

CAPÍTULO 2.3.6.

INFECCIÓN POR EL ALFAVIRUS DE LOS SALMÓNIDOS

1. Ámbito de aplicación

A los efectos de este capítulo, la infección por alfavirus de los salmónidos (AVS) es una infección por cualquier subtipo de AVS del género *Alphavirus*, que pertenece a la familia *Togaviridae*.

La infección por AVS puede causar enfermedad pancreática (EP) o enfermedad del sueño (ES) en salmón del Atlántico (*Salmo salar* L.), trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y trucha marina (*Salmo trutta* L.) (Boucher *et al.*, 1995; McLoughlin & Graham, 2007). Este virus se transmite de forma horizontal y los principales reservorios son peces infectados clínicamente enfermos o que se han recuperado (Viljugrein *et al.*, 2009). Es una enfermedad sistémica que se caracteriza, microscópicamente, por una necrosis y pérdida de tejido pancreático exocrino, así como lesiones cardíacas y del músculo esquelético. La mortalidad varía considerablemente, y oscila entre inapreciable y superior al 50% en los casos graves; hasta un 15% de los peces que sobreviven se convertirán en peces alargados y más delgados ('enanos') (McLoughlin & Graham, 2007).

2. Información sobre la enfermedad

2.1. Factores del agente

2.1.1. El agente patógeno, cepas del agente

El AVS es un virus de ARN de polaridad positiva, monocatenario, esférico y con envoltura, de unos 60-70 nm de diámetro y con un genoma de ~12 kb. Este genoma codifica ocho proteínas: cuatro glucoproteínas con cápside (E1, E2, E3 y 6K) y cuatro proteínas no estructurales (nsP1-4). La glucoproteína E2 se considera el lugar de la mayoría de epítomos neutralizantes, mientras que la E2 contiene epítomos más conservados y que presentan reacción cruzada (McLoughlin & Graham, 2007). El AVS se considera que pertenece al género *Alphavirus* de la familia *Togaviridae*. Esta hipótesis se basa en estudios de la secuencia de nucleótidos de cepas del AVS, y también está respaldada por propiedades biológicas del virus, incluidos ensayos de infección cruzada y de neutralización. Además, en el genoma del AVS hay cuatro secuencias de nucleótidos conservadas (CSE) y un motivo conservado (GDD), característico de los alfavirus (McLoughlin & Graham, 2007).

El AVS se ha dividido en seis subtipos (SAV1–SAV6) únicamente en función de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica las proteínas E2 y nsP3 (Fringuelli *et al.*, 2008). El nivel de variación antigénica entre subtipos se considera bajo porque es probable que los anticuerpos monoclonales (MAbs) generados contra un subtipo específico de AVS reaccionen de forma cruzada con otras cepas de AVS (Graham *et al.*, 2013; Jewhurst *et al.*, 2004). En la siguiente tabla se muestran los grupos de genotipo y sus ubicaciones geográficas (abreviaturas: AS= agua salada; AD = agua dulce; EP = enfermedad pancreática; ES = enfermedad del sueño):

Subtipo de AVS	Hospedador y medio	País
AVS 1 (EP)	Salmón del Atlántico (AS) Trucha arco iris (AD)	Irlanda, Reino Unido (Irlanda del Norte, Escocia)
AVS 2 AD (ES)	Trucha arco iris (AD) Salmón del Atlántico (AS)	Francia, Alemania, Italia, España, Suiza, Polonia, Reino Unido (Inglaterra, Escocia)
AVS 2 Marino (PD)	Salmón del Atlántico (AS)	Noruega, Reino Unido (Escocia)
AVS 3 (PD)	Trucha arco iris (AS) Salmón del Atlántico (AS)	Noruega
AVS 4 (PD)	Salmón del Atlántico (AS)	Irlanda, Reino Unido (Irlanda del Norte, Escocia)
AVS 5 (PD)	Salmón del Atlántico (AS)	Reino Unido (Escocia)
AVS 6 (PD)	Salmón del Atlántico (AS)	Irlanda

2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

Las pruebas de laboratorio indican que el AVS sobreviviría durante largos periodos de tiempo en el medio acuático. En estas pruebas, la supervivencia del virus es inversamente proporcional a la temperatura. En presencia de materia orgánica, se han observado periodos de supervivencia más largos en agua de mar que en agua dulce (Graham *et al.*, 2007c). El AVS se ha detectado en grasa que goteaba de peces muertos, lo cual indica que esta podría ser una vía de transmisión. En la superficie del agua de mar pueden acumularse gotitas de grasa que contribuyan a una transmisión a grandes distancias (Stene *et al.*, presentado).

Se ha observado que la semivida del AVS en el suero es inversamente proporcional a la temperatura, lo cual potencia la necesidad de un envío rápido de las muestras a 4°C a los laboratorios donde se aislará el virus. Para conservar las muestras positivas al AVS y los cultivos víricos durante largos periodos de tiempo, se recomienda un almacenaje a -80°C (Graham *et al.*, 2007c).

2.1.3. Estabilidad del agente

El AVS se inactiva rápidamente en presencia de concentraciones altas de materia orgánica a 60°C, a un pH de 7,2 y a un pH de 4 o de 12 a 4°C, lo cual indica que tanto el compostaje como el ensilado o la hidrólisis alcalina serían eficaces para inactivar el virus en residuos de pescado (Graham *et al.*, 2007a).

2.1.4. Ciclo de vida

Las vías de infección probables son las branquias y el intestino. En las fases agudas de la enfermedad, pueden detectarse grandes cantidades de AVS y puede aislarse virus vivo del corazón, el riñón, la sangre y otros órganos, pero todavía no se sabe cuáles son las verdaderas células diana del virus.

El inicio de las lesiones histopatológicas y de los signos clínicos va precedido de una viremia (McLoughlin & Graham, 2007). Las vías de excreción podrían ser excreciones o secreciones naturales, una hipótesis respaldada por la detección de AVS mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) en heces y moco de salmón del Atlántico infectado experimentalmente. Por lo tanto, este tipo de muestras podría intervenir en la transmisión horizontal del AVS por el agua (Graham *et al.*, 2012). Se ha detectado virus en el agua 4-13 días después de la infección, lo cual indica que la excreción de virus coincide con la fase virémica (Andersen *et al.*, 2010). Se ha estimado un periodo de incubación de 7-10 días a temperaturas marinas de 12-15°C, según un análisis de la producción de anticuerpos en peces y cohabitantes que fueron infectados por vía intraperitoneal en un ensayo experimental (McLoughlin & Graham, 2007). En varios estudios se ha observado que puede detectarse ARN de AVS en peces durante un largo periodo de tiempo tras la infección (Jansen *et al.*, 2010a; McLoughlin & Graham, 2007). Se ha observado infección subclínica, lo cual indica que la gravedad de un brote podría estar influida por varios factores ambientales (McLoughlin & Graham, 2007), y datos recientes muestran que el aumento estacional de la temperatura del agua podría desencadenar brotes de la enfermedad en piscifactorías infectadas por AVS (Stene *et al.*, 2013).

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Los estudios de brotes e infecciones relacionados con esta enfermedad han mostrado que el salmón del Atlántico (*Salmo salar* L.), la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y la trucha marina (*Salmo trutta* L.) son especies susceptibles (Boucher *et al.*, 1995; McLoughlin & Graham, 2007).

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

Todas las fases de la vida del hospedador deben considerarse susceptibles al AVS.

La trucha arco iris cultivada en agua dulce puede resultar afectada en cualquier fase de producción (Kerbarth Boscher *et al.*, 2006). La experiencia de Noruega muestra que la trucha arco iris y el salmón del Atlántico de piscifactoría son susceptibles en cualquier fase en agua de mar, lo cual probablemente indica la existencia de un reservorio del AVS en el agua de mar. La infección experimental mediante inyección indica la susceptibilidad de los pintos de salmón del Atlántico en agua dulce (McVicar, 1990).

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

No existe preferencia por ninguna especie ni subpoblación conocida.

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

La infección por el AVS es una enfermedad sistémica con una fase virémica temprana. Tras la infección, se ha detectado AVS en todos los órganos que se han examinado: cerebro, branquias, pseudobranquias, corazón, páncreas, riñón y músculo esquelético (Andersen *et al.*, 2007; McLoughlin & Graham, 2007), así como moco y heces (Graham *et al.*, 2012).

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

Se ha detectado AVS en peces supervivientes 6 meses después de la infección experimental (Andersen *et al.*, 2007). A nivel de piscifactoría, una población infectada albergará AVS hasta que sea sacrificada (Jansen *et al.*, 2010a; 2010b). Sin embargo, a nivel individual, no se ha documentado infección persistente de por vida.

2.2.6. Vectores

Se ha detectado AVS en los piojos del salmón (*Lepeophtheirus salmonis*) obtenidos durante brotes de enfermedad aguda en salmón del Atlántico, pero no se ha estudiado la transferencia a especies de peces susceptibles (Pettersen *et al.*, 2009). Para la transmisión del AVS no se precisan vectores.

2.2.7. Animales acuáticos salvajes sospechosos de ser portadores

En estudios de peces marinos salvajes, se ha detectado ARN de AVS en las especies de peces planos (*Limanda limanda*, *Hippoglossoides platessoides* y *Pleuronectes platessa*) (McCleary *et al.*, presentado; Snow *et al.*, 2010). Está por determinar el papel que tienen las especies salvajes, ya sean marinas o de agua dulce, como portadoras del virus.

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mecanismos de transmisión

La transmisión del AVS tiene lugar de forma horizontal, lo cual se ha comprobado en estudios filogenéticos, con el éxito de la transmisión entre peces en estudios de cohabitantes, con la demostración de la transmisión entre distintas piscifactorías, con estudios sobre la supervivencia del AVS en agua de mar y con la transmisión mediante corrientes de agua (Graham *et al.*, 2000c; 2011; Jansen *et al.*, 2010a; Kristoffersen *et al.*, 2009; Viljugrein *et al.*, 2009).

Lo más probable es que la transmisión a largas distancias y, por lo tanto, la introducción del AVS en una zona previamente no infectada se deba al desplazamiento de peces vivos infectados (Kristoffersen *et al.*, 2009; Rodger & Mitchell, 2007). Una vez el AVS se ha introducido en una zona, los factores que intervienen en la transmisión local el hecho de que la zona sea una propiedad compartida, la proximidad y las corrientes de agua (Aldrin *et al.*, 2010; Kristoffersen *et al.*, 2009; Viljugrein *et al.*, 2009). Los factores de riesgo de brotes en una piscifactoría son antecedentes previos de infección por el AVS, un alto factor de conversión alimentaria, una alta carga de piojos de mar, el uso de esguines de otoño y brotes previos de necrosis pancreática infecciosa (NPI) (Bang Jensen *et al.*, 2012; Kristoffersen *et al.*, 2009; Rodger & Mitchell, 2007).

Se ha sugerido la transmisión vertical del AVS (Bratland & Nylund, 2009), pero los datos no son convincentes (Kongtorp *et al.*, 2010; McLoughlin & Graham, 2007). Recientemente, el *Norwegian Scientific Committee for Food Safety* (comité científico noruego para la seguridad alimentaria) ha llevado a cabo una evaluación del riesgo basada en la vigilancia de las crías y en la transmisión vertical de la infección, y ha llegado a la conclusión de que el riesgo de transmisión vertical de AVS es prácticamente inexistente.

2.3.2. Prevalencia

La prevalencia de los peces infectados en piscifactorías infectadas por AVS puede variar. Durante los brotes de la enfermedad, la prevalencia suele ser alta; se han observado prevalencias del 70-100% en piscifactorías de salmón del Atlántico (Graham *et al.*, 2010). Si se muestrean peces moribundos delgados o “enanos”, la probabilidad de detectar el AVS es más alta que si se eligen al azar peces de aspecto sano (Jansen *et al.*, 2010b). La estimación de la prevalencia también variará en función del método de diagnóstico aplicado.

La prevalencia en peces salvajes se desconoce en gran medida. Se ha detectado ARN del AVS en algunas especies de flatfish de aguas marítimas de Escocia (Snow *et al.*, 2010). En un estudio serológico de salmónidos salvajes de agua dulce de Irlanda del Norte no se detectaron anticuerpos de neutralización vírica contra el AVS en ninguno de los 188 sueros analizados, mientras que la mayoría de sueros de salmones de piscifactoría de agua de mar de la misma zona dieron resultados positivos (Graham *et al.*, 2003).

2.3.3. Distribución geográfica

Se sabe que hay infección por el AVS en salmónidos de piscifactoría de Croacia, Francia, Alemania, Irlanda, Italia, Noruega, Polonia, España, Suiza y el Reino Unido (Inglaterra, Escocia e Irlanda del Norte).

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

Las tasas de mortalidad debida a la infección por AVS pueden variar en función del subtipo, de la estación, del año, de si se aplican medidas de bioseguridad y de la especie (Bang Jensen *et al.*, 2012; Graham *et al.*, 2011; Rodger & Mitchell, 2007; Stormoen *et al.*, 2013). La mortalidad acumulativa en la piscifactoría oscila entre prácticamente inexistente y superior al 50% en los casos graves (Bang Jensen *et al.*, 2012; Graham *et al.*, 2003, Rodger & Mitchell, 2007; Ruane *et al.*, 2008; Stene *et al.*, 2013).

La duración de los brotes de enfermedad, que se definen como el periodo con alta mortalidad, oscila entre 1 y 32 semanas (Jansen *et al.* 2010a; 2014; Ruane *et al.*, 2008).

2.3.5. Factores ambientales

Los brotes clínicos y la mortalidad están influidos por la temperatura del agua y la estación del año (McLoughlin & Graham, 2007; Rodger & Mitchell, 2007; Stene *et al.*, 2013; Stormoen *et al.*, 2013). Estresar a los peces con desplazamientos, hacinamiento o tratamientos puede desencadenar brotes de la enfermedad en piscifactorías infectadas.

2.4. Control y prevención

2.4.1. Vacunación

Actualmente, se dispone de una vacuna comercial. Esta vacuna se introdujo en 2007 y se utiliza mucho en piscifactorías de salmón del Atlántico de zonas endémicas de Noruega, Irlanda y Escocia. Esta vacuna contiene el subtipo 1 del AVS inactivado, y se dice que reduce la mortalidad al menos en un 50%, si se comparan peces vacunados y no vacunados de una misma piscifactoría. Esta vacuna no parece ofrecer una protección completa, pero en una evaluación de campo realizada en Noruega se observó que la mortalidad de piscifactorías con peces vacunados era comparable a la de piscifactorías sin infección por el AVS. Además, se ha observado una pequeña reducción del número de brotes (Bang Jensen *et al.*, 2012).

Actualmente se está desarrollando una vacuna que contendrá otro subtipo de AVS inactivado. Además, una vacuna de ADN está mostrando resultados prometedores. Hasta ahora, solo Canadá ha permitido el uso de vacunas de ADN para controlar enfermedades de los peces; no está claro si esta vacuna se autorizará para su uso en otros mercados.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

No se dispone de tratamientos con sustancias químicas.

2.4.3. Inmunoestimulación

No se dispone de inmunoestimulación.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

Se han observado diferencias de susceptibilidad entre distintas familias de salmón del Atlántico en pruebas de exposición y en condiciones de campo, lo cual indica el potencial que tiene la selección genética a favor de la resistencia. Tanto en Irlanda como en Noruega se están realizando esfuerzos por reproducir peces que sean más resistentes a la infección por el AVS (McLoughlin & Graham, 2007). La selección de reproductores con el uso de marcadores génicos de resistencia está en las fases iniciales.

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

No es aplicable.

2.4.6. Agentes bloqueantes

No es aplicable

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

Los métodos de la OIE para la desinfección de huevos y larvas que se describen en el Capítulo 1.1.3 *Métodos de desinfección de establecimientos de acuicultura* se consideran efectivos contra el AVS (Graham *et al.*, 2007b; Kongtorp *et al.*, 2010).

2.4.8. Prácticas generales de manejo

Para evitar la infección por el AVS, deben aplicarse unas buenas prácticas de higiene generales: utilizar lugares adecuados para el cultivo de peces, separar generaciones, poblar con peces de calidad, retirar los peces muertos, limpiar con regularidad los tanques y los compartimientos, controlar los parásitos y otros agentes patógenos, y manipular cuidadosamente los peces. Si una piscifactoría ha resultado infectada, la mortalidad puede reducirse imponiendo una parada general de la manipulación de los peces así como una parada general de la alimentación.

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

Todas las unidades de producción (estanques, tanques, jaulas de red, etc.) deben inspeccionarse para comprobar si contienen peces muertos, débiles o que se comporten de forma anómala. Es posible encontrar peces extremadamente débiles (“adormilados”) en el fondo de un tanque o en las jaulas de red. Si hay pocos peces clínicamente enfermos, pueden añadirse muestras de peces alargados y delgados (“enanos”) (Jansen *et al.*, 2010b).

3.2. Conservación de las muestras para su envío

Histología e inmunohistoquímica:	Fijación en formalina neutra al 10% tamponada con fosfato
Biología molecular (RT-PCR y secuenciación):	Medio adecuado para conservar el ARN
Cultivo celular:	Medio de transporte de virus
Serología:	Plasma o suero sanguíneo

3.3. Combinación de varias muestras

A efectos del diagnóstico, la combinación de muestras de varios peces no se considera necesaria ni recomendada porque la detección del AVS y la presencia de alteraciones histopatológicas características en el mismo individuo respaldarán la sospecha de que la enfermedad observada se deba a este virus. A efectos de la vigilancia, puede ser aceptable la combinación de varias muestras para el examen virológico (PCR o cultivo celular), pero puede disminuir la sensibilidad de las pruebas.

3.4. Órganos y tejidos de elección

El corazón y el riñón medio son los órganos recomendados para la detección del AVS tanto por métodos de biología molecular como mediante cultivo celular. Durante el curso de la enfermedad, el corazón suele contener más AVS que otros tejidos y siempre debe obtenerse una muestra del mismo. Se ha observado que después de un brote de la enfermedad permanecían positivos durante meses tras la detección inicial, según la PCR, las branquias y el corazón, (Graham *et al.*, 2010) y combinaciones de corazón y riñón medio (Jansen *et al.*, 2010a; 2010b)

Durante la fase virémica inicial, también es adecuado analizar muestras de suero para detectar el AVS, bien por métodos de biología molecular, bien mediante cultivo celular. Por lo tanto, la obtención de suero puede utilizarse para las pruebas de cribado de advertencia iniciales (Graham *et al.*, 2010). Desde alrededor de las 3 semanas tras la infección por el AVS, es adecuado utilizar suero o plasma sanguíneo en las pruebas de neutralización vírica que identifican anticuerpos neutralizantes contra el AVS en peces expuestos a este virus (Graham *et al.*, 2003).

Los tejidos para el examen histológico deben ser las branquias, el corazón, los ciegos pilóricos con tejido pancreático adherido, el hígado, el riñón, el bazo y el músculo esquelético, con músculo tanto rojo (aerobio) como blanco (anaerobio). Debe tomarse una muestra de piel con músculo esquelético adherido de la zona de la línea lateral y llegando a suficiente profundidad como para incluir músculo tanto rojo como blanco.

4. Métodos de diagnóstico

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

Es posible observar una caída repentina del apetito 1-2 semanas antes de la detección de un aumento de la mortalidad. Pueden observarse peces clínicamente enfermos nadando lentamente en la superficie del agua. En algunos casos, pueden hallarse peces extremadamente débiles (“adormilados”) en el fondo de los tanques o en las jaulas de red. También es posible encontrar un aumento del número de cilindros fecales en el agua. No obstante, es importante destacar que los signos clínicos no son patognomónicos y que es necesaria una observación y examen cuidadosos de todos los peces muertos, débiles o que presenten comportamientos anómalos.

Inicialmente, el estado nutricional suele ser normal, pero en los meses posteriores a un brote o en las últimas fases de la enfermedad, es habitual observar peces alargados y más delgados (“enanos”) en mal estado. La aparición de peces alargados y más delgados puede deberse a factores distintos del AVS.

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

Un hallazgo habitual es el contenido intestinal mucoide y amarillo, porque se observa habitualmente en peces que no comen. En ocasiones pueden observarse signos de perturbaciones circulatorias, como hemorragias petequiales, pequeñas ascitis o enrojecimiento de la zona pancreática. Algunos peces enfermos pueden presentar palidez o rotura cardíaca. Es importante destacar que los hallazgos post-mortem no son patognomónicos.

4.2.2. Bioquímica clínica

No documentada para uso diagnóstico.

4.2.3. Anatomopatología microscópica

Las alteraciones más frecuentes en peces clínicamente enfermos son una pérdida grave de tejido pancreático exocrino, necrosis e inflamación de miocitos cardíacos, inflamación del músculo esquelético rojo (aerobio) y degeneración o inflamación del músculo esquelético blanco (anaerobio). Un hallazgo menos frecuente pero importante es la detección de células con muchos gránulos eosinofílicos citoplasmáticos a lo largo de los sinusoides renales.

A medida que la enfermedad avanza, la aparición de estas alteraciones no es simultánea en todos los órganos: En una fase inicial muy corta es posible que la única lesión sea una necrosis del tejido pancreático exocrino y una reacción inflamatoria variable de la grasa peripancreática. Poco después, aparece degeneración y necrosis de células del miocardio antes de que se acentúe la respuesta inflamatoria del corazón. Aparentemente desaparecerán los restos necróticos pancreáticos y pronto se observará el cuadro habitual de pérdida grave de tejido pancreático exocrino, de forma simultánea al aumento de la inflamación cardíaca. Algo después, aparece degeneración, inflamación y fibrosis del músculo esquelético. En una parte de los peces, puede producirse una fibrosis grave del tejido periacinar, y en este caso el páncreas no se recupera (enanos) (Christie *et al.*, 2007; Kerbart Boscher *et al.*, 2006; McLoughlin & Graham, 2007; Taksdal *et al.*, 2007).

4.2.4. Preparaciones húmedas

No es aplicable.

4.2.5. Frotis

No es aplicable.

4.2.6. Cortes fijados, inmunohistoquímica

El único método inmunohistoquímico publicado (Taksdal *et al.*, 2007) solo se recomienda para muestras de peces con necrosis aguda del tejido pancreático exocrino.

4.2.6.1. Preparación de los cortes de tejido

Los tejidos se fijan en formalina neutra al 10% tamponada con fosfato, durante al menos 1 día, se deshidratan en etanol gradado, se aclaran en xileno y se incluyen en parafina, siguiendo los protocolos estándar. Se calientan cortes de unos 3 µm de espesor (para inmunohistoquímica, preparados sobre portaobjetos recubiertos de poli-L-lisina) a 56–58°C (máximo de 60°C) durante 20 minutos, se desparafinan (dewaxed) en xileno, se rehidratan con etanol gradado y se tiñen con hematoxilina y eosina para la histopatología y la inmunohistoquímica, como se describe a continuación.

4.2.6.2. Protocolo de tinción para inmunohistoquímica

Todas las incubaciones se realizan a temperatura ambiente y todos los pasos de lavado se realizan con solución salina tamponada con Tris (TBS).

- En primer lugar se bloquean los puntos de unión de anticuerpo inespecífico en albúmina sérica bovina (BSA) diluida en TBS durante 20 minutos. A continuación se vierte la solución sin lavar.
- Los cortes se incuban con anticuerpo primario (anticuerpo 4H1 monoclonal de ratón contra la glucoproteína E1 del AVS [Todd *et al.*, 2001]), se diluyen a 1/3000 en BSA al 2,5% en TBS y después se incuban durante toda una noche; el siguiente paso son dos baños de lavado, que duran como mínimo 5 minutos.
- Los cortes se incuban con anticuerpos secundarios (anticuerpos anti Ig de ratón generados en conejo y biotinilados) diluidos a 1/300 durante 30 minutos, seguidos de baños de lavado iguales a los del paso ii.
- Los cortes se incuban con estreptavidina con fosfatasa alcalina a 1/500 durante 30 minutos y a continuación se aplican baños de lavado como los del paso ii.
- Para la detección de anticuerpos ligados, los cortes se incuban con Fast Red¹ (1 mg ml⁻¹) y Naphthol AS-MX fosfato (0,2 mg ml⁻¹) con Levamisol 1 mM en TBS 0,1 M (pH 8,2), se permite el revelado durante 20 minutos y después se aplica un lavado en agua de grifo; a continuación se aplica la tinción de contraste con hematoxilina de Mayer y se montan en medio de montaje acuoso.

Se incluyen cortes positivos a AVS y negativos a AVS como controles en cada ejecución (Taksdal *et al.*, 2007)

4.2.7. Microscopía electrónica/citopatología

No aplicable a uso diagnóstico.

4.2.8. Diagnósticos diferenciales

4.2.8.1. Diagnósticos diferenciales relevantes para la anatomopatología microscópica (Apartado 4.2.3)

Los tejidos afectados por una infección por AVS, presentan inflamación del músculo esquelético y cardíaco (IMEC), síndrome de miocardiopatía (SMC) y NPI. No obstante, al examinar mediante histopatología todos los órganos principales, el patrón de los órganos afectados suele tener un aspecto diferente:

	Infección por AVS	IMEC	SMC	NPI
Corazón*	+	+	+	–
Páncreas	+	–	–	+
Músculo esquelético	+	+	–	–

*Las alteraciones cardíacas del SMC afectan principalmente a la capa esponjosa más interna del ventrículo y de la aurícula, mientras que en la infección por AVS y en la IMEC, la capa compacta del ventrículo es la que resulta más gravemente afectada. Aunque estas tres enfermedades incluyen epicarditis, la IMEC es la que causa una inflamación más intensa del epicardio.

1 La mención de productos comerciales concretos a modo de ejemplos no implica su aceptación por parte de la OIE. Esto es aplicable a todos los productos mencionados en este *Manual Acuático*.

En una fase inicial de la infección, aguda y muy corta, cuando solo ha aparecido necrosis del páncreas exocrino, una infección por AVS podría confundirse con una NPI causada por el virus de la NPI (VNPI). En estos casos, el examen virológico aclarará cuál es el agente causal.

Los exámenes virológicos y serológicos, combinados con un examen histopatológico de 5-10 peces clínicamente enfermos suelen aclarar la situación. La IMEC y el SMC solo se han detectado en salmón del Atlántico.

4.3. Métodos de detección e identificación del agente

4.3.1. Métodos directos de detección

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

4.3.1.2.1. Cultivo celular

El aislamiento de cepas naturales de AVS en cultivo celular puede ser difícil (Christie, 1998; Graham, 2007c; Petterson *et al.*, 2013). Para el aislamiento primario de AVS es frecuente utilizar CHSE-214, pero pueden emplearse líneas celulares susceptibles como BF-2, FHM, SHK-1, EPC, CHH-1 u otras. Se han observado diferencias de susceptibilidad a la línea celular entre distintas cepas naturales del AVS (Graham *et al.*, 2008; Herath *et al.*, 2009), y por lo tanto se recomienda probar varias líneas celulares para el aislamiento inicial en cultivo celular del AVS cuando se trabaja en un laboratorio nuevo o con una nueva cepa vírica.

