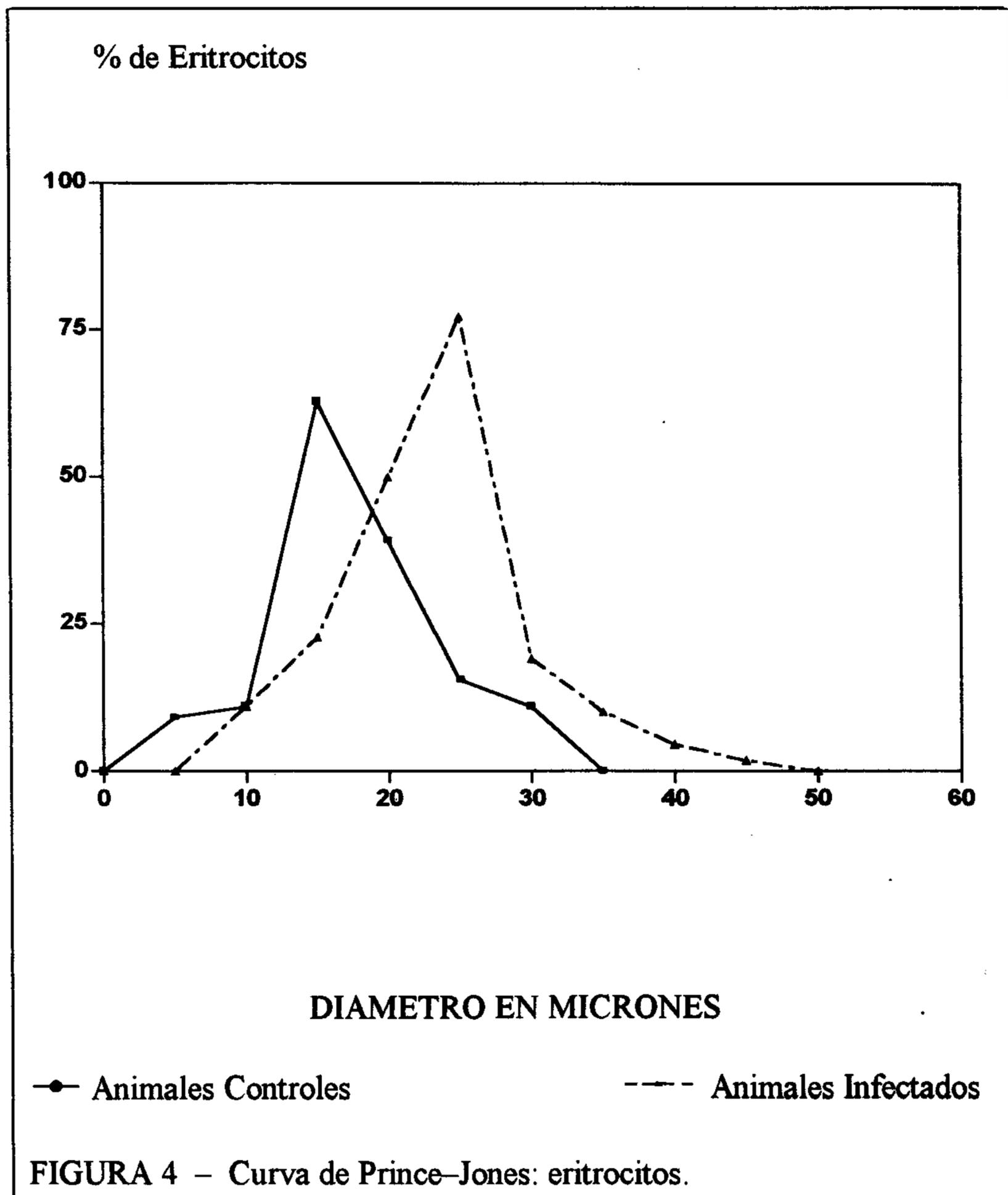


FIGURA 3a: Ultraestructura del hígado con linfocitos (*) y partículas electrodensas dispuestas en forma lineal 6.500 x. 3b: Ultraestructura del hígado con ductos biliares (flecha gruesa) y partículas electrodensas redondeadas (flecha delgada) 6.500 x. 3c: Ultraestructura del hígado, en algunos hepatocitos se pudo observar que las partículas electrodensas presentaban forma de bala recordando a rabdovirus (flecha) 60.000 x. 3d: Ultraestructura del pronefro donde se observan melanomacrofagos com abundante melanina (flecha) 9.000 x.