Las células de la línea CHSE-214 se cultivan a 20°C en medio mínimo esencial de Eagle (EMEM) con aminoácidos no esenciales y tampón HEPES (ácido 4-[2-hidroxietil] piperazina-1-etanesulfónico) 0,01 M o bien medio de cultivo celular Leibovitz L-15, ambos suplementados con suero bovino fetal (FBS) (al 5% o 10%) y L-glutamina (4 mM).

Para el aislamiento del virus, las células se cultivan en frascos de cultivo celular o placas de cultivo celular multipocillo. Pueden inocularse controles positivos al AVS paralelamente con muestras de tejido a modo de prueba de susceptibilidad celular al AVS. Cuando se incluyan controles positivos, deben tomarse medidas para evitar la contaminación.

i) Inoculación de monocapas celulares

Se prepara una suspensión al 2% de homogenado de tejido o una suspensión al 10% de suero empleando medio L-15 o EMEM sin suero u otro medio cuya idoneidad esté documentada. Se retira el medio de cultivo de las monocapas que estén creciendo activamente (cultivos de 1 a 2 días de edad o cultivos con un 70-80% de confluencia) cultivadas en frascos de cultivo tisular o placas de cultivo celular multipocillo (véase arriba). Se inoculan las monocapas con un volumen bajo del homogenado tisular al 2% o dilución sérica al 10% (para frascos de 25 cm²: 1,5 ml). Se ajusta el volumen a la superficie que se esté utilizando. Se deja incubar durante 2-3 horas a 15°C y a continuación se retira el inóculo y se añade medio L-15 o EMEM fresco suplementado con suero fetal bovino al 2-5% (para frascos de 25 cm²: 5 ml).

Cuando las muestras de peces proceden de lugares de producción en los que el VNPI se considera endémico, antes de la inoculación debe incubarse el sobrenadante del tejido homogenado (durante al menos 1 hora a 15°C) con una combinación de antisueros contra los serotipos nativos del VNPI.

ii) Seguimiento de la incubación

Se examinan los cultivos celulares inoculados (mantenidos a 15°C) a intervalos periódicos (al menos cada 7 días) para comprobar si aparece efecto citopático (ECP). El ECP clásico debido al AVS son placas de células picnóticas y vacuoladas. No obstante, las cepas naturales noruegas de AVS (tanto SAV3 como SAV2 marina) no suelen producir ECP a bajo número de pases, y esto también se ha observado en otros subtipos del AVS (Graham *et al.*, 2008; Petterson *et al.*, 2013). Si pasados 14 días no ha aparecido ECP, se procede al subcultivo en cultivos celulares nuevos.

iii) Procedimiento del subcultivo

Catorce días (o antes, cuando aparece un ECP evidente) después de la inoculación, los cultivos se congelan a -80°C y se descongelan (este procedimiento se puede repetir 1-2 veces) para liberar el virus de las células infectadas.

Tras la centrifugación a 3.000 *g* durante 5 minutos, los sobrenadantes se inoculan en cultivos celulares nuevos como se ha indicado para la inoculación primaria: se retira el medio de

cultivo y se inoculan monocapas con un pequeño volumen de sobrenadante diluido (1/5 y diluciones superiores) durante 2-3 horas antes de añadir el medio nuevo.

Los cultivos celulares inoculados se incuban durante al menos 14 días y se examinan a intervalos periódicos, como se ha descrito para la inoculación primaria. Al final del periodo de incubación, o antes si aparece ECP evidente, se recoge el medio para identificar el virus, como se describe a continuación. Para comprobar si contienen AVS, los cultivos celulares siempre deben examinarse mediante inmunofluorescencia (prueba de la inmunofluorescencia indirecta [IFAT]), puesto que puede producirse replicación vírica sin que aparezca ECP evidente.

iv) Verificación del crecimiento de AVS en cultivo celular basada en anticuerpos

Todas las incubaciones siguientes se llevan a cabo a temperatura ambiente a no ser que se especifique lo contrario.

- a) Se preparan monocapas de células en placas de cultivo tisular adecuadas (por ejemplo, placas de 96 pocillos), o en cubreobjetos, en función del tipo de microscopio de que se disponga (para las monocapas cultivadas en placas de cultivo tisular es necesario un microscopio invertido equipado con luz UV). Deben incluirse las monocapas necesarias para los controles negativos y positivos.
- b) Se inoculan las monocapas con las suspensiones víricas a identificar en diluciones decimales, a razón de dos monocapas por dilución. Se añade control positivo del virus a diluciones conocidas para que dé una buena reacción de tinción. Se incuban los cultivos celulares inoculados a 15°C durante 9-11 días.
- c) Se fijan en acetona al 80% durante 20 minutos tras retirar el medio de cultivo celular y se enjuagan una vez con acetona al 80%. Se retira el fijador y se secan al aire durante 1 hora. Si es necesario, los cultivos celulares fijados pueden almacenarse secos durante 14 días a 4°C hasta la tinción.
- d) Se incuban las monocapas celulares con anticuerpos monoclonales anti AVS a una dilución adecuada en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 1 hora y se enjuagan tres veces con PBS con Tween 20 al 0,05%.
- e) Se incuban con anticuerpos anti Ig de ratón conjugados con isotiocianato de fluoresceína (ITCF) durante 1 hora (o bien, si el anticuerpo primario es policlonal y procede de conejos, se utiliza anticuerpo contra inmunoglobulina de conejo conjugado con ITCF), siguiendo las instrucciones del proveedor. Para aumentar la sensibilidad de la prueba, los anticuerpos anti Ig de ratón conjugados con ITCF pueden sustituirse por anticuerpos anti Ig de ratón marcados con biotina y estreptavidina marcada con ITCF, con un lavado como el del paso d) entre estos pasos. Los núcleos se pueden teñir con yoduro de estreptavidina (100 µg ml⁻¹ en agua destilada estéril). Se añade PBS (sin Tween 20) y se examinan a luz UV. Para evitar que se velen, las placas teñidas deben mantenerse en la oscuridad hasta que se examinen. Para periodos de almacenaje largos (más de 2-3 semanas) puede utilizarse una solución de 1,4-diazabicyclooctano (DABCO al 2,5% en PBS, pH 8,2) o un reactivo similar, a modo de solución anti-velado.

4.3.1.2.3. *Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), RT-PCR en tiempo real y genotipificación mediante secuenciación*

Los cebadores descritos a continuación para la RT-PCR en tiempo real y la RT-PCR con secuenciación detectarán todos los subtipos conocidos de AVS.

Puede utilizarse la RT-PCR para detectar el AVS en ARN total (o ácidos nucleicos totales) extraído de los órganos o tejidos de elección (véase el Apartado 3.4). La RT-PCR en tiempo real para la detección del AVS se recomienda porque aumenta la especificidad y también la sensibilidad de la prueba.

Para la genotipificación, se recomienda la RT-PCR con posterior secuenciación de fragmentos de los genes que codifican las proteínas E2 y nsP3.

A continuación se muestra una lista de los cebadores y la sonda necesarios para la RT-PCR en tiempo real del gen nsP1, así como los cebadores necesarios para la genotipificación. Los cebadores E2 también pueden utilizarse para la detección mediante RT-PCR convencional del AVS, si es necesario.

RT-PCR: Secuencias de cebadores y sondas	Denominación	Segmento genómico	Tamaño del producto	Referencia
QnsP1F: 5'-CCG-GCC-CTG-AAC-CAG-TT-3' QnsP1R: 5'-GTA-GCC-AAG-TGG-GAG-AAA-GCT-3' Sonda QnsP1: 5'FAM-CTG-GCC-ACC-ACT-TCG-A-MGB3'	Cebador directo Cebador inverso Taqman@probe	QnsP1	107 nt	Hodneland <i>et al.</i> , 2006
E2F: 5'-CCG-TTG-CGG-CCA-CAC-TGG-ATG-3' E2R: 5'-CCT-CAT-AGG-TGA-TCG-ACG-GCA-G-3'	Cebador directo Cebador inverso	E2	516 nt	Fringuelli <i>et al.</i> , 2008
nsP3F: 5'-CGC-AGT-CCA-GCG-TCA-CCT-CAT-C-3' nsP3R: 5'-TCA-CGT-TGC-CCT-CTG-CGC-CG-3'	Cebador directo Cebador inverso	nsP3	490 nt	Fringuelli <i>et al.</i> , 2008

4.3.2. Métodos serológicos

4.3.2.1 Neutralización sérica basada en la inmunoperoxidasa (Graham *et al.*, 2003)

En estudios experimentales se ha observado que pueden detectarse anticuerpos neutralizantes 10-16 días después de la infección (Graham *et al.*, 2003), y pueden utilizarse pruebas de neutralización en suero (SN) como método de diagnóstico para la detección de anticuerpos contra el AVS. Las pruebas de SN se basan en la presencia o ausencia de crecimiento de virus detectable en cultivos celulares tras la incubación con un suero que podría contener anticuerpos neutralizantes. Además, la prueba permite detectar virus en suero o plasma, si lo hay.

Se cultivan células de la línea CHSE-214 como se describe en el Apartado 4.3.1.2.1 Cultivo celular. Se prepara una suspensión de células tripsinizadas, diluidas a 1/3 en medio de cultivo (FBS al 10%) para la prueba de la SN.

- Se preparan diluciones a 1/20 y 1/40 de cada suero problema en medio de mantenimiento (FBS al 2%), y se transfieren a dos pocillos duplicados (15 µl por pocillo) de una placa de microtitulación de grado de cultivo tisular y fondo plano. Se añade un volumen igual de virus (100 DICT₅₀ [mediana de la dosis infectiva en cultivo tisular]) y la placa se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente.
- Se añaden 70 µl de medio de mantenimiento, y 50 µl de suspensión celular CHSE-214 a cada pocillo, y las placas se incuban durante 3 días a 15°C.
- A continuación, la monocapa celular se fija y tñe como se describe en el Apartado 4.3.1.2.1, paso iv *Verificación del crecimiento de AVS en cultivo celular basada en anticuerpos*, o empleando el siguiente procedimiento: se fijan monocapas de células CHSE-214 durante 30 minutos a temperatura ambiente en formalina tamponada neutra al 10%. Tras dos lavados con PBS 0,1 M, se añade un anticuerpo monoclonal (MAb) contra el AVS a las monocapas a una dilución adecuada. Se visualizan los MAb fijados con un sistema de estreptavidina-biotina marcada siguiendo las instrucciones del fabricante.
- A continuación, se calculan los títulos de SN (ND₅₀) según el método de Karbere (1931), y los títulos $\geq 1:20$ se consideran positivos. Siempre deben incluirse tanto controles séricos (sin virus añadido) como controles con virus (sin suero añadido), para garantizar la validez de los resultados.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

Los métodos actualmente disponibles para la vigilancia dirigida y el diagnóstico de la infección por el AVS se detallan en la Tabla 5.1. Las denominaciones utilizadas en la Tabla indican: a = el método es el recomendado por razones de disponibilidad, utilidad y especificidad y sensibilidad de diagnóstico; b = el método es estándar, con buena sensibilidad y especificidad de diagnóstico; c = el método tiene aplicación en algunas situaciones, pero el coste, la precisión u otros factores limitan seriamente su aplicación; y d = el método no se recomienda actualmente para este fin. Esta clasificación es de alguna forma subjetiva ya que la idoneidad implica cuestiones de fiabilidad, sensibilidad, especificidad y utilidad. Aunque no todas las pruebas incluidas en las categorías a o b se han sometido a estandarización y validación formales, su naturaleza sistemática y el hecho de que se hayan usado generalmente sin resultados dudosos las hace aceptables.

Tabla 5.1. Métodos de vigilancia dirigida y diagnóstico

Método	Vigilancia dirigida			Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
	Alevines	Juveniles	Adultos		
Signos macroscópicos	d	d	d	c	d
Histopatología	c	c	c	a	a
Inmunohistoquímica	d	d	d	b	b
Aislamiento en cultivo celular	d	d	d	c	c
Neutralización en suero	d	c	b	a	b
RT-PCR en tiempo real	b	b	b	b	b
RT-PCR con secuenciación	d	b	b	b	a

RT-PCR = Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa.

6. Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de infección por AVS

La prueba recomendada para la vigilancia de poblaciones de peces susceptibles para declarar la ausencia de AVS es la RT-PCR, como se describe en el Apartado 4.3.1.2.3 de este capítulo.

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

Un caso sospechoso de infección por el AVS se define como:

- i) Signos clínicos compatibles con infección por el AVS (Apartado 4.1.1)
 - o
- ii) Lesiones macroscópicas o microscópicas compatibles con la enfermedad (Apartados 4.2.1 y 4.2.3)
 - o
- iii) Detección de anticuerpos contra el AVS (Apartado 4.3.2.1) o detección del AVS (Apartado 4.3.1.2.3)
 - o
- iv) Existencia de información epidemiológica de contacto infeccioso con uno o varios casos sospechosos o confirmados.

7.2. Definición de caso confirmado

Datos que indiquen la presencia del AVS obtenidos con dos pruebas de laboratorio independientes, como lesiones microscópicas (Apartado 4.2.3), cultivo celular (Apartado 4.3.1.2), RT-PCR (Apartado 4.3.1.2.3) o serología (Apartado 4.3.2)

8. Bibliografía

- ALDRIN M., STORVIK B., FRIGESSI A., VILJUGREIN H. & JANSEN P.A. (2010). A stochastic model for the assessment of the transmission pathways of heart and skeleton muscle inflammation, pancreas disease and infectious salmon anaemia in marine fish farms in Norway. *Prev. Vet. Med.*, **93**, 51–61.
- ANDERSEN L., BRATLAND A., HODNELAND K. & NYLUND A. (2007). Tissue tropism of salmonid alphaviruses (subtypes SAV1 and SAV3) in experimentally challenged Atlantic salmon (*Salmon salar* L.). *Arch. Virol.*, **152**, 1871–1883.
- ANDERSEN L., HODNELAND H. & NYLUND A. (2010). No influence of oxygen levels on pathogenesis and virus shedding in Salmonid alphavirus (SAV)-challenged Atlantic salmon (*Salmon salar* L.). *Virol. J.*, **7**, 198.
- BANG JENSEN B., KRISTOFFERSEN A.B., MYR C. & BRUN E. (2012). Cohort study of effect of vaccination on pancreas disease in Norwegian salmon aquaculture. *Dis. Aquat. Org.*, **102**, 23–31.
- BOUCHER P., RAYNARD R.S., HOUGHTON G. & BAUDIN LAURENCIN F. (1995). Comparative experimental transmission of pancreas disease in Atlantic salmon, rainbow trout and brown trout. *Dis. Aquat. Org.*, **22**, 19–24.
- BRATLAND A. & NYLUND A. (2009). Studies on the possibility of vertical transmission of Norwegian salmonid Alphavirus in production of Atlantic salmon in Norway. *J. Aquat. Anim. Health*, **21**, 73–78.
- CHRISTIE K.E., FYRAND K., HOLTET L. & ROWLEY H.M. (1998) Isolation of pancreas disease virus from farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Norway. *J. Fish Dis.*, **21**, 391–394.
- CHRISTIE K.E., GRAHAM D.A., MCLOUGHLIN M. F., VILLOING S., TODD D. & KNAPPSKOG D. (2007). Experimental infection of Atlantic salmon *Salmo salar* pre-smolts by i.p. injection of new Irish and Norwegian salmonid alphavirus (SAV) isolates: a comparative study. *Dis. Aquat. Org.*, **75**, 13–22.
- FRINGUELLI E., ROWLEY H.M., WILSON J.C., HUNTER R., RODGER H. & GRAHAM D.A. (2008). Phylogenetic analyses and molecular epidemiology of European salmonid alphaviruses (SAV) based on partial E2 and nsP3 gene nucleotide sequences. *J. Fish Dis.*, **31**, 811–823.
- GRAHAM D.A., BROWN A., SAVAGE P. & FROST P. (2012). Detection of salmon pancreas disease in the faeces and mucus of Atlantic salmon *Salmon salar* by real-time RT-PCR and cell culture following experimental challenge. *J. Fish Dis.*, **35**, 949–951.
- GRAHAM D.A., CHERRY K., WILSON C.J. & ROWLEY H.M. (2007a). Susceptibility of salmonid alphavirus to a range of chemical disinfectants. *J. Fish Dis.*, **30**, 269–277.
- GRAHAM D.A., FROST P., MCLAUGHLIN K., ROWLEY H.M., GABESTAD I., GORDON A. & MCLOUGHLIN M.F. (2011). A comparative study of marine salmonid alphavirus subtypes 1–6 using an experimental cohabitation challenge model. *J. Fish Dis.*, **34**, 273–286.
- GRAHAM D.A., FRINGUELLI E., WILSON C., ROWLEY H.M., BROWN, A., RODGER H., MCLOUGHLIN M.F., MCMANUS C., CASEY E., MCCARTHY L.J. & RUANE N.M. (2010). Prospective longitudinal studies of salmonid alphavirus infections on two Atlantic salmon farms in Ireland; evidence for viral persistence. *J. Fish Dis.*, **33**, 123–135.
- GRAHAM D.A., JEWURST V.A., ROWLEY H.M., MCLOUGHLIN M.F. & TODD D. (2003). A rapid immunoperoxidase-based neutralization assay for salmonid alphavirus used for a serological survey in Northern Ireland. *J. Fish Dis.*, **26**, 407–413.
- GRAHAM D.A., ROWLEY H.M., FRINGUELLI E., BOVO G., MANFRIN A., MCLOUGHLIN M.F., ZARZA C., KHALILI M. & TODD D. (2007b). First laboratory confirmation of salmonid alphavirus infection in Italy and Spain. *J. Fish Dis.*, **30**, 569–572.
- GRAHAM D.A., ROWLEY H.M. & FROST P. (2013). Cross-neutralization studies with salmonid alphavirus subtype 1–6 strains: results with sera from experimental studies and natural infections. *J. Fish Dis.*, published online doi: 10.1111/jfd.12167
- GRAHAM D.A., STAPLES V., WILSON C.J., JEWURST H., CHERRY K., GORDON A. & ROWLEY H.M. (2007c). Biophysical properties of salmonid alphaviruses: influences of temperature and pH on virus survival. *J. Fish Dis.*, **30**, 533–543.
- GRAHAM D.A., WILSON C., JEWURST H. & ROWLEY H. (2008). Cultural characteristics of salmonid alphaviruses – influences of cell line and temperature. *J. Fish Dis.*, **31**, 859–868.

- HERATH T., COSTA J., THOMPSON K., ADAMS A. & RICHARDS R. (2009). Alternative cell line for the isolation of salmonid alphavirus-1. *Icelandic Agricultural Sci.*, **22**, 19–27.
- HODNELAND K. & ENDRESEN C. (2006). Sensitive and specific detection of salmonid alphavirus using real-time PCR (TaqMan). *Journal of Virological Methods* **131**, 184–192.
- JANSEN M.D., BANG JENSEN B. & BRUN E. (2014). Clinical manifestations of pancreas disease (PD) outbreaks in Norwegian marine salmon farming – variations due to salmonid alphavirus (SAV) subtype. (Accepted) *J. Fish Dis.*
- JANSEN M.D., TAKSDAL T., WASMUTH M.A., GJERSET B., BRUN E., OLSEN A.B., BRECK O. & SANDBERG M. (2010a). Salmonid alphavirus (SAV) and pancreas disease (PD) in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in freshwater and seawater sites in Norway from 2006 to 2008. *J. Fish Dis.*, **33**, 391–402.
- JANSEN M.D., WASWUTH M.A., OLSEN A.B., GJERSET B., MODAHL I., BRECK O., HALDORSEN R.N., HJELMELAND R., TAKSDAL T. (2010b). Pancreas disease (PD) in sea-reared Atlantic salmon, *Salmon salar* L., in Norway; a prospective, longitudinal study of disease development and agreement between diagnostic test results. *J. Fish Dis.*, **33**, 723–736.
- JEWHURST V.A., TODD D., ROWLEY H.M., WALKER I.W., WESTON J.H. MCLOUGHLIN M.F & GRAHAM D.A. (2004). Detection and antigenic characterization of salmonid alphavirus isolates from sera obtained from farmed Atlantic salmon, *salmo salar* L., and farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.*, **27**, 143–149.
- KERBART BOSCHER S., MCLOUGHLIN M., LE VEN A., CABON J., BAUD M. & CASTRIC J. (2006). Experimental transmission of sleeping disease in one-year-old rainbow trout *Onchorhynchus mykiss* (Walbaum), induced by sleeping disease virus. *J. Fish Dis.*, **29**, 263–273.
- KONGTORP R.T., STENE A., ANDREASSEN P.A., ASPEHAUG V., GRAHAM D.A., LYGSTAD T.M., OLSEN A.B., OLSEN R.S., SANDBERG M., SANTI N., WALLACE C. & BRECK O. (2010). Lack of evidence for vertical transmission of SAV 3 using gametes of Atlantic salmon, *salmo salar* L., exposed by natural and experimental routes. *J. Fish Dis.*, **33**, 879–888.
- KRISTOFFERSEN A.B., VILJUGREIN H., KONGTORP R.T., BRUN E. & JANSEN P.A. (2009). Risk factors for pancreas disease (PD) outbreaks in farmed Atlantic salmon and rainbow trout in Norway during 2003–2007. *Prev. Vet. Med.*, **90**, 127–136.
- MCCLEARY S.J., GILTRAP M., HENSHILWOOD K. & RUANE N.M. (2014). Detection of salmonid alphavirus RNA in Celtic and Irish Sea flatfish. Submitted to *Dis. Aquat. Org.* (June 2013).
- MCLOUGHLIN M.F. & GRAHAM D.A. (2007). Alphavirus infections in salmonids- a review. *J. Fish Dis.*, **30**, 511–531.
- MCVICAR A.H. (1990). Infection as a primary cause of pancreas disease in farmed Atlantic salmon. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **10** (3), 84–87.
- PETTERSON E., SANDBERG M. & SANTI N. (2009). Salmonid alphavirus associated with *Lepeoptheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae) from Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.*, **30**, 511–531.
- PETTERSON E., STORMOEN, M., EVENSEN O., MIKALSEN A.B. & HAUGLAND O. (2013). Natural infection of Atlantic salmon (*Salmon salar*) with salmonid alphavirus 3 generates numerous viral deletion mutants. *J. Gen. Virol.*, **94**, 1945–1954.
- RODGER H. & MITCHELL S. (2007). Epidemiological observations of pancreas disease of farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Ireland. *J. Fish Dis.*, **32**, 477–479.
- RUANE N., GRAHAM D. & RODGER H. (2008). Pancreas disease in farmed salmon – health management and investigations at Irish farm sites 2005–2008. Marine Environments and Health Series, No. 34, Marine Institute. Available at <http://oar.marine.ie/handle/10793/267>
- SNOW M., BLACK I., MCINTOSH R., BARETTO E., WALLACE I.S. & BRUNO D.W. (2010). Detection of salmonid alphavirus RNA in wild marine fish: implications for the origin of salmon pancreas disease in aquaculture. *Dis. Aquat. Org.*, **91**, 177–188.
- STENE A., BANG JENSEN B., KNUTSEN Ø., OLSEN A. & VILJUGREIN H. (2013). Seasonal increase in sea temperature triggers pancreas disease in Norwegian salmon farms. *J. Fish Dis.*, published online, DOI: 10.1111/jfd.12165

STENE A., HELLEBØ A., VILJUGREIN H., SOLEVÅG S.E. & ASPEHAUG V. (YEAR). First detection of salmonid alphavirus in liquid fat fractions leaking from dead PD infected salmon. Manuscript submitted to *J. Fish Dis.*, November 2013.

STORMOEN M., KRISTOFFERSEN A.B. & JANSEN P.A. (2013). Mortality related to pancreas disease in Norwegian farmed salmonid fish, *Salmo salar* L. and *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.*, **36**, 639–645.

TAKSDAL T., OLSEN A.B., BJERKAAS I., HJORTAAS M.J., DANNEVIG B.H., GRAHAM D.A. & MCLOUGHLIN M.F. (2007). Pancreas disease in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in Norway. *J. Fish Dis.*, **30**, 545–558.

TODD D., JEWHRST V.A., WELSH M.D., BORGHMANS B.J., WESTON J.H., ROWLEY H.M., MACKIE D.P. & MCLOUGHLIN M.F. (2001). Production and characterisation of monoclonal antibodies to salmon pancreas disease virus. *Dis. Aquat. Org.*, **46**, 101–108.

VILJUGREIN H., STAALSTRØM A., MOLVÆR J., URKE H.A. & JANSEN P.A. (2009). Integration of hydrodynamics into a statistical model on the spread of pancreas disease (PD) in salmon farming. *Dis. Aquat. Org.*, **88**, 35–44.

*
* *

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para el alfavirus de los salmónidos (puede consultarse la lista actualizada en la Tabla del final de este *Manual Acuático* o en la página web de la OIE:

<http://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/laboratorios-de-referencia/lista-des-laboratorios/>).

Para más información sobre el alfavirus de los salmónidos, por favor contacte con el
Laboratorio de Referencia de la OIE

VIROSIS DEL BAGRE DE CANAL

1. Ámbito de aplicación

A efectos de este capítulo, la virosis del bagre de canal (VIBC) (Inouye *et al.*, 1992) es la infección causada por el iridovirus del bagre de canal (VBC).

La VIBC es una causa importante de mortalidad en bagre de canal (*Pagrus major*) de piscifactoría y en más de otras 30 especies de peces marinos cuando viven en piscifactorías (Kawakami y Nakajima, 2002; Matsuoka *et al.*, 1996) pertenecientes a los órdenes Perciformes y Pleuronectiformes. El primer brote de VIBC se documentó en bagre de canal de piscifactoría en la isla de Shikoku, Japón, en 1990 (Inouye *et al.*, 1992). Desde entonces, la enfermedad ha causado mortalidades masivas en poblaciones de peces de piscifactoría en la parte occidental de Japón, principalmente en bagres de canal juveniles. Los peces afectados quedaron letárgicos, presentaron anemia intensa, petequias en las branquias y esplenomegalia (Inouye *et al.*, 1992; Jung *et al.*, 1997; Nakajima y Maeno, 1998). Esta enfermedad se caracteriza por la aparición de células aumentadas de tamaño que se tiñen intensamente con la solución de Giemsa en las observaciones histopatológicas del bazo, el corazón, el riñón, el intestino y las branquias de los peces infectados (Inouye *et al.*, 1992).

Recientemente, se ha comprobado que la enfermedad está causada no solo por el VBC (Inouye *et al.*, 1992; Jeong *et al.*, 2003; 2006; Kurita *et al.*, 2002; Kusuda *et al.*, 1994; Nakajima y Kurita, 2005; Nakajima y Sorimachi, 1994) y sus sinónimos (Chou *et al.*, 1998; Do *et al.*, 2004; 2005; Gibson-Kueh *et al.*, 2004; Jung *et al.*, 1997; Jung y Oh, 2000; Kim *et al.*, 2002; Kurita *et al.*, 2004; Miyata *et al.*, 1997; Nakajima y Kurita, 2005; Sudthongkong *et al.*, 2002b), sino también por el virus de la necrosis infecciosa del bazo y el riñón (VNIBR) (He *et al.*, 2001; Oseko *et al.*, 2004). Esta enfermedad se ha observado no solo en Japón sino también muy extendida en países del este y el sureste asiático (Chou *et al.*, 1998; Do *et al.*, 2004; 2005; Gibson-Kueh *et al.*, 2004; Jeong *et al.*, 2003; 2006; Jung *et al.*, 1997; Jung y Oh, 2000; Kim *et al.*, 2002; Kurita *et al.*, 2004; Miyata *et al.*, 1997; Nakajima y Kurita, 2005; Oseko *et al.*, 2004; Sudthongkong *et al.*, 2002b).

Existe un anticuerpo monoclonal (MAb) contra el VBC (Nakajima y Sorimachi, 1995) que puede detectar tanto el VBC como el VNIBR, pero no reconoce los ranavirus de los peces (familia: Iridoviridae) en pruebas anticuerpos inmunofluorescentes (IFAT) (Nakajima *et al.*, 1998; Oseko *et al.*, 2004).

Se utilizan muchos métodos diagnósticos útiles, como la observación de frotis de improntas teñidos o de cortes fijados, IFAT en la que se utilizan MAb, y reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) (Jeong *et al.*, 2004; Kurita *et al.*, 1998; Nakajima *et al.*, 1995; Nakajima *et al.*, 1998; Oshima *et al.*, 1996; 1998).

Existe una vacuna inactivada por formalina contra la VIBC que es eficaz y que se comercializa en Japón (Nakajima *et al.*, 1997; 1998).

2. Información sobre la enfermedad

2.1. Factores del agente

2.1.1. El agente patógeno, cepas del agente

Esta enfermedad está causada por la cepa Ehime-1 del iridovirus del bagre de canal (VBC) (Inouye *et al.*, 1992; Jeong *et al.*, 2003; 2006; Kurita *et al.*, 2002; Kusuda *et al.*, 1994; Nakajima y Kurita, 2005; Nakajima y Sorimachi, 1994) y otros genotipos del VBC, incluidos muchos virus que se consideran sinónimos del VBC (Chou *et al.*, 1998; Do *et al.*, 2004; 2005; Gibson-Kueh *et al.*, 2004; Jung *et al.*, 1997; Jung y Oh, 2000; Kim *et al.*, 2002; Miyata *et al.*, 1997; Nakajima y Kurita, 2005; Sudthongkong *et al.*, 2002b). También está causada por el virus de la necrosis infecciosa del bazo y del riñón (VNIBR) (Oseko *et al.*, 2004), que es uno de los virus relacionados con el VBC, pero claramente diferente. También se han documentado otros iridovirus que causan enfermedades similares en peces ornamentales de agua dulce (Sudthongkong *et al.*, 2002a). Estos virus son difíciles de distinguir genéticamente del VNIBR, y no se ha determinado si estas enfermedades deben incluirse en la VIBC. Recientemente, en la Rep. Pop. de China y en la Rep. de Corea se han notificado el iridovirus del cuerpo rojizo del rodaballo (IVCRR) (Shi *et al.*, 2004; 2010) y sus probables sinónimos (Do *et al.*, 2005; Jeong *et al.*, 2006), que están relacionados con el VBC y el VNIBR, aunque son claramente distintos. Se precisa más investigación para poder determinar si la enfermedad causada por el IVCRR debe incluirse o no en la VIBC. Todos estos agentes

patógenos pertenecen al quinto género de la familia Iridoviridae, y no es posible distinguirlos genéticamente ni biológicamente de los ranavirus de los peces, como el virus de la necrosis hematopoyética epizootica (VNHE), el iridovirus del bagre (IVB) y el iridovirus del mero (IVM = iridovirus del mero de Singapur [IVMS]) (Kasornchandra y Khongpradit, 1997; Murali *et al.*, 2002; Qin *et al.*, 2001; 2003; Shi *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2004), ninguno de los cuales es patógeno para el bagre de canal (Nakajima y Maeno, 1998).

2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

Desconocida.

2.1.3. Estabilidad del agente (métodos eficaces de inactivación)

Se inactiva sometiéndolo a 56°C durante 30 minutos; es sensible al éter y al cloroformo; se inactiva en presencia de formalina (0,1%); es estable en tejidos congelados a -80°C.

2.1.4. Ciclo de vida

No es aplicable.

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

En el caso de la infección por el VBC, se sabe que son susceptibles: el bagre de canal (*Pagrus major*), *Acanthopagrus schlegeli*, *Acanthopagrus latus*, *Evynnis japonica*, el medregal del Japón (*Seriola quinqueradiata*), el medregal coronado (*Seriola dumerili*), el medregal rabo amarillo (*Seriola lalandi*), el híbrido de medregal rabo amarillo x medregal del Japón (*S. lalandi* x *S. quinqueradiata*), el jurel dentón (*Pseudocaranx dentex*), el atún rojo (*Thunnus thynnus*), el carite oriental (*Scomberomorus niphonius*), el estornino (*Scomber japonicus*), el jurel japonés (*Trachurus japonicus*), *Oplegnathus fasciatus*, *Oplegnathus punctatus*, la cobia (*Rachycentron canadum*), *Trachinotus blochii*, *Parapristipoma trilineatum*, *Plectorhinchus cinctus*, *Lethrinus haematopterus*, *Lethrinus nebulosus*, *Girella punctata*, la gallineta (*Sebastes schlegeli*), *Pseudosciaena crocea*, el mero de pintas rojas (*Epinephelus akaara*), *Epinephelus septemfasciatus*, el mero malabárico (*Epinephelus malabaricus*), *Epinephelus bruneus*, *Epinephelus coioides*, *Epinephelus awoara*, el mero lutria (*Epinephelus tauvina*), *Epinephelus fuscoguttatus*, el mero guasa (*Epinephelus lanceolatus*), *Lateolabrax japonicus*, los serránidos (*Lateolabrax* sp.), la lubina (*Lates calcarifer*), el híbrido de lubina estriada x tilo blanco americano (*Morone saxatilis* x *M. chrysops*), la perca atruchada (*Micropterus salmoides*), el falso halibut del Japón (*Paralichthys olivaceus*), *Verasper variegatus* y *Takifugu rubripes*. En el caso de la infección por el VNIBR, se sabe que son susceptibles: *Siniperca chuatsi*, el corvinón ocelado (*Sciaenops ocellatus*), el mugil (*Mugil cephalus*) y *Epinephelus* sp.

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

Desde juveniles a adultos (la susceptibilidad de los juveniles en general es más alta que la de los adultos).

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

En el caso de la infección por el VBC, los peces del género *Oplegnathus* son más sensibles que otros.

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

Se observan células infectadas en el bazo, el riñón, el corazón, el intestino y las branquias.

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

Se desconoce.

2.2.6. Vectores

Se desconocen.

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

Se desconocen.

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mecanismos de transmisión

El principal mecanismo de transmisión del VBC es horizontal, por el agua. La transmisión vertical del VBC todavía no se ha estudiado.

2.3.2. Prevalencia

Esta enfermedad se observa en poblaciones de piscifactoría.

2.3.3. Distribución geográfica

Se ha notificado VIBC causada por el VBC y por el VNIBR no solo en Japón sino también en muchas otras partes de distintos países del este y el sureste asiático (Chinese Taipei, China [People's Rep. of], Hong Kong, Korea [Rep. of], Malaysia, Philippines, Singapore, and Thailand) (Chou *et al.*, 1998; Chua *et al.*, 1994; Do *et al.*, 2004; 2005; Gibson-Kueh *et al.*, 2004; Jeong *et al.*, 2003; 2006; Jung *et al.*, 1997; Jung y Oh, 2000; Kawakami y Nakajima, 2002; Kurita *et al.*, 2004; Miyata *et al.*, 1997; Oseko *et al.*, 2004; Sudthongkong *et al.*, 2002b).

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

En función de las especies de peces hospedadores, del tamaño de los peces, de la edad de los mismos, de la temperatura del agua y de otras condiciones del cultivo, la mortalidad oscila entre el 0% y el 100%. La morbilidad se desconoce.

2.3.5. Factores ambientales

Se han observado brotes principalmente en verano a temperaturas de 25°C y superiores.

2.4. Control y prevención

2.4.1. Vacunación

Actualmente se dispone de una vacuna comercial eficaz inactivada por formalina contra el VIBC para el bagre de canal (*Pagrus major*), el jurel dentón (*Pseudocaranx dentex*), Malabar grouper (*Epinephelus malabaricus*), *Epinephelus coioides*), el mero malabático (*Epinephelus malabaricus*), *Epinephelus coioides* y otras especies de peces pertenecientes al género *Seriola* de Japón. Es difícil proteger a peces del género *Oplegnathus* mediante vacunación.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

No disponible.

2.4.3. Inmunoestimulación

En estudio.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

En estudio.

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

En estudio.

2.4.6. Agentes bloqueantes

Se desconocen.

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

No se dispone de datos.

2.4.8. Prácticas generales de manejo

Para reducir las pérdidas debidas al VIBC se utilizan varias prácticas generales de manejo, como las siguientes: introducir peces libres de agentes patógenos, implementar prácticas de higiene en las

piscifactorías y evitar prácticas que puedan disminuir la calidad del agua y/o aumentar el estrés, como el hacinamiento o la sobrealimentación.

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

Deben escogerse peces moribundos.

3.2. Conservación de las muestras para su envío

Se guardan los peces a 4°C si van a ser utilizados en un plazo de 24 horas (o a –80°C si se va a tardar más [hasta varios años]).

3.3. Combinación de varias muestras

Pueden combinarse varias muestras de tejidos (bazo y riñón) que contenga no más de cinco peces juveniles cada una (de menos de 3 cm).

3.4. Órganos y tejidos de elección

Aunque pueden utilizarse branquias y vísceras como el bazo, el corazón, el riñón, el hígado y el intestino, también se recomienda tomar muestras de tejidos de bazo y/o de riñón; el bazo en concreto puede ser el órgano más adecuado para la preparación de frotis que se vayan a utilizar en la IFAT.

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

Los peces muertos con signos de descomposición tisular avanzada no serán adecuados para ningún tipo de análisis.

4. Métodos de diagnóstico

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

Los peces afectados se vuelven letárgicos y presentan anemia extrema, petequias en las branquias y aumento de tamaño del bazo.

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Los peces enfermos nadan de forma poco enérgica y presentan movimientos respiratorios anómalos o llamativos causados por la anemia.

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

Palidez en las branquias y aumento de tamaño del bazo.

4.2.2. Bioquímica clínica

Hematocrito bajo.

4.2.3. Anatomopatología microscópica

Véanse los métodos de preparación de frotis (apartado 4.2.5) y la microscopía electrónica/citopatología (apartado 4.2.6). La anatomopatología microscópica debería confirmar la presencia de células anormalmente aumentadas de tamaño en tejidos como el bazo, el corazón, el riñón, el intestino o las branquias.

4.2.4. Preparaciones húmedas

Ninguna.

4.2.5. Frotis

Confirman la presencia de células anormalmente aumentadas de tamaño en frotis de bazo preparados por impronta y teñidos con solución de Giemsa.

4.2.6. Cortes fijados

Confirman la presencia de células anormalmente aumentadas de tamaño, habitualmente basófilas en cortes de bazo teñidos con hematoxilina-eosina.

4.2.7. Microscopía electrónica/citopatología

Confirma la presencia de viriones (200–240 nm de diámetro) en las células aumentadas de tamaño.

4.3. Métodos de detección e identificación del agente**4.3.1. Métodos directos de detección****4.3.1.1. Métodos microscópicos***4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas*

Ninguna.

4.3.1.1.2. Frotis

El examen de frotis realizados por impronta y fijados en acetona tomados de peces enfermos pone de manifiesto células del bazo, el corazón o el riñón anormalmente aumentadas de tamaño. Estas células aumentadas de tamaño reaccionan frente a MAb anti-VBC (M10) en la prueba de la detección de antígeno basada en anticuerpos (IFAT) (Nakajima *et al.*, 1999).

4.3.1.1.3. Cortes fijados

El examen de cortes histológicos de peces enfermos puede poner de manifiesto células anormalmente aumentadas de tamaño del bazo, el corazón, el riñón, el hígado, el intestino o las branquias. Estas células aumentadas de tamaño puede reaccionar frente a MAb anti-VBC en la prueba de la inmunohistoquímica. Sin embargo, este método todavía no está del todo validado.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

El aislamiento del VBC y del VNIBR de peces marinos se lleva a cabo utilizando la línea celular de la aleta de ronco catire (GF) (Oseko *et al.*, 2004); el aislamiento de los virus de peces de agua dulce, como el gurami, es difícil. Los tejidos de bazo y/o riñón de peces enfermos son muestras adecuadas. Deben cultivarse células en medio basal de Eagle (BME) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% a 25°C en una incubadora de temperatura controlada para garantizar el posterior éxito en el aislamiento del VBC. Pueden obtenerse virus para ser utilizados como controles positivos en el Laboratorio de Referencia de la OIE para la VIBC. Como controles negativos se utilizan células no infectadas. Tras el desarrollo de efecto citopático (ECP) por parte del virus, la identificación del virus se llevaría a cabo utilizando métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos (IFAT) y/o basados en el ácido nucleico (PCR).

4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

Inoculación de monocapas celulares

- i) Tras el procedimiento de extracción de virus descrito en el Capítulo 2.3.0, apartado A.2.2.2, se prepara otra dilución decimal de sobrenadante de homogenado de bazo a 1/10 y se transfiere un volumen adecuado de cada una de las dos diluciones a monocapas celulares de 24 horas de edad. Se inoculan al menos 2 cm² de la monocapa celular drenada con 100 µl de cada dilución.
- ii) Se deja adsorber durante 0,1-1 hora a 25°C y, sin retirar el inóculo, se añade el medio de cultivo celular tamponado a pH 7,6 y suplementado con FBS al 2% (1 ml/pocillo en el caso de las placas de cultivo celular de 24 pocillos), y se incuba a 25°C utilizando una incubadora de temperatura controlada.

Seguimiento de la incubación

- i) Se sigue el curso de la infección en controles positivos y otros cultivos celulares inoculados mediante el examen microscópico diario a 40-100 aumentos durante 10 días. Se recomienda utilizar un microscopio de contraste de fases.
- ii) Si aparece ECP en los cultivos celulares inoculados con diluciones de los homogenados problema, deben llevarse a cabo procedimientos de identificación de inmediato (véase abajo).

Si se está implementando un programa de vigilancia/control sanitario de los peces, tal vez tengan que tomarse medidas para suspender el estado sanitario aprobado en la unidad de producción y/o en la zona (si se aprobó previamente) del cual proceda la muestra positiva al virus. La suspensión del estado aprobado se mantendrá hasta que se demuestre que el virus en cuestión no es VBC ni VNIBR.
- iii) Si no aparece ECP en los cultivos inoculados (a pesar del avance normal del ECP en los controles del virus) tras 10 días de incubación, los cultivos inoculados debe subcultivarse durante 7 días más. En el caso de que el control del virus no desarrolle ECP, el proceso deberá repetirse con células susceptibles nuevas y nuevos lotes de muestras.

Procedimientos para el subcultivo

- i) Se recogen alícuotas de medio de cultivo celular de todas las monocapas inoculadas con diluciones de cada sobrenadante de los homogenados problema.
- ii) Se inoculan monocapas celulares como se ha descrito antes (Inoculación de monocapas celulares, pasos i e ii).
- iii) Se incuban y se les realiza un seguimiento como se ha descrito antes (Inoculación de monocapas celulares, pasos i e ii y Seguimiento de la incubación, pasos i e ii).

Si no aparece ECP, la prueba podría ser declarada negativa.

4.3.1.2.2. Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos (IFAT) a partir de frotis preparados por impronta

Las muestras a analizar son frotis preparados por impronta de bazo de peces afectados.

Se utiliza un frotis preparado por impronta de bazo de peces no infectados como control negativo, y un frotis preparado por impronta de bazo de peces en los que se ha confirmado que están infectados por el VBC como control positivo.

Pueden obtenerse controles positivos (frotis preparados por impronta fijados y secados al aire de bazo de peces infectados) en el Laboratorio de Referencia de la OIE. Se utilizan improntas de bazos de peces sanos como controles negativos.

Procedimiento analítico

- i) Se sangra el pez por completo.
- ii) Se preparan improntas de bazo en portas de vidrio limpios.
- iii) Se guardan los trozos de bazo a 4°C junto con los otros órganos necesarios para el aislamiento del virus por si más tarde se necesitan.
- iv) Se dejan secar las improntas al aire durante 20 minutos.
- v) Se fijan las improntas con acetona fría.
- vi) Se tratan las improntas con la solución de MAb (M10) durante 30 minutos a 37°C en una cámara húmeda.
- vii) Se enjuagan tres veces con PBS.
- viii) Se incuban las improntas durante 30 minutos a 37°C en una cámara húmeda con una solución de anticuerpos específicos anti-ratón conjugados con ITCF preparada según las instrucciones del fabricante. Estos anticuerpos conjugados a ITCF suelen ser de conejo o de cabra.
- ix) Se enjuagan tres veces con PBS.
- x) Se montan los portas con cubreobjetos utilizando solución salina de glicerol antes de la observación al microscopio.

- xi) Se examinan con luz UV directa utilizando un microscopio con oculares de 10 aumentos y objetivos de 20-40 aumentos. Antes de iniciar la observación debe observarse que los controles positivos y negativos dan los resultados esperados.

Niveles de validación:

- Especificidad y sensibilidad: Los MAb M10 pueden detectar tanto el VBC como el VNIBR (31) pero no detectan ranavirus. La reactividad de los MAb contra el IVCRR todavía no está confirmada.
- Método de referencia: Las células anormalmente aumentadas de tamaño con fluorescencia fuerte se confirman mediante IFAT.

Interpretación de los resultados:

- Si la prueba es positiva, los peces de los que se tomaron las muestras se considerarán infectados por el VBC o el VNIBR y por la enfermedad VIBC. Si la prueba es negativa, se procesan las muestras de órganos guardadas a 4°C para el aislamiento del virus en cultivos celulares como se ha descrito antes.

Se dispone de reactivos en el Laboratorio de Referencia de la OIE y en empresas. El Laboratorio de Referencia de la OIE puede suministrar el MAb M10.

4.3.1.2.3. Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos (IFAT, ELISA, etc.) a partir del cultivo celular

El VBC (y probablemente el VNIBR también) no puede identificarse mediante pruebas de neutralización porque los antisueros generados por la inmunización de conejos tienen pocos anticuerpos neutralizantes.

4.3.1.2.3.1 Prueba de la inmunofluorescencia indirecta

Las muestras que tienen que tomarse para el análisis son monocapas celulares infectadas fijadas en acetona que hayan presentado ECP.

Se utiliza una monocapa celular no infectada como control negativo, y se utiliza una monocapa celular infectada por el VBC como control positivo.

La IFAT se lleva a cabo directamente tras el aislamiento del virus en cultivo celular.

- i) Se preparan monocapas de células sobre cubreobjetos hasta alcanzar aproximadamente un 18% de confluencia, que normalmente se logra en un plazo de 24 horas de incubación a 25°C. El contenido en FBS del medio de cultivo celular se reduce al 2%.
- ii) Cuando las monocapas celulares están listas, se inocula la suspensión de virus problema realizando a diluciones decimales seriadas añadiéndola directamente a los pocillos del cultivo celular o a los frascos.
- iii) Se incuba a 25°C durante 24–72 horas.
- iv) Cuando aparece ECP, se retira el medio de cultivo celular y se enjuaga tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se secan al aire las células infectadas y se fijan con acetona fría (guardada a -20°C) durante 10 minutos.
- v) Se dejan secar las monocapas celulares al aire durante al menos 30 minutos y se procesan de inmediato o se congelan a -20°C.
- vi) Se prepara una solución de MAb M10 a la dilución previamente determinada.
- vii) Se tratan las monocapas celulares con la solución de MAb durante 30 minutos a 37°C en una cámara húmeda.
- viii) Se enjuagan las células tres veces durante 5 minutos con PBS.
- ix) Se incuban con un anticuerpo específico anti-ratón conjugado a isotiocianato de fluoresceína (ITCF) (se prepara según las instrucciones del fabricante) durante 30 minutos a 37°C en la oscuridad en una cámara húmeda.
- x) Se enjuagan tres veces durante 5 minutos con PBS.
- xi) Se examinan las monocapas celulares tratadas sobre placas de plástico de inmediato, o se montan los cubreobjetos utilizando solución salina con glicerol a pH 8,5 antes de la observación microscópica.

- xii) Se examinan con luz UV incidente utilizando un microscopio con oculares de 10 aumentos y objetivos de 20-40 aumentos. Antes de iniciar la observación debe observarse que los controles positivos y negativos dan los resultados esperados. Los resultados positivos vienen indicados por una fluorescencia difusa por todo el citoplasma.

Niveles de validación:

- Especificidad y sensibilidad: Los MAb M10 pueden detectar tanto el VBC como el VNIBS (31) pero no detectan ranavirus. La reactividad de los MAb contra el IVCRR todavía no está confirmada.
- Método de referencia: el ECP se caracteriza por muchas células aumentadas de tamaño y el virus se confirma por el ECP mediante IFAT.

Interpretación de los resultados:

- El virus aislado es VBC o VNIBR y la enfermedad es VIBC.

Disponibilidad de la prueba: Se dispone de reactivos y material biológico en el Laboratorio de Referencia de la OIE para la VIBC y en empresas. El Laboratorio de Referencia de la OIE puede suministrar el MAb M10.

4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

4.3.1.2.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa

Las muestras a analizar son bazo de peces afectados o sobrenadantes de cultivos celulares que hayan desarrollado ECP.

Como control negativo se utiliza ADN extraído del bazo de peces no infectados o ADN extraído del sobrenadante de un cultivo celular no infectado. Como control positivo se utiliza ADN extraído del bazo de peces que se haya confirmado que están infectados por el VBC o ADN extraído del sobrenadante de un cultivo celular infectado. Se escogen los controles en función de los tipos de muestras que se vayan a analizar.

Extracción de ADN de muestras de órganos o sobrenadante de cultivos celulares de virus aislados

Las muestras de peces o sobrenadantes de cultivo celular se preparan como describen Kurita *et al.* (1998) para la extracción de ADN. Como control positivo se utiliza órgano que previamente se haya confirmado que está afectado por el VBC (o el VNIBR), o bien sobrenadante de cultivos celulares infectados por el VBC (o VNIBR). Como control negativo se utilizan órganos de peces sanos o sobrenadantes de cultivos celulares no infectados.

Amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa

El VBC y el VNIBR tienen grandes genomas de ADN bicatenario. Se utiliza un conjunto de cebadores, uno directo, 1-F (5'-CTC-AAA-CAC-TCT-GGC-TCA-TC-3') y uno inverso, 1-R (5'-GCA-CCA-ACA-CAT-CTC-CTA-TC-3') para la amplificación de la secuencia génica (570 bases) tanto del ADN del VBC como del ADN del VNIBR mediante PCR (Kurita *et al.*, 1998). (Obsérvese que los cebadores previos de la OIE específicos del VBC, 4-F [5'-CGG-GGG-CAA-TGA-CGA-CTA-CA-3'] y 4-R [5'-CCG-CCT-GTG-CCT-TTT-CTG-GA-3', cuyo producto tiene un tamaño esperable de 568 pb, no amplifican el ADN del VNIBR [Oseko *et al.*, 2004]). Ambos conjuntos de cebadores han sido descritos por Kurita *et al.* (1998).

El ADN extraído (1 µl) se añade al tampón polimerasa Taq que contiene cada cebador 1 mM, desoxinucleótido trifosfato 200 mM, y 1,25 U de polimerasa ADN Ex Taq en tampón 20 mM para PCR Mg²⁺. Esta mezcla se incuba en un termociclador automático programado para 30 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 58°C durante 60 segundos, y 72°C durante 60 segundos, y finalmente se mantiene a 72°C durante 5 minutos. El ADN amplificado (570 pb) se analiza mediante electroforesis en gel de agarosa.

Niveles de validación:

- Especificidad y sensibilidad: el conjunto de cebadores 1-F y 1-R permite amplificar tanto ADN de VBC como de VNIBR con una sensibilidad suficiente. El conjunto previo de cebadores, 4-F y 4-R también tiene una sensibilidad suficiente para el VBC, pero no puede utilizarse para amplificar ADN del VNIBR. La reactividad de estos conjuntos de cebadores para el IVCRR todavía no se ha confirmado.

- Método de referencia: el producto de la PCR del tamaño esperado se confirma claramente mediante electroforesis cuando se utiliza el conjunto de cebadores 1-F y 1-R.

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo en la PCR utilizando el conjunto de cebadores 1-F y 1-R, y con una especificidad confirmada por secuenciación, indica la presencia del VBC o el VNIBR y que la enfermedad es la VIBC. Un resultado positivo en la PCR opcional utilizando el conjunto previo de cebadores, 4-F y 4-R, y ejecutada junto con la PCR previa, indica que el virus es el VBC y que la enfermedad es la VIBC y está causada por el VBC. Un resultado negativo con esta PCR opcional secundaria indica que el virus es el VNIBR y que la enfermedad es VIBC y está causada por el VNIBR.

Disponibilidad de la prueba: Se dispone de reactivos en el Laboratorio de Referencia de la OIE y en fuentes comerciales.

4.3.1.2.4. Purificación del agente

Se lleva a cabo por ultracentrifugación en gradiente de CsCl (10–35% p/p). La gravedad de la banda de virión resultante es de aproximadamente 1,25–1,3 g ml⁻¹.

4.3.2. Métodos serológicos

Todavía no se han desarrollado métodos serológicos en los que se utilice suero de peces afectados.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

Como ejemplo, los métodos actualmente disponibles para la vigilancia dirigida de la VIBC se detallan en la Tabla 5.1. Las denominaciones utilizadas en la Tabla indican: a = el método es el recomendado por razones de disponibilidad, utilidad y especificidad y sensibilidad de diagnóstico; b = el método es estándar, con buena sensibilidad y especificidad de diagnóstico; c = el método tiene aplicación en algunas situaciones, pero el coste, la precisión u otros factores limitan seriamente su aplicación; y d = el método no se recomienda actualmente para este fin. Esta clasificación es de alguna forma subjetiva ya que la idoneidad implica cuestiones de fiabilidad, sensibilidad, especificidad y utilidad. Aunque no todas las pruebas incluidas en las categorías a o b se han sometido a estandarización y validación formales, su naturaleza sistemática y el hecho de que se hayan usado generalmente sin resultados dudosos las hace aceptables.

Tabla 5.1. Métodos para la vigilancia dirigida y el diagnóstico

Método	Vigilancia dirigida				Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
	Larvas	PL	Juveniles	Adultos		
Signos macroscópicos	d	d	d	d	b	d
Bioanálisis (aislamiento del virus en cultivo celular) e identificación mediante IFAT o PCR)	c	c	c	c	a	a
MO directa	d	d	c	d	b	d
Histopatología	d	d	d	d	b	d
ME de transmisión	d	d	d	d	b	d
Pruebas basadas en anticuerpos(IFAT) con virus aislados o frotis preparados por impronta	c	c	c	c	a	a/b
PCR	c	c	c	c	a	a
Secuenciación	d	d	d	d	a	a

PLs = postlarvas; IFAT = prueba de inmunofluorescencia indirecta; PCR = reacción en cadena de la polimerasa; MO = microscopía óptica; ME = microscopía electrónica.

6. Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de la virosis del bagre de canal

No existe ningún método de detección establecido para la vigilancia, porque el estado de portador del agente todavía no se ha estudiado. Los métodos provisionales serían el aislamiento del virus seguido de IFAT o PCR anidada (Choi *et al.*, 2006).

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

La presencia de VBC o VNIBR debe sospecharse si se cumple al menos uno de los siguientes criterios:

- 1) Presencia de signos clínicos típicos y confirmación de células anormalmente aumentadas de tamaño en frotis preparados por impronta o cortes de tejido.
- 2) Presencia de signos clínicos típicos y confirmación de la presencia de viriones en células anormalmente aumentadas de tamaño por microscopía electrónica.
- 3) Aislamiento del virus con ECP específico.
- 4) Presencia de células positivas en la IFAT en frotis preparados por impronta.

7.2. Definición de caso confirmado

La presencia de VBC o VNIBR debe considerarse confirmada si, además de los criterios de 7.1, se cumple uno o más de los siguientes:

- 1) Aislamiento del virus con ECP específico y resultado positivo en la IFAT utilizando cultivos celulares infectados.
- 2) Aislamiento del virus con ECP específico y resultado positivo en la PCR utilizando como molde ADN extraído de virus aislado.
- 3) Resultado positivo en la PCR utilizando como molde ADN de órganos afectados.
- 4) Presencia de células anormalmente aumentadas de tamaño típicas que den positivo en la IFAT con frotis preparados por impronta.

8. Bibliografía

CHOI S.K., KWON S.R., NAM Y.K., KIM S.K. & KIM K.H. (2006). Organ distribution of red sea bream iridovirus (VBC) DNA in asymptomatic yearling and fingerling rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) and effects of water temperature on transition of VBC into acute phase. *Aquaculture*, **256**, 23–26.

CHOU H.Y., HSU C.C. & PENG T.Y. (1998). Isolation and characterization of a pathogenic iridovirus from cultured grouper (*Epinephelus* sp.) in Taiwan. *Fish Pathol.*, **33**, 201–206.

DO J.W., CHA S.J., KIM J.S., AN E.J., PARK M.S., KIM J.W., KIM Y.C., PARK M.A. & PARK J.W. (2005). Sequence variation in the gene encoding the major capsid protein of Korean fish iridoviruses. *Arch. Virol.*, **150**, 351–359.

DO J.W., MOON C.H., KIM H.J., KO M.S., KIM S.B., SON J.H., KIM J.S., AN E.J., KIM M.K., LEE S.K., HAN M.S., CHA S.J., PARK M.S., PARK M.A., KIM Y.C., KIM J.W. & PARK J.W. (2004). Complete genomic DNA sequence of rock bream iridovirus. *Virology*, **325**, 351–363.

GIBSON-KUEH S., NGOH-LIM G.H., NETTO P., KURITA J., NAKAJIMA K. & NG M.L. (2004). A systematic iridoviral disease in mullet, *Mugil cephalus* L. and tiger grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* Forsskal: a first report and study. *J. Fish Dis.*, **27**, 693–699.

HE J.G., DENG M.S., WENG P., LI Z., ZHOU S.Y., LONG Q.X., WANG X.Z., & CHANG S.M. (2001). Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus. *Virology*, **291**, 126–139.

- INOUE K., YAMANO K., MAENO Y., NAKAJIMA K., MATSUOKA M., WADA Y. & SORIMACHI M. (1992). Iridovirus infection of cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathol.*, **27**, 19–27.
- JEONG J.B., JUN J.L., YOO M.H., KIM M.S., KOMISAR J.L. & JEONG H.D. (2003). Characterization of the DNA nucleotide sequences in the genome of red sea bream iridoviruses isolated in Korea. *Aquaculture*, **220**, 119–133.
- JEONG J.B., KIM H.Y., KIM H.K., CHUNG J.-K., KOMISAR J.L. & JEONG H.D. (2006). Molecular comparison of iridoviruses isolated from marine fish cultured in Korea and imported from China. *Aquaculture*, **255**, 105–116.
- JEONG J.B., PARK K.H., KIM H.Y., HONG S.H., CHUNG J.-K., KOMISAR J.L. & JEONG H.D. (2004). Multiplex PCR for the diagnosis of red sea bream iridoviruses isolated in Korea. *Aquaculture*, **235**, 139–152.
- JUNG S., MIYAZAKI T., MIYATA M., DANAYADOL Y. & TANAKA S. (1997). Pathogenicity of iridovirus from Japan and Thailand for the red sea bream *Pagrus major* in Japan, and histopathology of experimentally infected fish. *Fisheries Sci.*, **63**, 735–740.
- JUNG S.J. & OH M.J. (2000). Iridovirus-like infection associated with high mortalities of striped beakperch, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck et Schlegel), in southern coastal areas of the Korean peninsula. *J. Fish Dis.*, **23**, 223–226.
- KASORNCHANDRA J. & KHONGPRADIT R. (1997). Isolation and preliminary characterization of a pathogenic iridovirus in nursing grouper, *Epinephelus marabarcus*. In: Diseases in Asian Aquaculture III, Flegel T.W. & MacRae I.H., eds. Manila, Philippines, 61–66.
- KAWAKAMI H. & NAKAJIMA K. (2002). Cultured fish species affected by red sea bream iridoviral disease from 1996 to 2000. *Fish Pathol.*, **37**, 45–47.
- KIM Y.J., JUNG S.J., CHOI T.J., KIM H.R., RAJENDRAN K.V. & OH M.J. (2002). PCR amplification and sequence analysis of irido-like virus infecting fish in Korea. *J. Fish Dis.*, **25**, 121–124.
- KURITA J., NAKAJIMA K., HIRONO I. & AOKI T. (1998). Polymerase chain reaction (PCR) amplification of DNA of red sea bream iridovirus (VBC) *Fish Pathol.*, **33**, 17–23.
- KURITA J., NAKAJIMA K., HIRONO I. & AOKI T. (2002). Complete genome sequencing of red sea bream iridovirus (VBC). *Fisheries Sci.*, **68** (suppl. II), 1113–1115.
- KURITA J., NGOH-LIM G.H., GIBSON-KUEH S., DE LA PENNA L., CHUAH T.T., PALAMISAMY V., SANO M., OSEKO N., MAENO Y. & NAKAJIMA K. (2004). Phylogenetic analysis of red sea bream iridovirus-like viruses in Southeast Asia. In: 7th Asian Fisheries Forum 04 Abstracts, Penang, Malaysia, 381.
- KUSUDA R., NAGATO K. & KAWAI K. (1994). Characteristics of an iridovirus isolated from red sea bream, *Pagrus major*. *Suisanzoshoku*, **42**, 151–156.
- MATSUOKA S., INOUE K. & NAKAJIMA K. (1996). Cultured fish species affected by red sea bream iridoviral disease from 1991 to 1995. *Fish Pathol.*, **31**, 233–234.
- MIYATA M., MATSUNO K., JUNG S.J., DANAYADOL Y. & MIYAZAKI T. (1997). Genetic similarity of iridoviruses from Japan and Thailand. *J. Fish Dis.*, **20**, 127–134.
- MURALI S., WU M.F., GUO I.C., CHEN S.C. YANG H.W & CHANG C.Y. (2002). Molecular characterization and pathogenicity of a grouper iridovirus (GIV) isolated from yellow grouper, *Epinephelus awoara* (Temminck & Schlegel). *J. Fish Dis.*, **25**, 91–100.
- NAKAJIMA K. & KURITA J. (2005). Red sea bream iridoviral disease. *Uirusu.*, **55**, 115–126.
- NAKAJIMA K. & MAENO Y. (1998). Pathogenicity of red sea bream iridovirus and other fish iridoviruses to red sea bream. *Fish Pathol.*, **33**, 143–144.
- NAKAJIMA K., MAENO Y., FUKUDOME M., FUKUDA Y., TANAKA S., MATSUOKA S. & SORIMACHI M. (1995). Immunofluorescence test for the rapid diagnosis of red sea bream iridovirus infection using monoclonal antibody. *Fish Pathol.*, **30**, 115–119.
- NAKAJIMA K., MAENO Y., HONDA A., YOKOYAMA K., TOORIYAMA T. & MANABE S. (1999). Effectiveness of a vaccine against red sea bream iridoviral disease in a field trial test. *Dis. Aquat. Org.*, **36**, 73–75.

NAKAJIMA K., MAENO Y., KURITA J. & INUI Y. (1997). Vaccination against red sea bream iridoviral disease in red sea bream. *Fish Pathol.*, **32**, 205–209.

NAKAJIMA K., MAENO Y., YOKOYAMA K., KAJI C. & MANABE S. (1998). Antigen analysis of red sea bream iridovirus and comparison with other fish iridoviruses. *Fish Pathol.*, **33**, 73–78.

NAKAJIMA K. & SORIMACHI M. (1994). Biological and physico-chemical properties of the iridovirus isolated from cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathol.*, **29**, 29–33.

NAKAJIMA K. & SORIMACHI M. (1995). Production of monoclonal antibodies against red sea bream iridovirus. *Fish Pathol.*, **30**, 47–52.

OSEKO N., CHUAH T.T., PALAMISAMY V., MAENO Y. & KURITA J. (2004). Iridovirus isolated from diseased sea bass *Lates calcarifer* and red drum *Sciaenops ocellatus* causing mass mortality in Malaysia. *In: 7th Asian Fisheries Forum 04 Abstracts*, Penang, Malaysia, 127.

OSHIMA S., HATA J., HIRASAWA N., OHTAKA T., HIRONO I., AOKI T. & YAMASHITA S. (1998). Rapid diagnosis of red sea bream iridovirus infection using the polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, **32**, 87–90.

OSHIMA S., HATA J., SEGAWA C., HIRASAWA N. & YAMASHITA S. (1996). A method for direct DNA amplification of uncharacterized DNA viruses and for development of a viral polymerase chain reaction assay: Application to the red sea bream iridovirus. *Anal. Biochem.*, **242**, 15–19.

QIN Q.W., CHANG S.F., NGOH-LIM G.H., GIBSON-KUEH S., SHI C. & LAM T.J. (2003). Characterization of a novel ranavirus isolated from grouper *Epinephelus tauvina*. *Dis. Aquat. Org.*, **53**, 1–9.

QIN Q.W., LAM T.J., SHEN H., CHANG S.F., NGOH G.H. & CHEN C.L. (2001). Electron microscopic observations of a marine fish iridovirus isolated from brown-spotted grouper, *Epinephelus tauvina*. *J. Virol. Methods*, **98**, 17–24.

SHI C.Y., JIA K.T., YANG B. & HUANG J. (2010). Complete genome sequence analysis of a Megalocytivirus (family Iridoviridae) associated with turbot mortality in China. *Virol. J.*, **7**, 159.

SHI C.Y., WANG Y.G., YANG S.L., HUANG J. & WANG Q.Y. (2004). The first report of an iridovirus-like agent infection in farmed turbot, *Scophthalmus maximus*, in China. *Aquaculture*, **236**, 11–25.

SONG W.J., QIN Q.W., QIU J., HUANG C.H., WANG F. & HEW C.L. (2004). Functional genomic analysis of Singapore grouper iridovirus: Complete sequence determination and proteomic analysis. *J. Virol.*, **78**, 12576–12590.

SUDTHONGKONG C., MIYATA M. & MIYAZAKI T. (2002a). Iridovirus disease in two ornamental tropical freshwater fishes: African lampeye and dwarf gourami. *Dis. Aquat. Org.*, **48**, 163–173.

SUDTHONGKONG C., MIYATA M. & MIYAZAKI T. (2002b). Viral DNA sequences of genes encoding the ATPase and the major capsid protein of tropical iridovirus isolates which are pathogenic to fishes in Japan, South China Sea and Southeast Asian countries. *Arch. Virol.*, **147**, 2089–2109.

*
* *

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la Virosis del bagre de canal (puede consultarse en la Tabla del final de este *Manual Acuático* o en la página web de la OIE: www.oie.int).

VIREMIA PRIMAVERAL DE LA CARPA

1. Ámbito de aplicación

La viremia primaveral de la carpa (VPC) es una infección por un rhabdovirus capaz de inducir una viremia hemorrágica y contagiosa aguda en varias especies de carpa y en algunos ciprinidos e icatalúridos. A efectos de este capítulo, la VPC se considera una infección por el virus de la viremia primaveral de la carpa (VVPC). Pueden hallarse referencias importantes en las revisiones de Wolf (1988), Ahne *et al.* (2002) y Dixon (2008).

2. Información sobre la enfermedad

2.1. Factores del agente

2.1.1. El agente patógeno, cepas del agente

El agente etiológico de la VPC es el virus de la viremia primaveral de la carpa (VVPC), una especie del género *Vesiculovirus*, perteneciente a la familia Rhabdoviridae (Carstens, 2010). El genoma vírico es un ARN no segmentado, de sentido negativo y monocatenario, que contiene 11.109 nucleótidos que codifican cinco proteínas en el siguiente orden: una nucleoproteína (N), una fosfoproteína (P), una proteína de la matriz (M), una glucoproteína (G) y una ARN polimerasa dependiente de ARN (L). El genoma no contiene un gen no virión (NV) entre los genes G y L, como ocurre en ciertos rhabdovirus del género *Novirhabdovirus* (Ahne *et al.*, 2002). La cepa tipo del VVPC se encuentra en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC VR-1390). Se han enviado al Genbank (número de acceso U18101 por Björklund *et al.* [1996] y número de acceso AJ318079 por Hoffmann *et al.* [2002]) dos secuencias genómicas completas de la cepa tipo. La secuencia del genoma completo de cepas de China (Rep. Pop. de) también se ha depositado en Genbank (número de acceso DQ097384 por Teng *et al.* [2007] y número de acceso EU177782 por Zhang *et al.* [2009]).

Stone *et al.* (2003) utilizaron un análisis de la secuencia de una región de 550 nucleótidos del gen G para comparar 36 cepas de distintas especies de peces y ubicaciones geográficas previamente identificadas mediante serología como VVPC o rhabdovirus de alevín de lucio (RVAL). El análisis puso de manifiesto que las cepas podían clasificarse en cuatro genogrupos claramente distintos y que todas las cepas del VVPC podían asignarse al genogrupo I, compartiendo menos de un 61% de identidad de nucleótidos con virus de los otros tres genogrupos. El genogrupo II estaba formado por una sola cepa de la carpa herbívora, previamente identificada por serología como RVAL; el genogrupo III estaba formado por la cepa RVAL de referencia, y el genogrupo IV estaba formado por un gran número de cepas sin clasificar y de cepas previamente identificadas como RVAL. El último genogrupo se denominó grupo del rhabdovirus de la tenca (RVTen) por la especie de la cual se aisló el primer miembro. Otros análisis también pusieron de manifiesto que el genogrupo I del VVPC se podía subdividir en al menos cuatro subserogrupos. Ahne *et al.* (1998) observaron que los dos virus podían también diferenciarse por una prueba de protección de la ribonucleasa utilizando una sonda para el gen G, lo cual sugiere que existen diferencias genéticas entre ambos virus.

Anticuerpos dirigidos contra el VVPC reaccionan de forma cruzada en distintos grados con miembros de los otros tres genogrupos, lo cual indica que los virus poseen antígenos en común, aun siendo genéticamente distintos. Se ha observado que los virus comparten determinantes antigénicos comunes en las proteínas G, N y M, pero que pueden diferenciarse mediante pruebas de neutralización (Jørgensen *et al.*, 1989).

2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

Se ha observado que el virus permanece viable fuera del hospedador durante 5 semanas en agua de río a 10°C, durante más de 6 semanas en barro de estanque a 4°C y solo 4 días en barro de estanque a 10°C (Ahne, 1976).

2.1.3. Estabilidad del agente

El virus se inactiva a 56°C en 30 minutos, a pH 12 en 10 minutos, y a pH 3 en 2 horas (Ahne, 1986). Los agentes oxidantes, el dodecilsulfato de sodio, los detergentes no iónicos y los disolventes lipídicos son eficaces para la inactivación del VVPC. Los siguientes desinfectantes también son eficaces para la inactivación: formalina al 3% durante 5 minutos, hidróxido de sodio al 2% durante 10 minutos, 540 mg/litro de cloro durante 20 minutos, 200-250 ppm (partes por millón) de compuestos yodados durante 30 minutos, 100 ppm de cloruro de benzalconio durante 20 minutos, 350 ppm de alquiltolueno durante 20 minutos, 100 ppm de gluconato de clorhexidina durante 20 minutos y 200 ppm de cresol durante 20 minutos (Ahne, 1982; Ahne y Held, 1980; Kiryu *et al.*, 2007). El virus se puede guardar durante varios meses cuando se congela en un medio que contenga un 2-5% de suero, y es más estable a temperaturas bajas, con poca pérdida de título cuando se guarda durante 1 mes a -20°C, o durante 6 meses a -30 o -74°C (Ahne, 1976; Kinkelin y Le Berre, 1974). El virus es estable tras cuatro ciclos de congelación (-30°C) y descongelación en un medio que contenga un 2% de suero (Kinkelin y Le Berre, 1974).

2.1.4. Ciclo de vida

El virus parece entrar en el hospedador por las branquias. A continuación tiene lugar una viremia y el virus se propaga rápidamente al hígado, el riñón, el bazo y el tracto alimentario. El virus puede detectarse en las heces y también se excreta al agua por las heces y la orina.

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Se han registrado infecciones naturales por VPC en las siguientes especies de ciprínidos: carpa común (*Cyprinus carpio carpio*) y carpa koi (*Cyprinus carpio koi*), carpín (*Carassius carassius*), carpa plateada (*Hypophthalmichthys molitrix*), carpa cabezona (*Aristichthys nobilis*), carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*), pez rojo (*Carassius auratus*), cacho (*Leuciscus idus*), tenca (*Tinca tinca*) y brema común (*Abramis brama*) (Basic *et al.*, 2009; Dixon, 2008). Se ha observado que tres especies de carpa de la India, mrigal (*Cirrhinus merigala* [= *C. cirrhosus*]), rohu, (*Labeo rohita*) y catla (*Catla catla* [= *Gibelion catla*]) son hospedadoras del VVPC (Haghighi Khiabani Asl *et al.* 2008a), pero los datos de la secuencia de nucleótidos de una reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) confirmativa depositados en el Genbank no coinciden con los datos de la secuencia de nucleótidos conocida del VVPC (D.M. Stone, comunicación personal). Además, la secuencia de aminoácidos deducida comparte solo algo de similitud con el VVPC, y por tanto se precisan más estudios para determinar si el virus es VVPC. El virus también se ha aislado de siluros no ciprínidos (también denominados bagres europeos) (*Silurus glanis*) y de lucios (*Esox lucius*); el ácido nucleico del virus también se ha detectado en lucios mediante una combinación de RT-PCR y PCR anidada (Koutná *et al.*, 2003).

También se ha notificado que el VVPC se ha aislado de tilapia del Nilo (*Sarotherodon niloticus*) (Soliman *et al.*, 2008) y de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Jeremic *et al.*, 2006; Haghighi Khiabani Asl *et al.* 2008b). La inmunohistoquímica constituyó el único método de identificación de VVPC en tilapia del Nilo; la microscopía electrónica parece indicar la presencia del virus en el núcleo, lo cual no es un rasgo de la infección por VVPC. Haghighi Khiabani Asl *et al.* (2008b) utilizaron la misma RT-PCR para identificar el virus en trucha arco iris que produjo resultados ambiguos cuando se utilizó para tipificar el virus en carpas de la India indicadas arriba, y por tanto la identidad de ese virus en truchas arco iris todavía está pendiente de confirmación. El virus aislado de trucha arco iris por Jeremic *et al.* (2006) se confirmó posteriormente como VVPC mediante análisis de la secuencia de nucleótidos, pero los intentos de infectar trucha arco iris con el virus mediante inyección intraperitoneal no han funcionado, aunque el virus fue virulento en carpa común (P.F. Dixon, J. Munro y D.M. Stone, datos no publicados). Así, el estado de la trucha arco iris y de la tilapia como hospedadores del VVPC sigue sin resolverse, y está pendiente de otros datos confirmativos. Algunas pruebas serológicas no distinguen el VVPC de miembros de los otros genogrupos descritos por Stone *et al.* (2003), y es indispensable utilizar datos de la secuenciación para confirmar la identidad de cepas aisladas de nuevos hospedadores que puedan corresponder al VVPC.

Se ha observado que otras especies de ciprínidos son susceptibles al VVPC mediante infección experimental por baño, como el rutilo (*Rutilus rutilus*) (Haenen y Davidse, 1993) mientras que el pez cebra (*Danio rerio*) y la carpita dorada (*Notemigonus crysoleucas*) se han infectado con el VVPC por inyección intraperitoneal (véase Dixon, 2008). Es razonable suponer que otras especies de ciprínidos de aguas templadas puedan ser susceptibles a la infección. Otras especies también pueden resultar infectadas experimentalmente, por ejemplo el guppy (*Lebistes reticulatus*). Se ha observado que la perca sol (*Lepomis gibbosus*) resulta infectada experimentalmente por el VVPC, pero no existen datos que lo respalden.

La secuencia de nucleótidos del gen G de un rhabdovirus aislado del camarón patiblanco (*Litopenaeus* (*Penaeus*) *vannamei* en Hawaii es en más de un 99% idéntica a la del VVPC (Johnson *et al.*, 1999), y está serológicamente relacionada con el VVPC. El virus causó mortalidad en camarón azul (*L. stylirostris*) alimentado con granulado empapado del virus (Lu y Loh, 1994).

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

En general, los peces jóvenes de hasta 1 año de edad son más susceptibles a la enfermedad clínica, pero todos los grupos de edad pueden resultar afectados. Además, existe una gran variabilidad en el grado de susceptibilidad al VPC entre peces de la misma especie. Además del estado fisiológico del pez, cuya influencia está poco estudiada, la edad o el estado de la inmunidad innata, relacionado con la edad, parece ser extremadamente importante: cuanto más joven es el pez, mayor es la probabilidad de que la enfermedad sea manifiesta, aunque incluso reproductores adultos pueden ser susceptibles a la infección.

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

Las variedades de carpa común son los principales hospedadores del VVPC y se consideran las más susceptibles a la infección por el VVPC, seguidas, por orden decreciente de susceptibilidad, de otras especies de carpa (incluidos ciertos híbridos), otras especies de ciprínidos susceptibles y, por último, especies de peces no ciprínidos susceptibles. Cuando se obtiene una muestra durante programas de vigilancia de la VPC, preferiblemente deben escogerse ejemplares de carpa común o estirpes como la carpa koi o el híbrido de carpa koi x carpa común, seguidos de híbridos de carpa común x carpín, y a continuación otras especies de carpa, como el carpín, el pez rojo, la carpa herbívora, la carpa cabezona y la carpa plateada. En el caso de que no se disponga de estas especies, pueden escogerse otras especies que se sepa que son susceptibles, en el siguiente orden de preferencia: la tenca, el cacho, el siluro y, por último, cualquier otra especie de ciprínido que esté presente. A efectos de vigilancia de la enfermedad, todas las especies de ciprínidos debe considerarse posibles portadores subclínicos del VVPC. Es habitual mezclar varias especies de ciprínidos en sistemas de policultivo, de modo que el riesgo de transmisión del VVPC entre especies durante los brotes de enfermedad es alto.

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

En el hígado y el riñón de los peces infectados se hallan títulos altos de virus, mientras que en el bazo, las branquias y el encéfalo, los títulos son mucho más bajos (Dixon, 2008).

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

Los reservorios del VVPC son peces clínicamente infectados y portadores subclínicos del virus de entre peces de piscifactoría, asilvestrados o salvajes. No se han estudiado cuáles son los factores que afectan a la persistencia y la duración del estado de portador.

2.2.6. Vectores

En cuanto a vectores inanimados, los invertebrados parasitarios *Argulus foliaceus* (Crustacea, Branchiura) y *Piscicola geometra* (Annelida, Hirudinea) transmitieron el VVPC de peces enfermos a sanos en condiciones experimentales, y el virus se ha aislado de *A. foliaceus* extraído de carpa infectada (Ahne *et al.*, 2002; Dixon, 2008). Se alimentaron garzas reales (*Ardea cinerea*) con carpas infectadas por el VVPC y se les provocó la regurgitación del pescado a intervalos post-ingesta. Se aisló el virus de peces regurgitados 120 minutos tras la ingesta.

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

La mayoría de informes de la VPC tienen que ver con peces de piscifactoría, pero este virus se ha aislado de carpas salvajes de lagos, tanto enfermas como aparentemente sanas.

Se ha sugerido que un posible mecanismo de transmisión del virus tiene lugar por los desplazamientos de peces cebo, pero no existen datos que demuestren que esto ha ocurrido (Goodwin *et al.*, 2004). El principal mecanismo de transmisión del virus de una zona a otra es por el desplazamiento de peces infectados. En peces ornamentales, como el pez rojo o la carpa koi, que se transportan habitualmente por todo el mundo, suele hallarse el virus.

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mecanismos de transmisión

El mecanismo de transmisión del VVPC es horizontal, pero no puede descartarse la transmisión “asociada a los huevos” (normalmente denominada transmisión “vertical”) según un informe de

aislamiento del VVPC de líquido ovárico de carpa, aunque no ha habido ningún otro informe de este tipo. La transmisión horizontal puede ser directa o vectorizada, en la cual el agua es el principal vector abiótico (Fijan, 1988). En la transmisión del VVPC también pueden intervenir vectores vivos (apartado 2.2.6.) y fomites (Fijan, 1988). Una vez el VVPC se establece en la población de un estanque o de una piscifactoría, puede ser muy difícil erradicarlo sin destruir todos los tipos de vida de esas instalaciones de acuicultura.

2.3.2. Prevalencia

Existen muy pocos datos sobre la prevalencia de la VPC, aunque se han llevado a cabo unos pocos estudios sobre la prevalencia de anticuerpos contra el virus. En uno de estos estudios, carpas de 19 de 20 viveros estudiados fueron positivas a anticuerpos contra el virus. Los datos recogidos en Serbia durante el periodo de 10 años comprendido entre 1992 y 2002 mostraron que el virus había sido aislado de carpas de 12 de 38 viveros. El virus puede aparecer esporádicamente en distintos estanques de una instalación, y esporádicamente de año en año en distintos lugares.

2.3.3. Distribución geográfica

Durante mucho tiempo, la zona geográfica afectada por la VPC se ha limitado a países de la Europa continental que experimentan bajas temperaturas del agua durante el invierno. Por tanto, la enfermedad se ha registrado en la mayoría de países europeos y en algunos de los Estados Independientes del oeste de la antigua Unión Soviética (Bielorrusia, Georgia, Lituania, Moldova, Rusia y Ucrania) (véase Dixon 2008 para conocer más información sobre estos y los siguientes lugares). Sin embargo, en 1998, la enfermedad se notificó en pez rojo de un lago de Brasil, en 2002 se notificó por primera vez en dos lugares distintos de EE.UU., y se notificó en Canadá en 2006. La detección del virus en carpas de China (Rep. Pop. De) se confirmó en 2004. La confirmación del aislamiento del VPC de trucha arco iris en carpa de la India en Irán, y de tilapia del Nilo en Egipto está pendiente de más datos, de modo que para añadir estos países a la zona geográfica considerada afectada por el virus también se precisan más datos.