3.5. Test de aglutinación con perlas de látex

Todos los tests de látex para la detección de antígenos de superficie de *Pseumona fluorescens* y *Aeromona hidrofila* fueron negativos.

La VPC producida por la infección de un rbdovirus es una enfermedad contagiosa y aguda de ciprinidos jóvenes o adultos y que aparece preferentemente en época primaveral cuando la temperatura pasa



detecto la presencia de antígenos en una dilución de 1/5080. La positividad fue observada directamente por el cambio de color en los wellles con antígeno virales no existiendo diferencia con el uso del fotómetro.

Las modificaciones citohematológicas como la presencia de elementos celulares inmaduros de la serie eritroide en sangre periférica y en las improntas de pronefros responden a los fenómenos hemorrágicos que ocurren en esta enfermedad ya que no se observaron lesiones en órganos hematopoyéticos.

La presencia de linfocitos inmaduros, y no de granulocitos, es consecuencia de la viremia y de la infección tisular viral. Especialmente los linfocito, que son las células blancas circulantes más abundantes, se encuentran relacionados a infecciones virales agudas o bacteriana crónica como la micobacteriosis (5, 15). El aumento de melanomacrofagos por milimetro cuadrado de tejido renal se debe al estímulo inmunológico ocasionado por la presencia del virus (11, 18).

Los hallazgos histopatológicos se remitieron al abdomen con abundantes infiltrados inflamatorios en los que predominaron definidas como una peritonitis y enteritis subaguda. Los hallazgos ultraestructurales, si bien no fueron patognomonicos demostraron en pronefros incremento de la melanina en los melanomacrofagos y en el hígado algunos linfocitos e inclusiones de aspecto viral que bien puede corresponder a un rabdovirus.

En regiones con abundantes explotaciones de ciprinidos la VPC puede generar serias perdidas económicas. Como profilaxis además de las medidas generales de higiene epizoótica es de suma importancia la vacunación específica y en el caso de brotes de enfermedad el diagnósticos precoz con técnicas confiables como las utilizadas en este trabajo.

4. RESUMO

Uma investigação sobre mortandade de *Carassius auratus* revelou um vírus identificado pela análise de imunoabsorção ligada a enzimas (ELISA) em soro e em homogeneizado de fígado e pronefro, caracterizado como o vírus de viremia primaveril da carpa (VPC). Estudaram-se as alterações histológicas e citoematológicas desta enfermidade. A VPC é uma enfermidade que afeta a exportação de ciprinídeos na Europa e este é o primeiro caso identificado positivamente em São Paulo, Brasil.

5. SUMMARY

(IDENTIFICATION OF SPRING VIRAEMIA IN CARP *Carassius auratus* IN SÃO PAULO, BRAZIL)

An investigation on the mortality of *Carassius auratus* reveals a virus which was identified serologically and in liver and kidney homogenates by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as being the spring viraemia of carp (SVC) virus. Histological and cytohematological changes of the disease were studied. SVC is a serious disease occurring in European carp farms and this is its first positive identification in Brazil.