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

Los patrones de la enfermedad resultan influidos por la temperatura del agua, la edad y estado de los peces, la densidad de población y la presencia de factores estresantes. El estado inmunitario de los peces también es un factor importante, en el que influyen de forma importante la inmunidad tanto inespecífica (por ejemplo, el interferón) como la específica (anticuerpos séricos, inmunidad celular). Un mal estado fisiológico de los peces durante el invierno podría contribuir a que desarrollaran susceptibilidad a la enfermedad. En la acuicultura europea, las pérdidas pueden alcanzar el 70% en carpas jóvenes (Ahne *et al.*, 2002), pero normalmente son de entre 1 y el 40%. Alrededor del 20% de la población de carpas de un lago de EE.UU. murió por VPC durante un brote de la enfermedad.

2.3.5. Factores ambientales

En general surgen brotes de la enfermedad en carpas a temperaturas de entre 11°C y 17°C. Casi nunca tienen lugar a menos de 10°C, y las mortalidades, sobre todo en los peces de más edad, disminuyen a medida que la temperatura supera los 22°C (Fijan, 1988). Las infecciones bacterianas secundarias y concomitantes y/o parasitarias pueden afectar la mortalidad y la presentación de signos clínicos. En la carpa, la enfermedad a menudo se observa en primavera (de ahí el nombre común de la enfermedad), en concreto en países con inviernos fríos. Se considera que el mal estado de los peces durante el invierno puede contribuir a la aparición de la enfermedad. La enfermedad puede aparecer en peces en cuarentena debido al estrés del transporte, aunque no se disponga de ninguna prueba de la presencia del virus en los peces antes del transporte. El virus se ha aislado de peces aparentemente sanos de un lago de Canadá que se habían extraído a lo largo de un periodo de 13 días durante el cual la temperatura del agua pasó de los 27,3°C a los 24,2°C.

2.4. Control prevención

Los métodos para controlar la VPC se basan principalmente en evitar la exposición al virus, junto con unas buenas prácticas de higiene. Esto es factible en piscifactorías pequeñas que utilizan agua de manantiales o de perforaciones y un sistema seguro para prevenir la entrada de peces a la piscifactoría mediante el agua. Las medidas de higiene deben incluir la desinfección de los huevos mediante un tratamiento con iodóforos (Ahne y Held, 1980) hasta que se haya confirmado, sin lugar a dudas, que no se produce transmisión vertical, una desinfección periódica de los estanques, una desinfección química del equipo de la piscifactoría, una manipulación cuidadosa de los peces para evitar causarles estrés y una eliminación inocua de los peces muertos. Reducir la densidad de población de los peces durante el invierno y el principio de la primavera reducirá la propagación del virus. En instalaciones de engorde, con un medio controlado, el aumento de la temperatura del agua por encima de los 19-20°C detendrá o prevendrá los brotes de VPC. Actualmente no se

dispone de ninguna vacuna inocua y eficaz. No obstante, muchas preparaciones inactivadas experimentales, vacunas vivas atenuadas y vacunas basadas en el ADN han dado resultados esperanzadores (Dixon, 2008).

2.4.1. Vacunación

En varios estudios se ha observado la eficacia de la vacunación, y se han documentado pruebas de vacunación en el campo realizadas en la antigua Yugoslavia, en Austria y en la antigua Checoslovaquia (Fijan, 1988); una vez se marcó una vacuna en este último país, pero ya no existe. En pruebas de laboratorio se ha observado que la vacunación basada en el ADN puede proteger a los peces (Dixon, 2008; Emmenegger y Kurath, 2008), pero se precisa más trabajo de desarrollo.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

El metisoprinol inhibe la replicación del VVPC *in vitro*, pero no se ha comprobado en condiciones de cultivo de carpas.

2.4.3. Inmunoestimulación

La inyección de ARN monocatenario y bicatenario (que es un inductor del interferón) a carpas las protegió durante más de 3 semanas, pero este tratamiento no es eficaz cuando se administra mediante baño.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

Se ha criado la estirpe “Krasnodar” de la carpa común a favor de un aumento de la resistencia al VVPC.

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

No se conoce. La gran variedad de hospedadores del virus indica que tendrían que aplicarse procedimientos de selección estrictos a posibles especies alternativas.

2.4.6. Agentes bloqueantes

Ninguno identificado.

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

No se considera que el virus que se transmita por los huevos, pero si se considerara necesario, podrían desinfectarse huevos mediante tratamiento con iodóforos (Ahne y Held, 1980).

2.4.8. Prácticas generales de manejo

Deben desinfectarse los estanques periódicamente y deben aplicarse prácticas de bioseguridad eficaces contra la enfermedad. El equipo, en concreto las redes, no deben utilizarse en estanques distintos a no ser que antes se desinfecten. Deben minimizarse las prácticas que puedan causar estrés, y deben evitarse las altas densidades de población.

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

3.1.1. Peces enfermos

Deben escogerse peces moribundos o que presenten signos clínicos de la enfermedad; en el momento de extraerlos, los peces deben estar vivos. No obstante, no existe ninguna lesión que sea patognomónica, y en los casos de mortalidad súbita puede no haber ningún signo clínico (véase el apartado 4.1.1). Cada muestra debe ir identificada con una etiqueta en la que se indique el lugar, la hora, la fecha, la especie, el número de muestras obtenidas, si el pez estaba muerto o moribundo en el momento de extraerlo, y el nombre e información de contacto de la persona que ha obtenido la muestra(s). En el Capítulo 1.4 del *Código Acuático* se indica un enfoque general de la vigilancia y la obtención de muestras. Véase también la *Guía de la OIE para la Vigilancia Sanitaria de los Animales Acuáticos* (2009).

3.1.2. Peces que parecen clínicamente normales

La obtención de peces debe asegurar un número estadísticamente significativo de ejemplares, pero es evidente que el hecho de no encontrar determinados agentes patógenos en la muestra no garantiza la ausencia de estos en el ejemplar examinado ni en la población. Esto es especialmente cierto en el caso de las poblaciones de vida libre o asilvestradas, en las cuales es difícil obtener una muestra

representativa y aleatoria. No obstante, el riesgo de que un agente patógeno escape al sistema de vigilancia se reduce en las piscifactorías cuyas poblaciones han sido inspeccionadas y en las que se ha comprobado durante varios años (al menos dos) si estaban infectadas por el agente patógeno en cuestión, siempre que no estén expuestas a una posible recontaminación por peces asilvestrados.

Las muestras deben englobar todas las especies susceptibles del lugar y deben representar todos los lotes de todas las especies. Un lote se define como un grupo de peces de la misma especie que tiene en común el suministro de agua y que procede de la misma población de reproductores o de desove.

En primer lugar deben escogerse los peces moribundos de la población que se va a muestrear, y el resto de la muestra debe estar formada por peces vivos escogidos de forma aleatoria de todas las unidades de engorde que representen el lote que se está estudiando.

En el Capítulo 1.4 del *Código Acuático* se indica un enfoque general de la vigilancia y la obtención de muestras. Véase también la *Guía de la OIE para la Vigilancia Sanitaria de los Animales Acuáticos* (2009).

3.2. Conservación de las muestras para su envío

Las muestras para el aislamiento del virus deben transportarse al laboratorio a 4°C utilizando recipientes refrigerados o sobre hielo, preferiblemente en medio de transporte para virus (Capítulo 2.3.0, apartado A.2.2.1.), y analizarse en un plazo de 24 horas o, en circunstancias excepcionales, un plazo de 48 horas. Es preferible enviar muestras de órganos, pero si es necesario pueden enviarse peces vivos o muertos enteros al laboratorio de análisis. Si esto no es posible, las muestras se pueden congelar, aunque puede producirse una pérdida de la viabilidad del virus al descongelarlas. Debe evitarse el congelar-descongelar la muestra reiteradas veces. Las muestras para la RT-PCR pueden conservarse en soluciones comerciales de conservación del ARN según las instrucciones del fabricante, o, como alternativa, pueden fijarse en etanol.

3.3. Combinación de varias muestras

Pueden prepararse muestras combinadas de hasta cinco peces cada una.

3.4. Órganos y tejidos de elección

Peces infectados de forma subclínica (peces aparentemente sanos): riñón, bazo, branquias y encéfalo (peces de cualquier tamaño)

Peces afectados clínicamente: alevines enteros (longitud corporal ≤ 4 cm), vísceras enteras incluidos el riñón y el encéfalo (> 4 cm longitud corporal ≤ 6 cm) o, en el caso de peces de mayor tamaño, el hígado, el riñón, el bazo y el encéfalo.

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

Puede ser difícil aislar el virus de peces portadores infectados de forma subclínica y, en concreto, de peces que sobrevivan a un brote de la enfermedad que tuvo lugar hace tiempo. De igual forma, es problemático el aislamiento del virus en este tipo de peces a temperaturas distintas de aquellas a las que se manifiesta la enfermedad clínica. En estos peces tal vez se puedan detectar anticuerpos contra el virus (Dixon, 2008), pero consúltese la advertencia del apartado 4, abajo. Es posible que no pueda llevarse a cabo el aislamiento del virus de muestras clínicas descompuestas, de modo que en estos casos la presencia de signos de VPC y un resultado positivo en la prueba de la inmunofluorescencia indirecta (IFAT) o en el ensayo de inmunoenzimología (ELISA) pueden considerarse suficientes para iniciar medidas de control. Varios estudios en los que se ha intentado aislar el virus de líquidos reproductivos han resultado infructuosos, aunque en algunos pocos casos se ha aislado el virus de líquidos ováricos, pero no seminales.

4. Métodos de diagnóstico

El diagnóstico de la VPC en peces afectados clínicamente puede lograrse por el aislamiento del virus o, más rápidamente, por IFAT o ELISA en tejidos infectados. Teóricamente, el diagnóstico directo mediante IFAT o ELISA debe confirmarse mediante el aislamiento del virus seguido de una neutralización vírica (VN) o una RT-PCR y análisis de la secuencia del producto obtenido.

No hace mucho que se ha aceptado la detección en peces de anticuerpos contra virus como método de detección sistemática para la evaluación del estado de poblaciones de peces respecto a las enfermedades víricas, debido a un insuficiente conocimiento de las respuestas serológicas de los peces a las infecciones víricas. No obstante, en un futuro cercano podrían validarse ciertas técnicas serológicas para ciertas infecciones víricas de los peces, haciendo que el uso de la serología de peces se aceptara más a efectos de detección de enfermedades. Como el

VVPC no se puede detectar en cualquier momento del año, ni con confianza de todos los peces portadores, en ocasiones la detección de anticuerpos en los peces puede aportar información útil para estudios epidemiológicos o evaluaciones del riesgo. No obstante, hay que recordar que la presencia de anticuerpos específicos solo indica una exposición previa al virus, y no la presencia actual del virus en un pez. Es mejor utilizar los estudios de anticuerpos que indiquen la exposición previa al virus a nivel de la población y no del individuo.

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

Durante un brote de VPC, habrá un considerable aumento de la mortalidad en la población. Los peces enfermos suelen estar más oscuros. Los signos clínicos típicos son exoftalmia, palidez de branquias, hemorragias en la piel, la base de las aletas y el orificio de la salida intestinal, distensión abdominal o hidropesía y protrusión del orificio de salida intestinal (ano), a menudo con arrastre de cilindros fecales mucoides. Todos estos signos clínicos pueden no estar presentes en peces determinados, y pueden no observarse todos en la población afectada. Además, algunos de estos signos pueden aparecer en enfermedades causadas por otros agentes patógenos. Por otra parte, en los casos de mortalidad de aparición súbita, puede no haber ningún signo clínico.

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

En general, los peces jóvenes de hasta 1 año de edad son más susceptibles a la enfermedad clínica, pero todos los grupos de edad pueden resultar afectados. Los peces se vuelven letárgicos, se separan del banco y se agrupan en la entrada de agua o en los laterales del estanque, y algunos pueden sufrir pérdida del equilibrio.

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

No hay lesiones macroscópicas patognomónicas. El diagnóstico final debe basarse en la detección directa del antígeno vírico o de ácido nucleico en tejidos o en el aislamiento e identificación del virus. Puede no haber lesiones en los casos de mortalidad súbita. Existen lesiones macroscópicas documentadas principalmente en la carpa común y pueden incluir un exceso de líquido ascítico en la cavidad abdominal, que suele contener sangre, degeneración de las láminas de las branquias e inflamación del intestino, que contiene moco en lugar de alimento. Es frecuente observar edema y hemorragias de los órganos viscerales, y pueden observarse hemorragias focales en el músculo y en el tejido adiposo, así como en la vejiga natatoria.

4.2.2. Bioquímica clínica

Debido a la ausencia de estudios a gran escala, la bioquímica clínica es un medio poco fiable de detección de la VPC. Los datos presentados abajo son solo indicativos de procesos patológicos inespecíficos.

En algunos grupos de siluros infectados experimentalmente con el virus se han observado disminuciones del hematocrito, mientras que en otros, este parámetro ha quedado inalterado. La actividad transaminasa ha aumentado en todos los grupos.

Durante los 3 meses siguientes a un brote de VPC en carpas de estanques, se observó un aumento de los neutrófilos, los monocitos, los eosinófilos y los basófilos. Los linfocitos disminuyeron y a continuación aumentaron recuperando los valores basales. A lo largo del mismo periodo, peces con signos de VPC presentaron un aumento de las concentraciones plasmáticas de Ca^{2+} , de fosfato inorgánico, de bilirrubina total, de actividad alanina aminotransferasa, de actividad lactato deshidrogenasa y de actividad α -hidroxibutiril deshidrogenasa. Las concentraciones de proteína total y de colesterol, así como la actividad de la fosfatasa alcalina, disminuyeron.

4.2.3. Anatomopatología microscópica

Pueden observarse alteraciones histopatológicas en todos los órganos principales. En el hígado, los vasos sanguíneos presentan perivascularitis edematosa que avanza a necrosis. El parénquima hepático muestra hiperemia con múltiples necrosis focales y degeneración. El corazón muestra pericarditis e infiltración del miocardio que avanza a degeneración focal y necrosis. El bazo muestra hiperemia con hiperplasia del reticuloendotelio y aumento de tamaño de centros melanomacrófagos, y el páncreas está infamado, con necrosis multifocal. En el riñón, se observan lesiones en el tejido excretor y hematopoyético. Los túbulos renales están obstruidos por cilindros y las células sufren degeneración

hialina y vacuolación. El intestino muestra inflamación perivascular, descamación del epitelio y atrofia de las vellosidades. El peritoneo está inflamado y los vasos linfáticos están llenos de detritos y de macrófagos. En la vejiga natatoria, la lámina epitelial pasa de ser una monocapa a una multi-capa continua y los vasos de la submucosa están dilatados y se observa una infiltración de linfocitos cercana.

4.2.4. Preparaciones húmedas

No relevante.

4.2.5. Frotis

Solo son útiles si se utiliza un procedimiento inmunohistoquímico como la IFAT (véase el apartado 4.3.1.2.2.1) o el de inmunoperoxidasa, pero deben consultarse las advertencias del apartado 4.3.1.2.

4.2.6. Cortes fijados

Véase el apartado 4.2.3. Cortes fijados. También pueden utilizarse cortes fijados para los procedimientos de inmunohistoquímica, como en 4.2.5., pero deben consultarse las advertencias del apartado 4.3.1.2.

4.2.7. Microscopía electrónica/citopatología

El virus tiene la típica forma de bala de un rabdovirus y mide unos 60-90 nm de ancho por 90-180 nm de largo, según una tinción negativa. El virus consiste en una nucleocápsida con envoltura.

4.3. Métodos de detección e identificación del agente

Véanse los siguientes apartados del Capítulo 2.3.0:

- Apartado A.2.2.1 para más detalles sobre el transporte.
- Apartado A.2.2.2 para la extracción del virus y la obtención de homogenados de órgano.

4.3.1. Métodos directos de detección

El virus se puede observar directamente mediante microscopía electrónica, pero esta solo indicará la presencia de un rabdovirus, de modo que se precisará una posterior identificación. El antígeno y el ácido nucleico víricos pueden llegar a identificarse en extractos de tejidos de peces infectados clínicamente, y normalmente de estos peces se puede aislar el virus. No obstante, es mucho menos probable que el antígeno o el ácido nucleico vírico se detecten directamente de tejidos de peces portadores infectados de forma subclínica. El aislamiento del virus es el método de elección para la detección de dichos peces, pero no es un 100% eficaz.

4.3.1.1. Métodos microscópicos

Los métodos microscópicos por sí solos no se recomiendan para el diagnóstico de la VPC porque el cuadro histopatológico no es específico de la enfermedad. No obstante, pueden aportar pruebas que lo respalden, en concreto cuando se utilizan métodos inmunohistológicos, aunque deben consultarse las advertencias del apartado 4.3.1.2.

4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

No relevante.

4.3.1.1.2. Frotis/improntas de tejidos

Solo son útiles si se utiliza un procedimiento inmunohistológico como la IFAT (véase el apartado 4.3.1.2.2.1) o el procedimiento de la inmunoperoxidasa, pero deben consultarse las advertencias del apartado 4.3.1.2.

4.3.1.1.3. Cortes fijados

Solo son útiles si se utiliza un procedimiento inmunohistológico como la IFAT (véase el apartado 4.3.1.2.1.2) o el procedimiento de la inmunoperoxidasa, pero deben consultarse las advertencias del apartado 4.3.1.2. Para conocer los detalles de la fijación de muestras consúltase el Capítulo 2.30, apartado B.3.3.1.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

Tras el aislamiento, el virus tiene que identificarse, lo cual se puede lograr por métodos de detección del antígeno, neutralización del virus o métodos de identificación del ácido nucleico. Los resultados de los dos primeros métodos deben considerarse provisionales a no ser que se utilicen anticuerpos monoclonales o policlonales totalmente validados, dado que se producen reacciones cruzadas con otros virus (apartado 2.1.1 y apartado 5). Los kits comerciales en los que se utilizan anticuerpos policlonales pueden carecer de especificidad, y aquellos en los que se utilizan anticuerpos monoclonales pueden no detectar todos los subgenogrupos del VVPC (Dixon y Longshaw, 2005). Para confirmar la identidad del virus, los métodos de detección del ácido nucleico siempre deben ir seguidos de secuenciación o uso de un método como la hibridación inversa (Sheppard *et al.*, 2007)

4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

Línea celular a utilizar: EPC o FHM (capítulo 2.3.0, apartado B.1.1).

Extracción del virus: Se utiliza el procedimiento descrito en el capítulo 2.3.0, apartado A.2.2.2.

Inoculación de monocapas celulares: se llevan a cabo dos diluciones decimales seriadas de sobrenadantes de homogenados de órgano a 1/10 en medio de cultivo celular (es decir, los sobrenadantes de homogenado serán diluciones a 1/100 y 1/1000 del material orgánico original) y se transfiere un volumen adecuado de cada una de estas dos diluciones a monocapas celulares de 24 horas de edad cuyo medio de cultivo se haya drenado. Como alternativa, se prepara una dilución decimal única del homogenado de órgano a 1/10 (es decir, una dilución a 1/100 del material orgánico original) y se añade un volumen adecuado tanto de la dilución a 1/10 como de la dilución a 1/100 directamente a monocapas celulares de 24 horas de edad sin drenar, para conseguir diluciones finales a 1/100 y a 1/1000 del homogenado de órgano. En el caso de que surja toxicidad de la muestra, se preparan dos diluciones decimales seriadas de los sobrenadantes de homogenado de órgano a 1/10 en medio de cultivo celular como se ha descrito antes y se inoculan al menos 2 cm² de monocapa celular drenada con 100 µl de cada dilución. Se deja adsorber durante 0,5-1 hora a 10-15°C, se retira el inóculo y se añade el medio de cultivo celular tamponado a pH 7,6 y se suplementa con un suero fetal bovino (FBS) al 2% (1 ml/pocillo en el caso de placas de cultivo celular de 24 pocillos). Se incuba a 20°C.

Seguimiento de la incubación: Se sigue el curso de la infección en controles positivos y otros cultivos celulares inoculados, mediante examen microscópico a 40-100 aumentos durante 7 días. Se recomienda utilizar un microscopio de contraste de fases.

Se mantiene el pH del medio de cultivo celular a 7,3-7,6 durante la incubación. Esto se puede lograr añadiendo al medio inoculado tampón de bicarbonato estéril (en el caso de los frascos de cultivo celular muy bien cerrados) o medio tamponado con HEPES (HEPES= ácido N-2-hidroxietil-piperazina-N-2-etanosulfónico) o solución 2 M del tampón Tris (Tris [hidroximetil] aminometano)/HCl (en el caso de las placas de cultivo celular).

Si aparece un efecto citopático (ECP) en los cultivos celulares inoculados con las diluciones de los sobrenadantes del homogenado problema, deben llevarse a cabo los procedimientos de identificación de inmediato (véanse los apartados 4.3.1.2.1.1, 4.3.1.2.1.2, 4.3.1.2.1.3 y 4.3.1.2.3.1, abajo).

Si no aparece ECP en los cultivos inoculados (a pesar del avance normal del ECP en los controles positivos), los cultivos inoculados debe subcultivarse durante 7 días más. En el caso de que el control positivo no desarrolle ECP, el proceso debe repetirse con células susceptibles nuevas y nuevos lotes de muestras.

Procedimiento del subcultivo: mediante una pipeta, se intentan desprender células de los recipientes de cultivo celular y recoger alícuotas de medio de cultivo celular más células de todas las monocapas inoculadas, manteniendo distintos grupos separados. Las alícuotas de las diluciones a 1/100 y a 1/1000 se combinan y se inoculan en cultivos celulares nuevos de 24 horas de edad para conseguir diluciones finales de 1/10 y de 1/100 de las alícuotas combinadas. Se incuban y se controlan como se ha descrito antes. Si no aparece ECP, la prueba puede declararse negativa.

4.3.1.2.1.1 Confirmación de la identidad del virus mediante neutralización

- i) Se recoge el medio de cultivo de las monocapas celulares que muestren ECP y se centrifuga a 2.000 *g* durante 15 minutos a 4°C, o se filtra por una membrana de 0,45 µm de tamaño de poro para eliminar detritos celulares.
- ii) Se diluye el medio que contiene el virus, pasando de 10⁻² a 10⁻⁴.

- iii) Se mezclan las alícuotas de cada dilución con volúmenes iguales de una solución de anticuerpos contra el VVPC, y de forma similar se tratan alícuotas de cada dilución del virus con medio de cultivo celular. La solución del anticuerpo neutralizante (MAb) debe tener un título de reducción del 50% en placa de al menos 2000 en la neutralización de 50-100 unidades formadoras de placa (UFP) del VVPC.
- iv) Paralelamente, deben llevarse a cabo otras pruebas de neutralización contra:
 - una cepa vírica homóloga (prueba de neutralización positiva)
 - una cepa vírica heteróloga (prueba de neutralización negativa).
- v) Se incuban todas las mezclas a 20°C durante 1 hora.
- vi) Se transfieren alícuotas de cada una de las mezclas anteriores a monocapas celulares (se inoculan dos cultivos celulares por dilución) y se dejan adsorber durante 0,5-1 hora a 15-20°C; para este fin son adecuadas las placas de cultivo celular de 24 o de 12 pocillos, utilizando un inóculo de 50 µl.
- vii) Cuando ha terminado la adsorción, se añade a cada pocillo medio de cultivo celular, suplementado con FBS al 2%, se tampona a pH 7,4-7,6 y se incuba a 20°C.
- viii) Se comprueba en los cultivos celulares si ha empezado el ECP y se leen los resultados en cuanto este empieza en controles no neutralizados (protegiendo las monocapas celulares de los controles de neutralización positivos). Los resultados se registran tras un examen por microscopía simple (preferiblemente de contraste de fases) o tras desechar el medio de cultivo celular y teñir las monocapas celulares con una solución de cristal violeta al 1% en etanol al 20%.
- ix) El virus problema se identifica como VVPC cuando el ECP se previene o se retrasa considerablemente en los cultivos celulares que han recibido la suspensión de virus tratada con el anticuerpo específico contra el VVPC, siempre que se observe ECP en todos los demás cultivos celulares.

NOTA: Las cepas presuntamente de VVPC identificadas mediante ELISA o IFAT pueden no ser neutralizadas por NAb contra el VVPC. Además, algunos subgenogrupos del VVPC pueden no ser totalmente neutralizados por los NAb preparados contra una cepa de un subgenogrupo distinto. Cuando no hay neutralización por parte de los NAb contra el VVPC o esta es incompleta, es recomendable una RT-PCR y un análisis de la secuencia de nucleótidos de los productos de la RT-PCR para confirmar la presencia del VVPC.

4.3.1.2.1.2 Confirmación de la identidad del virus mediante la prueba de la inmunofluorescencia indirecta (IFAT)

- i) Se preparan monocapas de células en pocillos de 2 cm² de placas de cultivo celular de plástico, frascos, o cubreobjetos o portas de vidrio con el fin de alcanzar aproximadamente un 80% de confluencia en un plazo de 24 horas de incubación a 25°C (se siembran seis monocapas celulares por cepa vírica problema, más dos para el control positivo y dos para el control negativo). El contenido en FBS del medio de cultivo celular puede reducirse al 2-4%. Si tienen que identificarse muchas cepas víricas, es muy recomendable utilizar placas Terasaki.
- ii) Cuando las placas celulares estén listas para la infección, es decir, el mismo día o el día después de la siembra, se inoculan las suspensiones del virus problema por pasos de diluciones decimales seriadas directamente en los pocillos o frascos de cultivo celular. En el caso de las pruebas en las que se utilizan células cultivadas en cubreobjetos o portas de vidrio, las diluciones se preparan en recipientes estériles y a continuación se utilizan para inocular las células.
- iii) Se diluye la suspensión de virus control de VVPC de forma similar, con el fin de obtener un título vírico de unas 5.000–10.000 UFP ml⁻¹ en el medio de cultivo celular.
- iv) Se incuban a 20°C durante 24 horas.
- v) Se retira el medio de cultivo celular, se enjuaga una vez con solución salina tamponada con fosfato (PBS) 0,01 M, pH 7,2, y a continuación tres veces brevemente con acetona fría (guardada a -20°C) en el caso de los portas o cubreobjetos, o bien acetona al 80% en agua o acetona al 30% en etanol, también a -20°C, en el caso de las células cultivadas en sustratos de plástico. Se deja actuar el fijador durante 15 minutos. Un volumen de 0,5 ml es suficiente para 2 cm² de monocapa celular.
- vi) Se dejan secar las monocapas celulares al aire durante al menos 30 minutos y se procesan de inmediato o se congelan a -20°C.

- vii) Se rehidratan las monocapas celulares secadas, si se han guardado congeladas, mediante cuatro pasos de enjuagado con PBS que contenga Tween 20 al 0,05% (PBST) y se retira este tampón por completo tras el último enjuagado. Se bloquean con una solución de leche desnatada al 5% o de albúmina de suero bovino al 1%, en PBST, durante 30 minutos a 37°C.
- viii) Se enjuagan cuatro veces con PBST, durante 5 minutos cada vez. Los portas o placas de cultivo de plástico puede agitarse suavemente durante los enjuagados.
- ix) Se prepara una solución de anticuerpo purificado o suero contra el VVPC en PBST, a la dilución adecuada (que se habrá establecido previamente o que suministrará el proveedor del reactivo).
- x) Se incuban las monocapas celulares con la solución de anticuerpos durante 1 hora a 37°C en una cámara húmeda y se impide la evaporación.
- xi) Se enjuagan cuatro veces con PBST.
- xii) Se incuban las monocapas celulares con una solución de anticuerpos contra la inmunoglobulina utilizada en la primera capa y preparados según las instrucciones del fabricante, conjugados a isotiocianato de fluoresceína (ITCF). Estos anticuerpos conjugados a ITCF casi siempre son de conejo o de cabra.
- xiii) Se enjuagan cuatro veces con PBST.
- xiv) Se observan las monocapas celulares tratadas sobre sustratos de plástico de inmediato, o se montan los portas o cubreobjetos utilizando solución salina de glicerol a un pH de 8,5, o una solución de montaje comercial.
- xv) Se examinan bajo luz ultravioleta (UV) incidente utilizando un microscopio con oculares de 10 aumentos y objetivos de 20 a 40 aumentos con aperturas numéricas de >0,65 y >1,3, respectivamente. Antes de proceder a observación alguna, hay que asegurarse de que los controles positivo y negativo dan los resultados esperados.

4.3.1.2.1.3 Confirmación de la identidad del virus mediante enzimoimmunoanálisis (ELISA)

- i) Se recubren los pocillos de microplacas diseñadas para ELISA con diluciones adecuadas de inmunoglobulinas (Ig) purificadas específicas del VVPC, en tampón carbonato 0,02 M, a pH 9,5 (200 µl pocillo⁻¹). Las Ig pueden ser policlonales o monoclonales, y normalmente se generan en conejo o ratón, respectivamente. Para la identificación del VVPC, son adecuados anticuerpos monoclonales (MAbs) específicos de ciertos dominios de la proteína de la nucleocápsida (N).
- ii) Se incuban toda la noche a 4°C.
- iii) Se enjuagan cuatro veces con PBST.
- iv) Se bloquean con leche desnatada (solución al 5% en tampón carbonato) u otra solución de bloqueo durante 1 hora a 37°C (300 µl pocillo⁻¹).
- v) Se enjuagan cuatro veces con PBST.
- vi) Se añade detergente no iónico al 2% (Triton X-100 o Nonidet P-40) a la suspensión del virus problema.
- vii) Se distribuyen 100 µl pocillo⁻¹ de diluciones de dos o cuatro pasos del virus problema, y del cultivo celular no infectado recogido (control negativo). También se incluye un VVPC como control positivo. Se incuban durante 1 hora a 37°C.
- viii) Se enjuagan cuatro veces con PBST.
- ix) Se añaden a los pocillos 200 µl de MAb o anticuerpo policlonal contra el VVPC conjugado a peroxidasa de rábano (HRP). También puede utilizarse un MAb contra la proteína N específico de un dominio distinto del correspondiente al MAb de recubrimiento y previamente conjugado a biotina. Se incuban durante 1 hora a 37°C.
- x) Se enjuagan cuatro veces con PBST.
- xi) Si se ha utilizado anticuerpo conjugado a HRP, se procede al paso xiii. De lo contrario, se añaden 200 µl de estreptavidina conjugada a HRP o ExtrAvidin (Sigma) a los pocillos que han recibido el anticuerpo conjugado a biotina y se incuban durante 1 hora a 37°C.
- xii) Se enjuagan cuatro veces con PBST.
- xiii) Se añaden 200 µl de un sustrato adecuado y cromógeno, como dihidrocloruro de tetrametilbencidina. Se detiene el curso de la prueba cuando los controles positivos reaccionan, y se leen los resultados.

4.3.1.2.2. Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos directamente en tejidos de pez

4.3.1.2.2.1 Prueba de la inmunofluorescencia indirecta

- i) Se desangra el pez por completo.
- ii) Se realizan improntas de riñón sobre portas de vidrio limpios o sobre el fondo de pocillos de una placa de cultivo celular de plástico.
- iii) Se guardan y se transportan trozos de riñón como se ha indicado en el capítulo 2.3.0, apartado A.2.21.) junto con los otros órganos necesarios para el aislamiento del virus.
- iv) Se deja secar la impronta al aire durante 20 minutos.
- v) Se fija con acetona fría (guardada a -20°C) en el caso de los portas de vidrio, o con acetona al 80% en agua o acetona al 30% en etanol, también a -20°C, en el caso de los pocillos de plástico. Se deja actuar el fijador durante 15 minutos. Se dejan secar las improntas durante al menos 30 minutos y se procesan de inmediato o se congelan a -20°C.
- vi) Se rehidratan las improntas si han sido congeladas mediante cuatro pasos de enjuagado con PBST, y se retira este tampón por completo tras el último enjuagado. Se bloquean con una solución de leche desnatada al 5% o una solución de albúmina de suero bovino al 1%, en PBST, durante 30 minutos a 37°C.
- vii) Se enjuagan cuatro veces con PBST, durante 5 minutos cada vez. Los portas o placas de cultivo de plástico puede agitarse suavemente durante los enjuagados.
- viii) Se prepara una solución de anticuerpo o suero purificado contra el VVPC en PBST, a la dilución adecuada (que se habrá establecido previamente o que proporcionará el fabricante del reactivo).
- ix) Se incuban las improntas con la solución de anticuerpos durante 1 hora a 37°C en una cámara húmeda y se impide la evaporación.
- x) Se enjuagan cuatro veces con PBST.
- xi) Se incuban las improntas con una solución de anticuerpos contra la inmunoglobulina utilizada en la primera capa y preparada según las instrucciones del fabricante, conjugados a ITCF. Estos anticuerpos conjugados a ITCF casi siempre están generados en conejo o cabra.
- xii) Se enjuagan cuatro veces con PBST.
- xiii) Se observan las improntas tratadas en placas de plástico de inmediato, o se montan los portas con cubreobjetos utilizando solución salina de glicerol a pH 8,5, o una solución de montaje comercial.
- xiv) Se examinan con luz ultravioleta (UV) incidente al microscopio con oculares de 10 aumentos y objetivos de 20 o 40 aumentos con una apertura numérica de >0,65 y >1,3, respectivamente. Antes de realizar observación alguna hay que asegurarse de que los controles positivos y negativos dan los resultados esperados.

4.3.1.2.2.2. Enzimoimmunoanálisis (ELISA)

Véase el capítulo 2.3.0, apartado A.2.2.2 para detalles sobre la obtención de homogenados de órganos.

- i) Se recubren los pocillos de microplacas diseñadas para ELISA con diluciones adecuadas de inmunoglobulinas (Ig) purificadas específicas del VVPC, en tampón carbonato 0,02 M, a pH 9,5 (200 µl pocillo⁻¹). Las Ig pueden ser policlonales o monoclonales, y normalmente se generan en conejo o ratón, respectivamente. Para la identificación del VVPC, son adecuados anticuerpos monoclonales (MAbs) específicos de ciertos dominios de la proteína de la nucleocápsida (N).
- ii) Se incuban durante toda la noche a 4°C.
- iii) Se enjuagan cuatro veces con PBST.
- iv) Se bloquean con una solución de leche desnatada (al 5% en tampón carbonato) u otra solución bloqueante durante 1 hora a 37°C (300 µl pocillo⁻¹).
- v) Se enjuagan cuatro veces con PBST.
- vi) Se guarda una alícuota a ¼ de cada homogenado a 4°C, por si la prueba sale negativa y es necesario un aislamiento del virus en cultivo celular.
- vii) Se trata la parte restante del homogenado con Triton X-100 al 2% o Nonidet P-40 y fluoruro de fenilmetil sulfonilo 2 mM, y se mezcla con cuidado.

- viii) Se distribuyen 100 µl pocillo⁻¹ de diluciones de dos o cuatro pasos de la muestra problema, y de los tejidos control negativos. También se incluye un VVPC como control positivo. Se incuban durante 1 hora a 37°C.
- ix) Se enjuagan cuatro veces con PBST.
- x) Se añaden a los pocillos 200 µl de MAb o anticuerpo policlonal contra el VVPC conjugado a peroxidasa de rábano (HRP). También puede utilizarse un MAb contra la proteína N específico de un dominio distinto del correspondiente al MAb de recubrimiento y previamente conjugado a biotina. Se incuban durante 1 hora a 37°C.
- xi) Se enjuagan cuatro veces con PBST.
- xii) Si se ha utilizado anticuerpo conjugado a HRP, se procede al paso xiv. De lo contrario, se añaden 200 µl de estreptavidina conjugada a HRP o ExtrAvidin (Sigma) a los pocillos que han recibido el anticuerpo conjugado a biotina y se incuban durante 1 hora a 37°C.
- xiii) Se enjuagan cuatro veces con PBST.
- xiv) Se añaden 200 µl de un sustrato adecuado o cromógeno, como dihidrocloruro de tetrametilbencidina. Se detiene el curso de la prueba cuando reaccionan los controles positivos, y se leen los resultados.
- xv) Si la prueba es negativa, se procesan las muestras de órganos guardadas a 4°C, para el aislamiento del virus en cultivo celular como se ha descrito en el apartado 4.3.1.2.1.

4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

4.3.1.2.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) (confirmación de la identidad del virus o directamente de extractos de tejido de pez)

El genoma del VVPC está formado por una única hebra de ARN de unas 11 kb, con polaridad negativa. Se lleva a cabo la amplificación de un fragmento de 714 pb de ADNc de VVPC utilizando cebadores derivados de secuencias de la región que codifica el gen de la glucoproteína: 5'-TCT-TGG-AGC-CAA-ATA-GCT-CAR*-R*TC-3' (VVPC F1) y 5'-AGA-TGG-TAT-GGA-CCC-CAA-TAC-ATH*-ACN*-CAY*-3' VVPC R2), utilizando una modificación del método de Stone *et al.* (2003).

- i) Se extrae ARN total de 100 µl de sobrenadante de cultivos celulares que presente ECP o 100 µl de extracto de tejido de pez y se disuelven en 40 µl de agua de grado biología molecular libre de ADNasa y de ARNasa.

Existen varios kits comerciales de extracción del total del ARN que producirán un ARN de calidad para la RT-PCR. Algunos ejemplos son el Trizol ReagentT (RL, Life Technologies, Paisley, Reino Unido), el sistema de aislamiento SV Total RNA (Promega) y Nucleospin® RNA (AB gene).
- ii) Para la síntesis de ADNc, se lleva a cabo una reacción de transcripción inversa a 37°C durante 1 hora en un volumen de 20 µl formado por tampón de reacción RT del virus de la leucemia murina de Moloney (VLM-M) (Tris 50 mM, pH 8,3, KCl 75 mM, DTT 10 mM, MgCl₂ 3 mM) 1x, que contenga dNTP 1mM, 100 pmol de cebador R2 para VVPC, 20 unidades de transcriptasa inversa del VLM-M (Promega, Southampton, Reino Unido) o una transcriptasa inversa equivalente y 1/10 del ARN total que se ha extraído antes.
- iii) La PCR se lleva a cabo en un volumen de reacción de 50 µl de tampón para PCR (KCl 50 mM, Tris/HCl 10 mM, pH 9,0, y Triton X-100 al 0,1%) que contenga MgCl₂ 2,5 mM, cada una de las dNTP a una concentración 200 µM, 50 pmol de cada uno de los cebadores para el VVPC, el R2 y el F1, 1,25 unidades de ADN polimerasa Taq, y 2,5 µl de mezcla de la reacción de la transcripción inversa. La mezcla de la reacción se recubre con aceite mineral y se somete a 35 ciclos de temperatura de: 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 55°C y 1 minuto a 72°C, seguidos de un paso de extensión final de 10 minutos a 72°C. El ADN amplificado (de 714 pb) se analiza mediante electroforesis en gel de agarosa.
- iv) Si el ECP del cultivo no es extenso, es posible que no se genere producto utilizando una sola ronda de amplificación. Para evitar estos problemas, se utiliza una prueba semi-anidada con los siguientes cebadores: 5'-TCT-TGG-AGC-CAA-ATA-GCT-CAR*-R*TC-3' (SVCF1) y 5'-CTG-GGG-TTT-CCN*-CCT-CAA-AGY*-TGY*-3' (SVCR4) según Stone *et al.* (2003).
- v) La segunda ronda de PCR se lleva a cabo en un volumen de reacción de 50 µl de tampón para PCR (KCl 50 mM, Tris/HCl 10 mM, pH 9,0, y Triton X-100 al 0,1%) 1x que contenga MgCl₂ 2,5 mM, cada una de las dNTP a una concentración de 200 µM, 50 pmol de cada uno de los cebadores para el VVPC, el R4 y el F1, 1,25 unidades de ADN polimerasa Taq, y 2,5 µl del

producto de la primera ronda. La mezcla para la reacción se recubre con aceite mineral y se somete a 35 ciclos de temperatura de: 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 55°C y 1 minuto a 72°C, seguido de un paso de extensión final de 10 minutos a 72°C. El ADN amplificado (de 606 pb) se analiza mediante electroforesis en gel de agarosa.

- vi) Todos los productos amplificados se confirman como VVPC mediante secuenciación, y el subtipo del VVPC (Ia-IId) se identifica aplicando una búsqueda mediante el programa de búsqueda de similitud de secuencias génicas BLAST (<http://www.ebi.ac.uk/blastall/index.html>) o mediante análisis filogenético utilizando las secuencias del VVPC de las que se dispone en bases de datos públicas de secuencias. El análisis filogenético se lleva a cabo utilizando una región de 426 pb que corresponda a los nucleótidos 429 a 855 del gen de la glucoproteína.
- vii) En algunos casos en que el ECP es extenso y el virus se replica a un título alto, se dispondrá de suficiente amplicón, obtenido por la PCR, como para llevar a cabo una secuenciación directa. Cuando el producto amplificado es débil, se recomienda insertar el producto en un vector de secuenciación adecuado (como pGEM-T, pCR® 4- TOPO®) antes de llevar a cabo la secuenciación. Al menos deben llevarse a cabo dos episodios de amplificación y secuenciación independientes para eliminar posibles errores de secuencia introducidos por la polimerasa Taq.

NOTA: se identificaron puntos del VVPC de hibridación al cebador mediante la alineación de las secuencias de aminoácidos publicadas correspondientes a la glucoproteína del VVPC (Björklund *et al.*, 1996; número de acceso en Genbank U18101), y a las cepas New Jersey (Gallione y Rose, 1983, Genbank accession V01214) y Piry (número de acceso en Genbank D26175) del virus de la estomatitis vesicular (VEV). A continuación, se diseñaron cebadores para que se hibridaran a las regiones que codifican los aminoácidos conservados utilizando la secuencia del VVPC publicada (Björklund *et al.*, 1996) a modo de esqueleto, e introduciendo bases degeneradas en los extremos 3', porque hay que contar con posibles diferencias en el uso del codón. Se han utilizado los códigos IUB adecuados cuando ha sido necesario y se indican mediante un asterisco (*).

4.3.1.2.4. Purificación del agente

El virus se puede purificar como describieron Hill *et al.* (1975).

- i) Se recoge medio de cultivos celulares infectados.
- ii) Se clarifica mediante centrifugación a 2.000 **g** durante 15 minutos a 4°C. Se retira el sobrenadante.
- iii) Se sedimenta el virus centrifugando el sobrenadante a 40.000 **g** durante 1 hora.
- iv) Se retira y desecha el sobrenadante. Se vuelve a suspender el sedimento en un pequeño volumen de PBS o TNE (Tris 0,01 M, NaCl 0,1 M, ácido etilendiaminotetraacético 1 mM, pH 7,2). El volumen dependerá de la cantidad original de medio de cultivo celular y del tamaño del tubo utilizado para crear el gradiente. Si los líquidos sobrenadantes se han centrifugado en varios tubos, se combinan los sedimentos resuspendidos.
- v) Se prepara un gradiente de sacarosa al 15–45% en el tampón utilizado en el paso iv.
- vi) Se recubren con cuidado los sedimentos resuspendidos y se centrifugan a 40.000 **g** durante 2 horas a 4°C.
- vii) En el gradiente debe ser visible una banda opalescente de virus. Se recoge la banda y se diluye al menos a una décima parte con el tampón que se está utilizando.
- viii) Se centrifuga a 40.000 **g** durante 2 horas a 4°C.
- ix) Se vuelve a suspender el sedimento en el tampón que se está utilizando.

4.3.2. Métodos serológicos

Los peces producen una respuesta inmunitaria tras la infección por el VVPC, y esta se ha estudiado principalmente mediante un seguimiento del desarrollo de anticuerpos. La respuesta humoral resulta influida por la temperatura del agua. Tras la infección por el VVPC a temperaturas bajas, como de 10°C, es posible que no se detecten anticuerpos, o que estos se encuentren a títulos bajos y que tarden varias semanas en desarrollarse, mientras que a 20°C, los anticuerpos se desarrollan antes (en una semana), y puede haber títulos altos (Dixon, 2008). La duración de la respuesta humoral no se conoce, pero se han detectado anticuerpos hasta 1 año tras la infección natural en una pesquería, y hasta más de 2 años tras una infección experimental (observaciones no publicadas). La detección de anticuerpos neutralizantes se ha utilizado en muchos estudios sobre el virus, pero los ELISA son más sensibles. Dixon *et al.* (1994) desarrollaron un ELISA de competición, que es aplicable a la detección de anticuerpos en gran variedad de hospedadores.

La idoneidad de la detección de anticuerpos se ha explicado en los apartados 3.5 y 4.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

Los métodos actualmente disponibles para la vigilancia dirigida y el diagnóstico de la VPC se detallan en la Tabla 5.1. Las denominaciones utilizadas en la Tabla indican: a = el método es el recomendado por razones de disponibilidad, utilidad y especificidad y sensibilidad de diagnóstico; b = el método es estándar, con buena sensibilidad y especificidad de diagnóstico; c = el método tiene aplicación en algunas situaciones, pero el coste, la precisión u otros factores limitan seriamente su aplicación; y d = el método no se recomienda actualmente para este fin. Esta clasificación es de alguna forma subjetiva ya que la idoneidad implica cuestiones de fiabilidad, sensibilidad, especificidad y utilidad. Aunque no todas las pruebas incluidas en las categorías a o b se han sometido a estandarización y validación formales, su naturaleza sistemática y el hecho de que se hayan usado generalmente sin resultados dudosos las hace aceptables.

Tabla 5.1. Métodos para la vigilancia dirigida y el diagnóstico

Método	Vigilancia dirigida		Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
	Juveniles	Adultos		
Signos macroscópicos	d	d	b	d
Histopatología	d	d	b	c
ME de transmisión	d	d	d	d
Aislamiento en cultivo celular	a	a	a	a
Prueba para el antígeno vírico	d	d	a	c
Prueba para los anticuerpos del pez contra el virus	c	c	c	d
RT-PCR	c	c	a	a
Secuenciación	na	na	a	a

ME = microscopía electrónica; RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa; na = no es aplicable.

NOTA: el resultado del aislamiento en cultivo celular solo se puede considerar preliminar, hasta que la identidad del virus se haya confirmado por un método adecuado.

Se han descrito cuatro genogrupos de rabdovirus (Stone *et al.*, 2003): el genogrupo I (VVPC), el genogrupo II (rabdovirus de la carpa herbívora), el genogrupo III (rabdovirus de los alevines de lucio) y el genogrupo IV (rabdovirus de la tenca). Análisis posteriores también han mostrado que el genogrupo del VVPC podía subdividirse a su vez en al menos cuatro subgenogrupos. Anticuerpos dirigidos contra el VVPC reaccionan de forma cruzada en distintos grados con todos los rabdovirus de los otros tres genogrupos. La capacidad de confirmar el VVPC en base a los resultados de pruebas serológicas, como el ELISA, la IFAT o la neutralización sérica, depende de la especificidad de los anticuerpos utilizados. Los resultados de estas pruebas serológicas solo pueden aceptarse como confirmativos de la presencia del VVPC si los antiseros utilizados han sido validados como detectores del virus en los cuatro subgenogrupos del genogrupo I y no reaccionan de forma cruzada con cepas de los otros tres genogrupos.

Muchos laboratorios de diagnóstico se han topado con dificultades a la hora de obtener anticuerpos contra el VVPC que sean adecuados para su uso en pruebas serológicas y han pasado a los kits comerciales de pruebas. Para la identificación del VVPC se dispone de dos kits comerciales, el kit TestLine ELISA (TestLine, Brno, República Checa) y el kit Bio-X IFAT (Bio-X Diagnostics, Jemelle, Bélgica). Recientemente, Dixon y Longshaw (2005) han evaluado la especificidad de las pruebas para la detección de cepas del virus de los genogrupos I, II, III y IV, y han observado que el TestLine ELISA, en el que se utiliza un anticuerpo policlonal de conejo, es inespecífico y no permite distinguir el VVPC de los virus de los otros tres genogrupos. Por el contrario, el kit Bio-X IFAT, en el que se utiliza un

anticuerpo monoclonal de ratón, es demasiado específico y solo permite detectar cepas del VVPC de uno de los cuatro genogrupos del VVPC. Estos kits comerciales de pruebas pueden servir para obtener un diagnóstico provisional de la VPC, pero los problemas de especificidad limitan mucho su aplicación para un diagnóstico confirmativo.

Para obtener una identificación confirmativa del VVPC se recomienda utilizar RT-PCR y análisis de la secuencia de nucleótidos de los productos de la PCR.

6. Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de viremia primaveral de la carpa

El método de vigilancia de poblaciones de peces susceptibles para la declaración de ausencia de VPC es la inoculación de cultivos celulares con extractos de tejido (como se describe en el apartado 4.3.1.2.1 anterior), para demostrar la ausencia del virus.

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

El VVPC debe considerarse una causa de enfermedad cuando tienen lugar mortalidades rápidas y en cantidades importantes en una población de una especie susceptible de peces, en concreto si cursa con signos clínicos de la VPC.

Un caso sospechoso de VPC se define como la presencia de signos clínicos típicos de la enfermedad en una población de peces susceptibles O BIEN como la aparición de histopatología típica en cortes de tejido O BIEN como la aparición de ECP típico en cultivos celulares sin identificación del agente causal O BIEN como un único resultado positivo en una de las pruebas de diagnóstico descritas arriba.

7.2. Definición de caso confirmado

El primer caso de enfermedad en una nueva zona, o en una zona donde ha habido casos de VPC anteriormente pero donde no ha habido ninguno a lo largo de un periodo de vigilancia de 2 años, se denomina caso índice. Un caso índice confirmado se define como un caso sospechoso que ha producido un ECP típico en cultivos celulares con la posterior identificación del agente causal mediante una de las pruebas serológicas utilizando antisueros validados, o RT-PCR más secuenciación, descritas arriba, O BIEN un segundo resultado positivo en una prueba diagnóstica independiente y distinta de entre las descritas arriba. Si se utiliza una prueba serológica, los antisueros deben ser “adecuados para el fin deseado” como se indica en el apartado 5. Si se utiliza RT-PCR, el producto obtenido debe secuenciarse con el fin de confirmar el VVPC; si no, el caso solo puede considerarse sospechoso de VPC.

Durante estudios de seguimiento tras un caso índice confirmado, un caso se puede confirmar mediante la mera RT-PCR con secuenciación.

8. Bibliografía

AHNE W. (1976). Untersuchungen über die Stabilität des karpfenpathogenen Virusstammes 10/3. *Fisch und Umwelt*, **2**, 121–127.

AHNE W. (1982). Vergleichende Untersuchungen über die Stabilität von vier fischpathogenen Viren (VHSV, PFR, VVPC, IPNV). *Zbl. Vet. Med. B*, **29**, 457–476

AHNE W. (1986). Unterschiedliche biologische Eigenschaften 4 cyprinidenpathogener Rhabdovirusisolate. *J. Vet. Med. B*, **33**, 253–259.

AHNE W., BJORKLUND H.V., ESSBAUER S., FIJAN N., KURATH G. & WINTON J.R. (2002). Spring viremia of carp (VPC). *Dis. aquat. Org.*, **52**, 261–272.

AHNE W. & HELD C. (1980). Untersuchungen über die viruzide Wirkung von Actomar[®] K₃₀ auf fischpathogene Viren. *Tierärztl. Umsch.*, **35**, 308–318.

AHNE W., KURATH G. & WINTON J. (1998). A ribonuclease protection assay can distinguish spring viremia of carp virus from pike fry rhabdovirus. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **18**, 220–224.

- BASIC A., SCHACHNER O., BILIC I. & HESS M. (2009). Phylogenetic analysis of spring viraemia of carp virus isolates from Austria indicates the existence of at least two subgroups within genogroup Id. *Dis. Aquat. Org.*, **85**, 31–40.
- BJÖRKLUND H.V., HIGMAN K.H. & KURATH G. (1996). The glycoprotein genes and gene junctions of the fish rhabdoviruses spring viremia of carp virus and hirame rhabdovirus – analysis of relationships with other rhabdoviruses. *Virus Res.*, **42**, 65–80.
- CARSTENS E.B. (2010). Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009). *Arch. Virol.*, **155**, 133–146.
- DIXON P.F. (2008). Virus diseases of cyprinids. In: Fish Diseases, Vol. 1. Eiras J.C., Segner H., Wahli, T. & Kapoor, B.G. eds. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, USA, 87–184.
- DIXON P.F., HATTENBERGER-BAUDOUY A.-M. & WAY K. (1994). Detection of carp antibodies to spring viraemia of carp virus by a competitive immunoassay. *Dis. Aquat. Org.*, **19**, 181–186.
- DIXON P.F. & LONGSHAW C.B. (2005). Assessment of commercial test kits for identification of spring viraemia of carp virus. *Dis. Aquat. Org.*, **67**, 25–29.
- EMMENEGGER E.J. & KURATH G. (2008). DNA vaccine protects ornamental koi (*Cyprinus carpio koi*) against North American spring viremia of carp virus. *Vaccine*, **26**, 6415–6421.
- FIJAN N. (1988). Vaccination against spring viraemia of carp. In: Fish Vaccination, Ellis A.E., ed. Academic Press, London, UK, 204–215.
- GALLIONE C.J. & ROSE J.K. (1983). Nucleotide sequence of a clone encoding the entire glycoprotein from the New Jersey serotype of vesicular stomatitis virus. *J. Virol.*, **46**, 162–169.
- GOODWIN A.E., PETERSON J.E., MEYERS T.R. & MONEY D.J. (2004). Transmission of exotic fish viruses: The relative risks of wild and cultured bait. *Fisheries*, **29**, 19–23.
- HAENEN O.L.M. & DAVIDSE A. (1993). Comparative pathogenicity of two strains of pike fry rhabdovirus and spring viremia of carp virus for young roach, common carp, grass carp and rainbow trout. *Dis. Aquat. Org.*, **15**, 87–92.
- HAGHIGHI KHIABANIAN ASL A., AZIZZADEH M., BANDEHPUR M., SHARIFNIA Z. & KAZEMI B. (2008a). The first report of VPC from Indian carp species by PCR and histopathologic methods in Iran. *Pakistan J. Biol. Sci.*, **11**, 2675–2678.
- HAGHIGHI KHIABANIAN ASL A., BANDEHPUR M., SHARIFNIA Z. & KAZEMI B. (2008b). The first report of spring viraemia of carp in some rainbow trout propagation and breeding by pathology and molecular techniques in Iran. *Asian J. Anim. Vet. Adv.*, **3**, 263–268.
- HILL B.J., UNDERWOOD B.O., SMALE C.J. & BROWN F. (1975). Physico-chemical and serological characterization of five rhabdoviruses infecting fish. *J. Gen. Virol.*, **27**, 369–378.
- HOFFMANN B., SCHÜTZE H. & METTENLEITER T.C. (2002). Determination of the complete genomic sequence and analysis of the gene products of the virus of Spring Viremia of Carp, a fish rhabdovirus. *Virus Res.*, **84**, 89–100.
- JEREMIC S., DOBRILA J.-D. & RADOSAVLJEVIC V. (2004). Dissemination of spring viraemia of carp (VPC) in Serbia during the period 1992–2002. *Acta Vet. (Beograd)*, **54**, 289–299.
- JOHNSON M.C., MAXWELL J.M., LOH P.C. & LEONG J.-A.C. (1999). Molecular characterization of the glycoproteins from two warm water rhabdoviruses: snakehead rhabdovirus (SHRV) and rhabdovirus of penaeid shrimp (RPS)/spring viremia of carp virus (VVPC). *Virus Res.*, **64**, 95–106.
- JØRGENSEN P.E.V., OLESEN N.J., AHNE W. & LORENZEN N. (1989). VVPC and PFR viruses: Serological examination of 22 isolates indicates close relationship between the two fish rhabdoviruses. In: Viruses of Lower Vertebrates, Ahne W. & Kurstak E., eds. Springer, Berlin, Germany, 349–366.
- KINKELIN P. DE & LE BERRE M. (1974). Rhabdovirus des poissons II. Propriétés *in vitro* du virus de la virémie printanière de la carpe. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, **125 A**, 113–124.
- KIRYU I., SAKAI T., KURITA J. & IIDA T. (2007). Virucidal effect of disinfectants on spring viremia of carp virus. *Fish Pathol.*, **42**, 111–113.