6. LITERATURA CITADA

1. BUCKE, D. & FINLAY, J. Identification of spring viraemia in carp (*Cyprinus carpio*) in Great Britain. *Vet. Rec.* 104: 69- 71, 1979.
2. DE KINKELIN, P. & LE BERRE, M. Rhabdovirus des poissons: II. Propriétés in vitro du virus de la viremie printaniere de la carpe. *Ann. Microbiol (Inst. Pasteur)*, 125: 113- 124, 1974.
3. DIXON, P. F.; HATTENBERGER-BAUDOY, A. M. & WAY, K. Detection of carp antibodies to spring viraemia of carp virus by a competitive immunoassay. *Dis. Aquat. Org.* 19: 181- 186, 1994.
4. DRESENKAMP, B. Spring viraemia of carp. *Monatsh. Veterinarmed.*, 41: 89- 93. 1986.
5. FERGUNSON, H. W. *Systemic Pathology of Fish*. Ames, Iowa State University Press, 1989, 469p.
6. FIJAN, N. N., PETRINEC, Z; SULIVANOVIC, D. & ZWILLENBERG, L. O. Isolation of viral causative agent from the acute form of infectious dropsy in carp. *Vet. Arch*, 41: 125- 135, 1971.
7. FIJAN, N. N. Infectious dropsy in carp. A disease complex. In: *Diseases of Fish*. Proceedings of symposium No. 30, Zoological Society, London, May, 1971, ed. L.E. Mawdesley- Thomas, New York and London, Academic Press and the Zoological Society, 1972. 395p.
8. HILL, B. J.; UNDERWOOD, B. O.; SMALE, C. J. & BROWN, F. Physicochemical and serological characterization of five rhabdoviruses infecting fish. *J. Gen. Virol.*, 27: 369- 378, 1975.
9. LENOIR, G. & DE KINKELIN, P. Fish rhabdoviruses: comparative study of protein structure. *J. Virol.* 16: 259- 162, 1973.
10. LENOIR, G. Structural proteins of spring viremia virus of carp. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 51: 895- 899, 1973.
11. MACCHI, J. G.; ROMANO, L. A. & CHRISTIANSEN, H. E. Melano-macrophage center as biological indicators of environmental change in whitemouth croaker, *Micropogonias furnieri*. *J. Fish. Biol.* 40: 971-973, 1992.
12. ROBERTS, R. J. *Fish Pathology*. London, Bailliere Tindall, 1989. 504p.

13. RODACK, L.; POSPISIL, Z.; TOMANEK, J.; VESELY, T.; OBR, T. & VALICEK, L. Enzyme- linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of spring viraemia of carp virus (SVCV) in tissue homogenates of the carp, *Cyprinus carpio*. *J. Fish. Dis.*, 16: 101- 111, 1993.
14. PFEIL-PUTZIEN, C. Experimental transmission of spring viraemia of carp through carp lice (*Argulus foliaceus*). *Zentralbl. Veterinarmed.* 25: 319- 323, 1978.
15. ROMANO, L. A. Micobacteriosis de los peces. *Documental Veter.* 8:11- 15, 1985.
16. ROMANO, L. Estudio histopatológico de los peces. *Documental Veter.* 18: 7-12, 1987
17. ROMANO, L. *Manual de Enfermedades de los Peces*. Buenos Aires, Lavet Editores, 1988. 225p.
18. ROMANO, L. A. Ictiopatología (Artículo Especial). *Ecognition* (Suplemento 1), 32-35, 1990.
19. ROMANO, L. A.; FERDER, M. D.; STELLA, I. Y.; INSERRA, F. & FERDER, L. High correlation in renal tissue between computed image analysis and clasical morphometric analysis. *J. Histotechnology*, 19: 121- 123, 1996.
20. TESARCIK, J.; MACURA, B.; TRTEK, J. & SANA, B. Carp vaccination against spring viraemia on fish farms of the State. *Bul. Visk. Ustav. Ryb. Hydrobiol. Vodnany.* 18: 13- 19, 1982.
21. WAY, K. & DIXON, P. F. Rapid detection of VHS and IHN viruses by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Appl. Ichthyol.* 4: 182- 189, 1988.
22. WAY, K. Rapid detection of SVC virus antigen in infected cell cultures and clinically diseased carp by the enzyme- linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Appl. Ichthyol.* 7: 95- 107, 1991.