KOUTNÁ M., VESELY T., PSIKAL I. & HULOVÁ J. (2003). Identification of spring viraemia of carp virus (VVPC) by combined RT-PCR and nested PCR. *Dis. Aquat. Org.*, **55**, 229–235.

LU Y. & LOH P.C. (1994). Infectivity studies of rhabdovirus in the penaeid blue shrimp. *Aquacult. Int.*, **2**, 123–127.

SHEPPARD A.M., LEDEUFF R.-M., MARTIN P.D., WOOLFORD G., WAY K. & STONE D.M. (2007). Genotyping spring viraemia of carp virus and other piscine vesiculo-like viruses using reverse hybridisation. *Dis. Aquat. Org.*, **76**, 163–168.

SOLIMAN M.K., ABOEISA M.M., MOHAMED S.G. & SALEH W.D. (2008). First record of isolation and identification of spring viraemia of carp virus from *Oreochromis niloticus* in Egypt. 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture 2008, 1287–1306.

STONE D.M., AHNE W., DENHAM K.D., DIXON P.F., LIU C.T.Y., SHEPPARD A.M., TAYLOR G.R. & WAY K. (2003). Nucleotide sequence analysis of the glycoprotein gene of putative spring viraemia of carp virus and pike fry rhabdovirus isolates reveals four genogroups. *Dis. Aquat. Org.*, **53**, 203–210.

TENG Y., LIU H., LV J.Q., FAN W.H., ZHANG Q.Y. & QIN Q.W. (2007). Characterization of complete genome sequence of the spring viremia of carp virus isolated from common carp (*Cyprinus carpio*) in China. *Arch. Virol.*, **152**, 1457–1465.

WOLF K. (1988). Spring viraemia of carp. In: Fish viruses and fish viral diseases. Cornell University Press, Ithaca, USA, 191–216.

ZHANG N.Z., ZHANG L.F., JIANG Y.N., ZHANG T. & XIA C. (2009). Molecular analysis of spring viraemia of carp virus in China: A fatal aquatic viral disease that might spread in East Asian. *PLoS ONE*, **4**, pp 1–9.

*
* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la Viremia primaveral de la carpa (puede consultarse la lista actualizada en la Tabla del final de este *Manual Acuático* o en la página web de la OIE: www.oie.int).

SEPTICEMIA HEMORRÁGICA VIRAL

1. Ámbito de aplicación

A efectos de este capítulo, la septicemia hemorrágica viral (SHV) se considera una enfermedad causada por el virus de la septicemia hemorrágica viral (VSHV), sinónimo: virus Egtved).

La SHV es una enfermedad de la trucha arco iris de piscifactoría, el rodaballo de piscifactoría y el falso halibut del Japón, así como de una amplia variedad de especies salvajes tanto de agua dulce como marina (EFSA, 2008; Meyers y Winton, 1995; Skall *et al.*, 2005) causada por el VSHV, un virus que pertenece al género *Novirhabdovirus*, de la familia Rhabdoviridae (Walker *et al.*, 2000). Todas las cepas del virus de la SHV pueden identificarse mediante pruebas inmunquímicas utilizando el anticuerpo monoclonal IP5B11 (Lorenzen *et al.*, 1988).

Los peces enfermos pueden presentar signos clínicos inespecíficos en las primeras fases de la infección, como una aparición rápida de mortalidad (que puede alcanzar el 100% de la población en los alevines), letargia, oscurecimiento de la piel, exoftalmia, anemia (branquias pálidas), hemorragias en la base de las aletas, las branquias, los ojos y la piel, y una distensión abdominal debida a edema en la cavidad peritoneal. En el estado crónico de la infección, los peces afectados en general no presentan signos externos. La SHV también puede causar un cuadro nervioso, que se caracteriza por una natación muy anómala, como constantes movimientos fugaces y/o en espiral. Los criterios de diagnóstico confirmativo se resumen en el apartado 7 de este capítulo.

2. Información sobre la enfermedad

2.1. Factores del agente

2.1.1. El agente patógeno, cepas del agente

El agente patógeno de la SHV es un rhabdovirus (VSHV) que pertenece al género *Novirhabdovirus*, de la familia Rhabdoviridae, que también incluye el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (VNHI) y el rhabdovirus Hiram del falso halibut del Japón (*Paralichthys olivaceus*). Los viriones tienen forma de bala (miden unos 70 nm de diámetro y 180 nm de longitud), contienen un genoma de ARN de sentido negativo y monocatenario de unos 11.000 nucleótidos y poseen una envoltura que contiene la glucoproteína de membrana, que es el antígeno de superficie contra el cual se generan los anticuerpos neutralizantes. El genoma codifica seis proteínas: una nucleoproteína, N; una fosfoproteína, P (antes se denominaba M1); una proteína de la matriz, M (antes se denominaba M2); una glucoproteína, G; una proteína no virión, NV, y una polimerasa, L (Walker *et al.*, 2000).

La trucha arco iris, en la que el VSHV puede causar graves brotes de la enfermedad, es un hospedador típico del virus, pero muchas de las demás especies de peces, tanto marinas como de agua dulce, también son susceptibles a la enfermedad. Se han notificado brotes naturales en rodaballo de piscifactoría (Ross *et al.*, 1994; Schlotfeldt *et al.*, 1991) y en falso halibut del Japón tanto de piscifactoría como salvaje (Isshiki *et al.*, 2001; Takano *et al.*, 2000). Se ha observado mortalidad por una infección natural en especies de peces marinos de vida libre a lo largo de la costa del Pacífico de Norteamérica (Meyers *et al.*, 1999; Traxler *et al.*, 1999). Además, se ha observado que ciertas cepas del virus aisladas en arenque del Pacífico son patógenas en el arenque del Pacífico en condiciones experimentales (Kocan *et al.*, 1997). Skall *et al.*, 2005 ha publicado una revisión sobre este tema. Asimismo, se han producido brotes de SHV en especies salvajes de agua dulce de los Grandes Lagos (Elsayed *et al.*, 2006; Groocock *et al.*, 2007; Lumsden *et al.*, 2007).

La gran variedad de hospedadores y las importantes diferencias en cuanto a patogenicidad en cada especie hospedadora pueden causar problemas a los programas de control de la SHV, que se basan principalmente en la protección de la importante industria de producción de la trucha arco iris. El principal problema es decidir si el hallazgo de VSHV marino en peces de vida libre en una zona considerada libre del VSHV debe comportar la retirada de dicha calificación. No obstante, se ha observado en una gran parte de Europa que la SHV en peces de vida libre en el medio marino afecta al estado de ausencia reconocida de SHV solo en unos pocos casos. No obstante, un brote reciente en trucha arco iris de Noruega se debió al genotipo III del VSHV, un genotipo marino hasta entonces no considerado patógeno en la trucha arco iris (Dale *et al.*, 2009), lo cual indica que las cepas marinas también son importantes para la producción de trucha arco iris.

El anticuerpo monoclonal (MAb) IP5B11 (Lorenzen *et al.*, 1988) reacciona con todas las cepas del VSHV de todos los genotipos y serotipos conocidos.

La mayoría de anticuerpos policlonales generados contra el VSHV de Tipo I (DK-F1) presentan reacción cruzada con todas las cepas conocidas del VSHV en la prueba de la inmunofluorescencia indirecta (IFAT) y en los ensayos de inmunoenzimología (ELISA). Sin embargo, en la prueba de la neutralización vírica (VN), el VSHV se puede clasificar en tres subgrupos en función del patrón de neutralización frente a un conjunto de cuatro MABs neutralizantes y un anticuerpo policlonal (Olesen *et al.*, 1993). Así, el VSHV tiene en común varios epítomos antigénicos, aunque los serogrupos no se correlacionan con los genotipos identificados mediante análisis de la secuencia del ácido nucleico. Se han desarrollado MABs que reaccionan específicamente con distintos grupos de VSHV, como por ejemplo cepas del genogrupo IVa y del genogrupo Ib americanas/japonesas (Ito *et al.*, 2010; Ito *et al.*, manuscrito en prep.).

La forma más discriminatoria de tipificar el VSHV es mediante la secuenciación del ácido nucleico. Comparaciones entre las secuencias de varias cepas del VSHV realizadas por distintos laboratorios han puesto de manifiesto que las diferencias genéticas parecen estar más relacionadas con la ubicación geográfica que con el año de aislamiento o con la especie hospedadora (Skall *et al.*, 2005). Se han clasificado cuatro genotipos principales, en base a la secuencia de toda la longitud y/o parte del gen de la nucleoproteína, N (Einer-Jensen *et al.*, 2005; Snow *et al.*, 1999; 2004), de la glucoproteína, G (Einer-Jensen *et al.*, 2004; 2005) y de la proteína no virión, NV (Einer-Jensen *et al.*, 2005):

- Genotipo I: Varios sublinajes (Ia-Ie) que contienen cepas de VSHV europeas de agua dulce, cepas de la zona del Mar Negro y un grupo de cepas marinas del Mar Báltico, los estrechos de Kattegat y de Skagerrak, el Mar del Norte y el Canal de la Mancha. Recientemente se han descubierto cepas del Genotipo Ib tan al norte como a la latitud 70°N, cerca del Cabo Norte, en Noruega (www.fishpathogens.eu, informe nº 2902).
- Genotipo II: Un grupo de cepas del Mar Báltico
- Genotipo III: Cepas de la parte del atlántico del Mar del Norte (desde el Cabo Flemish (López-Vázquez *et al.*, 2006) a la costa noruega (Dale *et al.*, 2009), el Mar del Norte y los estrechos de Skagerrak y de Kattegat.
- Genotipo IV: Cepas de Norteamérica y japonesas/coreanas (dos sublinajes, IVa y IVb [Elsayed *et al.*, 2006]).

El genotipo I se divide en varios sublinajes, y las cepas marinas de peces salvajes se encuentran en el sublinaje Ib. La mejor resolución de sublinajes del genotipo I se obtiene al analizar el gen completo que codifica la glucoproteína, G (Einer-Jensen *et al.*, 2005).

Dado que el genotipo I incluye VSHV aislados de peces marinos salvajes, así como cepas que causan mortalidad en trucha arco iris de Europa continental, se ha sugerido una posible relación entre los tipos de agua dulce y de agua marina (Skall *et al.*, 2005).

Todas las cepas japonesas y otras cepas asiáticas excepto una se clasifican en el genotipo IVa americano. La otra cepa se clasifica en el genotipo IB europeo tradicional (Nishizawa *et al.*, 2002). Se considera que esta cepa se ha introducido procedente de algún lugar de fuera de Japón.

En Norteamérica, se han encontrado al menos dos sublinajes: el genotipo IVa en la costa del Pacífico y el genotipo IVb en la costa del Atlántico y en la zona de los Grandes Lagos.

2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

La supervivencia del VSHV fuera del hospedador depende de las condiciones físico-químicas del medio acuoso (Ahne, 1982) y de la temperatura: el virus sobrevive durante periodos más largos a 4°C que a 20°C (Parry y Dixon, 1997). Se ha documentado que el virus persiste en agua dulce durante 28–35 días a 4°C (Parry y Dixon, 1997) y se ha observado que es infectivo durante 1 año a 4°C en agua dulce filtrada (Hawley y Garver, 2008). Además, puede durar más tiempo si se añaden sustancias orgánicas al agua, como líquidos ováricos o productos hemáticos, como suero bovino. En agua dulce sin tratar a 15°C, el tiempo necesario para una inactivación del 99,9% fue de 13 días, pero en agua marina el virus se inactiva en un plazo de 4 días (Hawley y Garver, 2008). En otros estudios en los que se ha utilizado agua marina a 15°C, la infectividad del virus se ha reducido en un 50% pasadas 10 horas, pero se podía seguir recuperando pasadas 40 horas (Kocan *et al.*, 2001).

La congelación de peces infectados por el VSHV a temperaturas de congelación comerciales y la posterior descongelación no matan completamente el virus, pero reducen su infectividad o título en un

90% o más (Artkush *et al.*, 2006). Estos autores observaron que el virus infeccioso restante se encontraba en el tejido de los peces y no perdido en el agua descongelada procedente del pez congelado.

2.1.3. Estabilidad del agente (métodos eficaces de inactivación)

El VSHV es sensible a varios desinfectantes de uso frecuente. Pueden consultarse las revisiones de Bovo *et al.*, 2005b; Wolf, 1988.

2.2. Factores del hospedador

Los reservorios del VSHV son peces infectados clínicamente, así como portadores subclínicos que pueden ser peces de piscifactoría, asilvestrados o salvajes. Existen varios factores que influyen en la susceptibilidad a la SHV. En la trucha arco iris se ha observado una variabilidad genética de la susceptibilidad (Henryon *et al.*, 2002a; 2002b), y la edad del pez parece tener cierta importancia (cuanto más joven es el pez, más susceptibilidad presenta). En general, los peces de mayor edad que presentan una alta mortalidad debida a la SHV nunca antes han contactado con la enfermedad.

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Durante las dos últimas décadas, se ha aislado VSHV de varias especies de peces marinos y de agua dulce (véanse las Tablas 2.1 y 2.2). (En la Tabla 2.1 se expone una lista de las especies para las cuales existen pruebas científicas concluyentes de susceptibilidad, y en la Tabla 2.2., una lista de las especies para las cuales existen ciertos indicios de susceptibilidad). Es probable que el VSHV sea endémico en poblaciones de peces en grandes zonas del hemisferio norte, de aguas templadas. Hasta ahora, se ha aislado el VSHV de unas 80 especies diferentes de peces de todo el hemisferio norte, incluida Norteamérica, Asia y Europa. Se ha observado que varias especies son susceptibles al VSHV en condiciones experimentales. El número de posibles especies hospedadoras aumenta a medida que aumentan los esfuerzos por llevar a cabo un seguimiento. No obstante, la especie de pez de piscifactoría más susceptible es la trucha arco iris de genotipo Ia, aunque también se ha observado que la SHV causa mortalidad en rodaballo de piscifactoría y en el falso halibut del Japón. En los peces salvajes, durante los últimos años se han producido varias extinciones en la zona de los Grandes Lagos de EE.UU. y Canadá, que han afectado al menos a 28 especies de peces de agua dulce. Todas las cepas del VSHV de estos brotes pertenecían al genotipo IVb (USDA; Thompson *et al.*, 2011).

Tabla 2.1. Especies de peces para las cuales existen pruebas concluyentes de susceptibilidad (Autoridad Europea en Seguridad Alimentaria [EFSA], 2008)

Especies susceptibles según las normas de la Autoridad Europea en Seguridad Alimentaria (EFSA)			
Orden	Familia	Nombre común	Nombre científico
Salmoniformes (Salmones)	Salmonidae (salmónidos)	Trucha arco iris	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
		Salmón real	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>
		Salmón coho	<i>Oncorhynchus kisutch</i>
		Salmón del Atlántico	<i>Salmo salar</i>
		Trucha marina	<i>Salmo trutta</i>
		Tímalo	<i>Thymallus thymallus</i>
		Lavareto* ¹	<i>Coregonus lavaretus</i>
		Coregonos	<i>Coregonus</i> spp.
		Trucha arco iris x Coho* ¹	<i>O. mykiss</i> × <i>O. kisutch</i>
		Trucha arco iris x salvelino* ¹	<i>O. mykiss</i> × <i>S. fontinalis</i> triploid
		Trucha arco iris x Trucha alpina* ¹	<i>O. mykiss</i> × <i>S. alpinus</i> triploid
Esociformes	Esocidae	Lucio de aletas rojas	<i>Esox masquinongy</i>
		Lucio	<i>Esox lucius</i>
Clupeiformes	Clupeidae	Arenque del Atlántico	<i>Clupea harengus</i>
		Arenque del Pacífico	<i>Clupea pallasii</i>
		Sardina	<i>Sardinops sagax</i>
		Espadín	<i>Sprattus sprattus</i>

Especies susceptibles según las normas de la Autoridad Europea en Seguridad Alimentaria (EFSA)			
Orden	Familia	Nombre común	Nombre científico
Gadiformes (bacalao)	Gadidae	Bacalao del Atlántico	<i>Gadus morhua</i>
		Capellán	<i>Trisopterus minutus</i>
		Plegonero	<i>Merlangius merlangus</i>
		Bacaladilla	<i>Micromesistius poutassou</i>
		Faneca noruega	<i>Trisopterus esmarkii</i>
		Colín de Alaska	<i>Theragra chalcogramma</i>
	Lotidae (merluzas y lotas)	-	<i>Enchelyopus cimbrius</i>
		Lota	<i>Lota lota</i>
	Merlucciidae	Merluza del Pacífico Norte	<i>Merluccius productus</i>
Pleuronectiformes (peces planos)	Pleuronectidae	Lenguadina	<i>Limanda limanda</i>
		Platija europea	<i>Platichthys flesus</i>
		Solla europea	<i>Pleuronectes platessa</i>
		Fletán negro	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>
		Halibut* ¹	<i>Hippoglossus hippoglossus</i> ²
	Scophthalmidae	Turbot	<i>Scophthalmus maximus</i>
	Paralichthyidae	Falso halibut del Japón	<i>Paralichthys olivaceus</i>
Osmeriformes	Argentidae	Argentina	<i>Argentina sphyraena</i>
	Osmeridae (eperlanos)	Eperlano del Pacífico	<i>Hypomesus pretiosus</i>
Perciformes (con forma de perca)	Ammodytidae	-	<i>Ammodytes hexapterus</i>
		Lanzones	<i>Ammodytes</i> spp.
		Lanzón del Pacífico	<i>Ammodytes personatus</i>
	Gobiidae	-	<i>Pomatoschistus minutus</i>
		Gobio pintado	<i>Neogobius melanostomus</i>
	Embiotocidae	-	<i>Cymatogaster aggregata</i>
	Sciaenidae	-	<i>Aplodinotus grunniens</i>
	Scombridae	Estornino	<i>Scomber japonicus</i>
	Percidae (percas)	Perca canadiense	<i>Perca flavescens</i> ³
	Moronidae (lubinas)	Lubina* ¹	<i>Dicentrarchus labrax</i>
Gasterosteiformes		Espinosillo	<i>Gasterosteus aculeatus</i>
Cypriniformes (carpas)	Cyprinidae (chispas o carpas)	Piscardo* ¹	<i>Pimephales promelas</i> ⁴
Petromyzontiformes (lamprea)	Petromyzontidae (lamprea)	Lamprea de río	<i>Lampetra fluviatilis</i> ⁵

*¹Prueba de infección por inmersión; ± ²Skall et al., 2005; ³Kane-Sutton et al., 2010; ⁴Al-Hussiney et al., 2010; ⁵Gadd et al., 2010.

Table 2.2. Especies de peces para las cuales existe algún indicio de susceptibilidad (EFSA, 2008)

Orden	Familia	Nombre común	Nombre científico
Salmoniformes (Salmones)	Salmonidae (salmónidos)	Keta* ³	<i>Oncorhynchus keta</i>
		Salmón rojo* ³	<i>Oncorhynchus nerka</i>
		Trucha lacustre* ^{1, 2}	<i>Salvelinus namaycush</i> ⁴
		Trucha de arroyo* ^{1, 2}	<i>Salvelinus fontinalis</i> ⁴
		Coregono de lago	<i>Coregonus clupeaformis</i>

Orden	Familia	Nombre común	Nombre científico
		_*2	<i>Oncorhynchus aguabonita</i>
		Trucha alpina*1	<i>Salvelinus alpinus</i>
		_*2	<i>Salvelinus namaycush</i> × <i>Salvelinus fontinalis</i> ⁴
		*1	<i>O. mykiss</i> × <i>S. namaycush</i>
		*1	<i>O. mykiss</i> × <i>O. kisutch</i> triploid
Clupeiformes	Clupeidae	Sábalo molleja	<i>Dorosoma cepedianum</i>
Gadiformes (bacalao)	Gadidae	Bacalao del Pacífico	<i>Gadus macrocephalus</i>
		Eglefino	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>
		-	<i>Microgadus proximus</i>
	Lotidae (merluzas y lotas)	Lota	<i>Lota lota</i>
Siluriformes (bagres)	Ictaluridae (bagres de agua dulce de Norteamérica)	Bagre pardo	<i>Ictalurus nebulosus</i>
		Bagre de canal	<i>Ictalurus punctatus</i>
Osmeriformes	Osmeridae (eperlanos)	Eulacón	<i>Thaleichthys pacificus</i>
Perciformes (con forma de perca)	Centrarchidae (peces sol)	Perca atruchada	<i>Micropterus salmoides</i>
		Perca atruchada*2	<i>Micropterus salmoides</i> ⁴
		Perca americana de boca pequeña	<i>Micropterus dolomieu</i>
		-	<i>Lepomis macrochirus</i>
		Perca sol	<i>Lepomis gibbosus</i>
		Perca plateada	<i>Pomoxis nigromaculatus</i>
		-	<i>Ambloplites rupestris</i>
	Percidae (percas)	Lucioperca americana	<i>Sander vitreus</i>
		Perca	<i>Perca fluviatilis</i>
	Moronidae (lubinas de aguas templadas)	-	<i>Morone chrysops</i>
		Lubina estriada	<i>Morone saxatilis</i>
		Lubina blanca	<i>Morone americana</i>
		_*2	<i>Acanthopagrus schlegelii</i>
		Dorada del Japón*2	<i>Pagrus major</i>
	Sparidae	Dorada	<i>Sparus aurata</i>
	Serranidae	Mero de pintas rojas*2	<i>Epinephelus akaara</i>
	Carangidae	Medregal del Japón*2	<i>Seriola quinqueradiata</i>
	Sciaenidae	_*3	<i>Larimichthys polyactis</i> ⁵
	Sparidae	_*3	<i>Dentex tumifrons</i> ⁵
	Trichiuridae	Pez sable*3	<i>Trichiurus lepturus</i> ⁵
	Stromateidae	-	<i>Pampus argenteus</i> ⁵
Scorpaeniformes (rascacios y platicefálicos)	Anoplopomatidae (bacalao negro)	Bacalao negro	<i>Anoplopoma fimbria</i>
	Sebastidae (gallineta, trama y <i>Sebastes</i> spp.)	-	<i>Sebastes inermis</i>
		_*2	<i>Sebastes schlegelii</i>
	Liparidae	_*3	<i>Liparis tessellatus</i> ⁵
	Scorpaenidae	_*3	<i>Scorpaena izensis</i> ⁵
Anguilliformes	Anguillidae	Anguila	<i>Anguilla anguilla</i>
		Anguila americana*3	<i>Anguilla rostrata</i> ⁶

Orden	Familia	Nombre común	Nombre científico
Cyprinodontiformes	Fundulidae	Fúndulo	<i>Fundulus heteroclitus</i>
Gasterosteiformes	Aulorhynchidae	-	<i>Aulorhynchus flavidus</i>
Cypriniformes (carpas)	Catostomidae	-	<i>Moxostoma anisurum</i>
		-	<i>Moxostoma macrolepidotum</i>
	Cyprinidae (chispas o carpas)	-	<i>Barbus graellsii</i>
		-	<i>Pimephales notatus</i>
		-	<i>Notropis atherinoides</i>
		-	<i>Notropis hudsonius</i>
		Boga de río	<i>Chondrostoma polylepis</i>
		Pez cebra* ²	<i>Danio rerio</i>
		Pez rojo* ¹	<i>Carassius auratus</i>
Percopsiformes (<i>Percopsis omiscomaycus</i> , <i>Aphredoderus sayanus</i> y peces de cueva)	Percopsidae (<i>Percopsis omiscomaycus</i>)	-	<i>Percopsis omiscomaycus</i>
Pleuronectiformes (peces planos)	Soleidae	-	<i>Solea senegalensis</i>
		Lenguado senegalés* ^{1,2}	<i>Solea senegalensis</i> ⁷
	Pleuronectidae	_* ²	<i>Pleuronectes yokohamae</i>
		-	<i>Parophrys vetula</i>
		_* ³	<i>Glyptocephalus stelleri</i> ⁵
Mugiliformes	Mugilidae	Mugil	<i>Mugil cephalus</i> ⁴
		Mugil* ³	<i>Mugil cephalus</i> ⁵
Ophidiiformes	Ophidiidae	_* ³	<i>Hoplobrotula armata</i> ⁵
Carcharhiniformes	Scyliorhinidae	_* ³	<i>Scyliorhinus torozame</i> ⁵
No peces		-	<i>Myzobdella lugubris</i> ⁸
No peces		-	<i>Diporeia</i> spp. ⁹

*¹Prueba de infección por inmersión; *²Prueba de infección por inyección IP; *³solo reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR); ⁴Kim y Faisal, 2010; ⁵Lee *et al.*, 2007; ⁶Al-Hussiney *et al.*, 2011; ⁷López-Vázquez *et al.*, 2011;

⁸Faisal y Schulz, 2009; ⁹Faisal y Winters, 2011.

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

La infección por el VSHV puede causar enfermedad y mortalidad en todas las fases de vida de los peces susceptibles. La infección puede dar lugar al desarrollo de una inmunidad protectora en zonas endémicas; por tanto, la enfermedad es más abundante en poblaciones de peces jóvenes, previamente no infectados. No se conocen casos de infección de huevos de peces con el VSHV.

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

En estudios de peces salvajes marinos, se ha aislado el VSHV de la mayoría de segmentos de edad. Sin embargo, se han analizado pocos alevines, ya normalmente no se capturan durante los estudios. La mayor prevalencia del virus se ha observado en peces que vivían formando bancos, como el arenque, el espadín, la faneca noruega, etc. (Skall *et al.*, 2005).

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

En las fases sépticas de la enfermedad, el virus es abundante en todos los tejidos, incluidos piel y músculos. Los órganos diana son el riñón, el corazón y el bazo, puesto que estos son los lugares donde el virus es más abundante. En las fases crónicas, los títulos del virus pueden llegar a ser altos en el encéfalo (Smail y Snow, 2011; Wolf, 1988).

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

Algunos supervivientes de epizootias se convertirán en portadores del virus durante largos periodos de tiempo.

2.2.6. Vectores

Dado el gran número de especies susceptibles, puede suponerse que el virus es capaz de multiplicarse en una variedad suficientemente amplia de hospedadores como para no precisar vectores. No obstante, en muchas especies de peces nunca se han observado signos clínicos en ejemplares infectados.

Se ha aislado el VSHV de la sanguijuela, *Myzobdella lugubris*, y de *Diporeia* spp, en los Grandes Lagos, en Norteamérica. Por el momento no se sabe si la sanguijuela y *Diporeia* tipo camarón pueden transmitir el VSHV entre peces (Faisal y Schulz, 2009; Faisal y Winters, 2011).

El VSHV se puede transmitir por aves piscívoras, que actúan como vectores mecánicos (Olesen y Vestergård Jørgensen, 1982; Peters y Neukirch, 1986).

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

Véanse la Tablas 2.1 y 2.2, donde se indican las especies de las que se ha aislado el VSHV. Actualmente, no se dispone de suficientes datos científicos como para incluir todas las especies de los Grandes Lagos en esta lista de las consideradas susceptibles al VSHV (EFSA, 2008).

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mecanismos de transmisión

Los conocimientos sobre el mecanismo de transmisión del virus proceden principalmente de estudios de cepas del VSHV aisladas en truchas arco iris de Europa, en las cuales se ha observado una transmisión horizontal por contacto con otros peces o con agua contaminada, etc. El virus se excreta de peces infectados por la orina (Wolf, 1988) y líquidos reproductivos. La transmisión tiene lugar fácilmente en el intervalo de entre 1 y 15°C, pero puede producirse incluso a 20°C. El periodo de incubación depende de la temperatura y de la dosis infectiva, y dura 5 a 12 días a temperaturas más altas.

Durante e inmediatamente después de un brote, el virus se puede aislar fácilmente en cultivo celular (Wolf, 1988). El riñón, el corazón y el bazo son los tejidos que dan los títulos víricos más altos.

En peces portadores (clínicamente sanos), la detección del VSHV es más problemática (Skall *et al.*, 2005). El VSHV crece en varias líneas celulares de peces, entre las cuales BF-2 es la más sensible a la infección por cepas europeas de agua dulce (Skall *et al.*, 2005). Las siguientes líneas celulares, en orden decreciente de susceptibilidad, son FHM, RTG-2 y EPC (Lorenzen *et al.*, 1999), pero otras líneas celulares de peces, como CHSE-214 y SSN-1, también son susceptibles. La susceptibilidad de una línea celular a la infección dependerá de varios parámetros, como el linaje de la línea celular y diferencias en la cepa vírica; por tanto, parece ser que la línea celular EPC podría ser más susceptible a las cepas del genotipo IV del VSHV que a las cepas de tipo I, II o III (Skall *et al.*, 2005).

El estado de portador del VSHV en especies de peces de agua dulce está bien estudiado (Enzmann y Konrad, 1985; Jørgensen, 1982). El estado virológico de estos portadores dependerá de varios parámetros, como el tiempo que haya transcurrido desde la exposición inicial y la proximidad geográfica a salidas de agua procedentes de piscifactorías de peces. Desde el descubrimiento de cepas del VSHV en especies marinas, se han llevado a cabo muchos estudios en los que se ha realizado un exhaustivo muestreo de una gran variedad de especies de peces de aguas costeras de la Europa continental (Skall *et al.*, 2005), del Reino Unido (Skall *et al.*, 2005), de Norteamérica (Hedrick *et al.*, 2003) y de Asia (Kim y Park, 2004; Takano *et al.*, 2000). En estos estudios, se ha comprobado si las muestras contenían virus inoculando líneas celulares de peces. En algunos, se han combinado varias muestras y, por tanto, la determinación de la prevalencia exacta ha sido difícil. No obstante, en base al aislamiento del virus en cultivo celular y fuera cual fuera la especie de pez estudiada, la prevalencia del VSHV en especies marinas de peces muestreadas en estos estudios se ha encontrado en el intervalo de entre el 0,0% y el 16,7% (intervalo de confianza del 95%, 8,7–27,5%) (Skall *et al.*, 2005).

La enfermedad en general tiene lugar a temperaturas de entre 4°C y 14°C. A temperaturas del agua de entre 15°C y 18°C, la enfermedad en general tiene un curso rápido y poca mortalidad acumulada.

Las temperaturas del agua bajas (1-5°C) en general dan lugar a un largo curso de la enfermedad, con baja mortalidad diaria pero con una alta mortalidad acumulada. Surgen brotes de la SHV en cualquier

estación del año, pero son más frecuentes en primavera, cuando las temperaturas del agua están aumentando o fluctuando. En las revisiones de Wolf (1988) y de Smail y Snow (2011) se pueden consultar más detalles sobre este trastorno.

La transmisión tiene lugar principalmente de forma horizontal por el agua, debido a la excreción del virus con la orina (Smail y Snow, 2011). En estudios en los que se ha utilizado el diagnóstico por imagen mediante bioluminiscencia de truchas vivas infectadas con VNHI virulento recombinante, un virus muy similar al VSHV, portador de un gen indicador, ha ilustrado de forma muy clara que la replicación del virus sobre la piel del pez era muy alta (Bremont, 2005). Esto todavía no se ha estudiado en peces infectados por la SHV, pero la excreción directa del virus de la piel podría constituir una fuente de transmisión del virus (Smail y Snow, 2011).

No se dispone de indicios ni pruebas de una verdadera transmisión vertical del VSHV (Bovo *et al.*, 2005a).

2.3.2. Prevalencia

Hasta finales de los años 1980, la SHV se consideró que se restringía a la trucha arco iris de piscifactorías de la Europa continental, con el aislamiento ocasional en algunas otras especies de peces de agua dulce (como la trucha marina, el lucio [Meier y Jørgensen, 1980; Schlotfeldt y Ahne, 1988]), considerándose libres de SHV Escandinavia (excepto Dinamarca), Gran Bretaña e Irlanda. A partir de la detección y aislamiento del VSHV del salmón del Pacífico mar adentro frente a la costa norteamericana del Pacífico a finales de los años 1980, estudios posteriores han puesto de manifiesto que el VSHV tiene lugar en muchas especies de peces de piscifactoría y salvajes a lo largo de la costa norteamericana tanto del Pacífico como del Atlántico (Skall *et al.*, 2005), en la zona de los Grandes Lagos de Norteamérica (Thompson *et al.*, 2011), en mares del Reino Unido (Skall *et al.*, 2005), en el Mar Báltico, en los estrechos de Skagerrak y Kattegat (Skall *et al.*, 2005), en las aguas de Japón (Skall *et al.*, 2005), y en la zona del Mar Negro, con un genotipo le claramente diferenciado (Nishizawa *et al.*, 2006).

2.3.3. Distribución geográfica

Durante las dos últimas décadas, el VSHV se ha aislado de peces salvajes de toda la zona templada del hemisferio norte, tanto en aguas dulces como marinas (Skall *et al.*, 2005). No obstante, solo en Europa se han observado brotes de la SHV en trucha arco iris de piscifactoría, donde se sigue considerando una de las enfermedades víricas más graves en peces de acuicultura. En América, la SHV causa mortalidad principalmente en peces salvajes (Meyers y Winton, 1995; Skall *et al.*, 2005; USDA, 2007). En Asia, ha habido informes de brotes clínicos en el falso halibut del Japón de piscifactoría, así como aislamientos en especies de peces salvajes (Lee *et al.*, 2007; Skall *et al.*, 2005).

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

La mortalidad varía en función de muchas condiciones ambientales y fisiológicas, la mayoría de las cuales no están del todo determinadas. Esta enfermedad, en general es de aguas frescas o frías, y la máxima mortalidad tiene lugar a los 9-12°C. Los alevines pequeños de trucha arco iris (0,0-3 g) son más susceptibles al genotipo Ia, en los que causa mortalidades cercanas al 100%, pero todos los tamaños de la trucha arco iris pueden resultar afectados, con mortalidades que oscilan entre el 5% y el 90%. En pruebas de infección por inmersión también se ha inducido una mortalidad de hasta el 100% en arenques del Pacífico cuando se han infectado con el genotipo IVa (Skall *et al.*, 2005).

2.3.5. Factores ambientales

Se han notificado brotes de la SHV en ambientes tanto de agua dulce como de agua marina con salinidades de hasta 36 partes por mil (ppm) y a temperaturas de entre los 2°C y los 20°C. La mayoría de brotes de la enfermedad se observan en primavera, cuando las temperaturas fluctúan.

En pruebas de laboratorio se ha observado que el intervalo de temperaturas del genotipo IVb del VSHV parece ser el mismo que el del genotipo I, con un óptimo en los 9-12°C y un límite superior en los 18-20°C (Goodwin y Merry, 2011).

2.4. Control y prevención

En ausencia de tratamiento antivíricos, los métodos de control de la SHV actualmente se basan en programas oficiales de vigilancia sanitaria, junto con medidas de seguimiento. Ciertas prácticas que han funcionado para reducir el número de piscifactorías infectadas en una zona endémica y para prevenir la reinfección, como el sacrificio sanitario y el descanso de las instalaciones, han sido revisadas previamente (Olesen, 1998; Olesen y Korsholm, 1997). Recientemente se han podido erradicar con éxito los brotes de enfermedad aguda en el Reino Unido en 2006 (Stone *et al.*, 2008) y en Noruega en 2007 (Dale *et al.*, 2009), puesto que no se han

observado otros brotes desde entonces, y Dinamarca, que tenía más de 400 piscifactorías infectadas de forma endémica, se libró por sí sola de la SHV tras 45 años de vigilancia y control, sufriendo el último brote de enfermedad en febrero de 2009 (Manuscrito en preparación).

2.4.1. Vacunación

Aunque durante más de tres décadas se ha investigado para desarrollar una vacuna contra la SHV, todavía no se dispone de ninguna. Ha habido varias vacunas candidatas, como vacunas inactivadas, vacunas vivas atenuadas, una vacuna recombinante en sistemas de expresión procariotas y eucariotas, y una vacuna basada en el ADN. Sin embargo, se ha observado que esta última es muy prometedora para inducir una buena protección frente a la SHV. Lorenzen y LaPatra, 2005 han publicado una revisión al respecto.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

Actualmente no se dispone de ninguno.

2.4.3. Inmunoestimulación

Para potenciar la protección frente a la SHV se han evaluado varios inmunoestimulantes, como beta-glucanos derivados de levaduras, péptidos derivados de IL-1 β y probióticos (Peddie *et al.*, 2003). Varios autores han observado efectos positivos, pero no se dispone de ningún inmunoestimulante dirigido específicamente a potenciar la resistencia frente a la SHV.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

Se ha detectado una variación genética en la trucha arco iris en cuanto a la resistencia a la SHV (Dorson *et al.*, 1995; Henryon *et al.*, 2002a, b). En un estudio realizado por Henryon *et al.* (2005), la heredabilidad de la resistencia a la SHV fue de 0,11 medida por el tiempo restante hasta la muerte del animal, en una escala de tiempo logarítmica. Por tanto, se ha observado que hay un buen potencial de seleccionar genéticamente a favor de la resistencia. No obstante, todavía no se comercializa ninguna cepa de trucha arco iris resistente.

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

En algunas piscifactorías de Dinamarca, con mortalidades altas recurrentes causadas por la SHV, se ha intentado la repoblación con especies más resistentes, como la trucha marina (*Salmo trutta*) o la lucioperca (*Sander lucioperca*) (H. Korsholm, comunicación personal).

2.4.6. Desinfección de huevos y larvas

La desinfección de huevos embrionados y de huevos verdes es una medida preventiva eficiente y rentable de detener la propagación de la enfermedad (se indican los procedimientos detallados en Bovo *et al.*, 2005b).

2.4.8. Prácticas generales de manejo

Una mala calidad del agua, una alta densidad de peces, una alta frecuencia de alimentación, otras enfermedades, como la enfermedad renal proliferativa (ERP), la ictioftiriasis, la enfermedad renal bacteriana (ERB), etc. pueden influir en el curso y la gravedad de la enfermedad. En general, un aumento de la temperatura, una restricción alimentaria, una reducción de la densidad de peces y una restricción de la manipulación pueden reducir la mortalidad. En piscifactorías infectadas de forma endémica, normalmente se repuebla con alevines nunca antes expuestos a la enfermedad a temperaturas del agua tan altas como sea posible.

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

Deben realizarse inspecciones clínicas durante un periodo en que la temperatura del agua sea inferior a los 14°C o siempre que la temperatura del agua pueda alcanzar su mínimo anual. En todas las unidades de producción (estanques, tanques, jaulas de red, etc.) debe comprobarse si hay peces muertos, débiles o que presenten un comportamiento anómalo, y debe prestarse especial atención a la zona de salida de agua, donde tienden a acumularse peces débiles debido a la corriente de agua.

Los peces se elegirán en función de lo siguiente:

- En el caso del genotipo I: en piscifactorías con salmónidos, si hay truchas arco iris, solo se podrán escoger ejemplares de esta especie. Si no hay truchas arco iris, la muestra debe obtenerse de peces de todas las demás especies susceptibles al VSHV presentes, que se indican en las Tablas 2.1 y 2.2. No obstante, todas las especies deben estar representadas de forma proporcional en la muestra. En el caso de otros genotipos: deben escogerse especies de susceptibilidad conocida al genotipo en cuestión. Deben escogerse ejemplares de especies susceptibles de forma proporcional, o siguiendo criterios de selección dirigida basados en el riesgo, de lotes o poblaciones con antecedentes de mortalidades anómalas o posibles episodios de exposición (por ejemplo, por agua superficial no tratada, recogida de peces salvajes o repoblación con poblaciones cuyo riesgo se desconozca).
- Si para la producción de peces se utiliza más de un origen de agua, en la muestra deben incluirse peces de todos los orígenes.
- Si hay peces débiles, con comportamientos anómalos o que acaban de morir (no descompuestos), estos deben escogerse. Si no hay este tipo de peces, los peces deben escogerse de entre los que presentan un comportamiento normal y parecen sanos, de tal forma que todas las partes de la piscifactoría, así como todos los segmentos de edad estén representados de forma proporcional en la muestra.

3.2. Conservación de las muestras para su envío

Antes ser enviados o transferidos al laboratorio, partes de los órganos que tienen que examinarse deben extraerse del pez con instrumental de disección estéril e introducirse en tubos de plástico estériles que contengan medio de transporte, es decir, medio de cultivo celular con suero fetal bovino (FBS) al 10% y antibióticos. Se recomienda la combinación de 200 Unidades Internacionales (UI) de penicilina, 200 µg de estreptomycin y 200 µg de kanamicina por ml, aunque también pueden utilizarse otros antibióticos cuya eficacia se haya demostrado.

3.3. Combinación de varias muestras

Pueden combinarse en un solo tubo estéril líquido ovárico o trozos de órganos de un máximo de diez peces; dichos tubos deben contener al menos 4 ml de medio de transporte, y cada uno representará una muestra combinada. El tejido de cada muestra debe pesar al menos 0,5 g. Los tubos deben situarse en recipientes (por ejemplo, cajas de poliestireno de pared gruesa) todos juntos con suficiente hielo o “bloques de congelador” para garantizar la refrigeración de las muestras durante el transporte hasta el laboratorio. Debe evitarse la congelación. La temperatura de una muestra durante el transporte nunca debe superar los 10°C, y cuando la caja llegue a su destino debe seguir quedando hielo en su interior, o bien uno o más bloques de congelador debe estar todavía parcial o totalmente congelados. El examen virológico debe empezar cuanto antes y no después de 48 horas tras la obtención de las muestras. En casos excepcionales, el examen virológico puede empezar como muy tarde a las 72 horas de la obtención del material, siempre que las muestras a examinar estén protegidas por medio de transporte y que durante el transporte se hayan cumplido los requisitos de temperatura.

Se pueden enviar peces enteros al laboratorio si pueden cumplirse los requisitos de temperatura durante el transporte. Los peces enteros pueden envolverse en papel con capacidad absorber y tienen que enviarse en una bolsa de plástico, refrigerados como se ha explicado anteriormente. También pueden enviarse peces vivos. Todo el embalaje y etiquetado tienen que realizarse de acuerdo con las normas de transporte nacional e internacional, según corresponda.

3.4. Órganos y tejidos de elección

El material tisular óptimo para el examen es el bazo, el riñón anterior y, o bien el corazón o bien el encéfalo. En algunos casos, tiene que examinarse el líquido ovárico y el esperma.

En el caso de alevines pequeños, pueden trocearse finamente peces enteros de menos de 4 cm de largo con tijeras o una hoja de bisturí estériles tras retirar la parte del cuerpo situada por detrás del orificio de salida intestinal. Si una muestra está formada por un pez entero cuya longitud corporal se sitúe entre los 4 y los 6 cm, deberán obtenerse las vísceras, incluido el riñón.

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

El VSHV es muy sensible a la degradación enzimática, y por tanto debe evitarse tomar tejidos con altas actividades enzimáticas, como vísceras o hígado.

4. Métodos de diagnóstico

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

La aparición de los siguientes signos debe comportar un examen clínico detenido para averiguar si el pez presenta SHV: una aparición rápida de mortalidad, letargia, oscurecimiento de la piel, exoftalmia, anemia (palidez de branquias), hemorragias en la base de las aletas, las branquias, los ojos y la piel, natación anómala, por ejemplo con movimientos fugaces y en espiral, y distensión abdominal debida a edema en la cavidad peritoneal.

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

La forma nerviosa de la enfermedad se caracteriza por una natación muy anómala, con movimientos fugaces y en espiral constantes, debido al tropismo del virus por el encéfalo. A diferencia de los peces con septicemia bacteriana, los peces infectados por el SHV tenderán a no escapar de las redes.

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

La anatomopatología macroscópica incluye hemorragias petequiales generalizadas en la piel, el tejido muscular (sobre todo en músculos dorsales) y órganos internos. Es importante comprobar si en la musculatura dorsal hay sangrado petequial, que es un signo muy frecuente de infección por el VSHV. El riñón es de color rojo oscuro en la fase aguda, pero puede presentar una intensa necrosis en los peces moribundos. El bazo está moderadamente hinchado. El hígado a menudo está pálido y moteado. El tracto gastrointestinal, sobre todo el intestino caudal, está pálido y no contiene alimento.

4.2.2. Bioquímica clínica

El nivel de glóbulos rojos es muy bajo en la fase aguda de la SHV y la sangre es de color rojo claro y transparente.

4.2.3. Anatomopatología microscópica

La inmunohistoquímica pone de manifiesto células endoteliales positivas al VSHV, principalmente en el sistema vascular (Evensen *et al.*, 1994). El riñón, el hígado y el bazo presentan necrosis focal extensa y degeneración (vacuolas citoplásmicas, picnosis, cariólisis e invasión linfocitaria). Aunque el músculo esquelético no parece un lugar de infección, pueden acumularse eritrocitos en los haces y fibras del músculo esquelético sin causar daños al músculo en sí.

4.2.4. Microscopía electrónica/citopatología

El VSHV es un rhabdovirus típico en forma de bala, de 60-75 nm de diámetro y 180-240 nm de longitud. Anteriormente se han descritos aspectos ultraestructurales del desarrollo de la infección vírica en cultivo celular (Baroni *et al.*, 1982).

4.3. Métodos de detección e identificación del agente

El método estándar de vigilancia (para detectar peces portadores) de la SHV se basa en métodos directos, es decir, el aislamiento del VSHV en cultivo celular seguido de la identificación con métodos basados en anticuerpos (IFAT, ELISA) o métodos basados en el ácido nucleico (como la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa [RT-PCR]). Dado que la demostración inmunológica directa del antígeno del VSHV en tejidos de peces infectados (por la prueba de unión a anticuerpos) tiene baja sensibilidad, solo puede utilizarse cuando se sospecha de infección por SHV (en base a los signos clínicos, a datos epidemiológicos y a la histopatología). Se ha observado que una RT-PCR en tiempo real recientemente publicada validada para la identificación directa del genoma del VSHV en tejido de peces tiene valores de sensibilidad y de especificidad muy similares al cultivo celular seguido de la identificación (Garver *et al.*, 2011; Jonstrup *et al.*, 2012). Esta técnica podría llegar a utilizarse en programas de vigilancia directa destinados a conseguir el reconocimiento de ausencia de SHV si, en el futuro, los Países Miembros de la OIE aprueban su utilización para este fin.

4.3.1. Métodos directos de detección

4.3.1.1. Métodos microscópicos

El riñón y el hígado son las principales dianas, y el examen de cortes histológicos de peces enfermos pone de manifiesto una degeneración y necrosis de tejidos hematopoyéticos en el riñón (y el bazo) con degeneración focal y necrosis hepática. En cortes de músculo esquelético se pueden observar muchos focos de glóbulos rojos, mientras que las fibras musculares permanecen inalteradas.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

El aislamiento del virus de la SHV en cultivos de varias líneas celulares de peces establecidas está bien documentado (Lorenzen *et al.*, 1999; Olesen y Vestergård Jørgensen, 1992). Aunque la inoculación de líneas celulares de peces con tejidos de peces procesados para el aislamiento del virus se considera el método de referencia en programas de vigilancia (para detectar peces portadores) en cuanto a sensibilidad, la sensibilidad exacta de este procedimiento se desconoce. El tejido de peces infectados más adecuado para el examen virológico se escogerá en función del tamaño del pez. Así, en los alevines enteros (de menos de 4 cm de longitud), las vísceras, incluido el riñón (4 cm < longitud corporal < 6 cm) o, en el caso de peces más grandes, el riñón, el bazo, el corazón y el encéfalo, y el líquido ovárico de reproductores en el momento del desovado, son muestras adecuadas.

Se recomienda la línea celular de pez BF-2. Como alternativa, pueden utilizarse las líneas celulares EPC o FHM (Lorenzen *et al.*, 1999; Olesen y Vestergård Jørgensen, 1992; Departamento de Interior de EE.UU., 2007). En el caso de los genotipos I, II y III, en general la línea EPC es menos susceptible que la BF-2 (Lorenzen *et al.*, 1999; Olesen y Vestergård Jørgensen, 1992). Sin embargo, la línea celular EPC muy sensible a varias cepas del genotipo IV (Departamento de Interior de EE.UU., 2007).

La detección del virus por la observación de efecto citopático (ECP) en el cultivo celular va seguida de una identificación del virus mediante pruebas basadas en anticuerpo o bien basadas en el ácido nucleico. Cualquier prueba basada en anticuerpos requeriría utilizar anticuerpos validados para ser sensible y específica (Ariel y Olesen, 2001). El uso de MAb IP5B11 (Lorenzen *et al.*, 1988) se recomienda como reactivo de referencia, por que todas las cepas de VHSV aisladas hasta ahora reaccionan con este MAb.

4.3.1.2.1.1. Extracción del virus

En el laboratorio, el tejido de los tubos debe estar totalmente homogenizado (mediante digestor, mezcladora, homogeneizador validado o, lo que resulta más eficiente, mortero con arena estéril) y posteriormente debe suspenderse en el medio de transporte inicial. Si una muestra está formada por peces enteros de menos de 4 cm de largo, deben trocearse finamente con tijeras o una hoja de bisturí estériles tras retirar la parte del cuerpo situada por detrás del orificio intestinal. Si una muestra está formada por peces enteros de entre 4 y 6 cm de largo, debe obtenerse las vísceras, incluido el riñón. Si una muestra está formada por peces enteros de más de 6 cm de longitud, debe obtenerse muestras de tejido como se describe en el apartado 3.4. Las muestras de tejido deben trocearse finamente con tijeras o una hoja de bisturí estériles y homogeneizarse, como se ha descrito anteriormente, y después suspenderse en medio de transporte. La proporción final de tejido respecto a medio de transporte debe ajustarse en el laboratorio a 1:10.

El homogenado se centrifuga en una centrífuga refrigerada a 2-5°C a 2.000-4.000 *g* durante 15 minutos y el sobrenadante se recoge y se trata durante 4 horas a 15°C o durante toda la noche a 4°C con antibióticos, 1 mg ml⁻¹ de gentamicina, por ejemplo, puede ser útil en esta fase. Si la muestra se envía en medio de transporte (es decir, expuesta a antibióticos), el tratamiento del sobrenadante con antibióticos puede omitirse. El tratamiento con antibióticos tiene por objetivo controlar la contaminación bacteriana de las muestras y permite prescindir de la filtración por filtros de membrana.

Si el sobrenadante recogido se guarda a -80°C en un plazo de 48 horas tras la obtención de la muestra, puede volver a utilizarse solo una vez para el examen virológico.

Cuando surgen dificultades prácticas (como avería de la incubadora, problemas con los cultivos celulares, etc.) que imposibilitan la inoculación de células en un plazo de 48 horas tras la obtención de las muestras de tejido, es aceptable congelar el sobrenadante a -80°C y llevar a cabo el examen virológico en un plazo de 14 días.

Antes de inocular las células, el sobrenadante se mezcla con partes iguales de una combinación diluida adecuada de antisueros contra los serotipos autóctonos del virus de la necrosis

pancreática infecciosa (VNPI) y la solución se incuba durante un mínimo de 1 hora a 15°C o un máximo de 18 horas a 4°C. El título del antisuero debe ser de al menos 1/2000 en una prueba de neutralización en placa del 50%.

El tratamiento de todos los inóculos con antisuero contra el VNPI (un virus que en algunas partes de Europa aparece en el 50% de las muestras de peces) tiene por objetivo impedir que se desarrolle el ECP causado por el VNPI en cultivos celulares inoculados. Esto reducirá la duración del examen virológico así como el número de casos en los que la aparición de ECP tendría que haberse considerado potencialmente indicadora de VSHV. Cuando las muestras proceden de unidades de producción que se consideran libres de la NPI, el tratamiento de los inóculos con antisuero contra el VNPI puede omitirse.

4.3.1.2.1.2. *Inoculación de monocapas celulares*

Se cultivan células de la línea BF-2 a 20-40°C en medio adecuado, por ejemplo el medio mínimo esencial de Eagle (o modificaciones del mismo) con un suplemento de un 10% de suero fetal bovino y antibióticos a las concentraciones estándar. Cuando las células se cultivan en viales cerrados, se recomienda tamponar el medio con bicarbonato. El medio utilizado para el cultivo de células en unidades abiertas puede tamponarse con Tris/HCl (23 mM) y bicarbonato de sodio (6 mM), o con medio tamponado con HEPES (HEPES= ácido N-2-hidroxiethyl-piperazina-N-2-etanosulfónico). El pH debe mantenerse a $7,6 \pm 0,2$. Los cultivos celulares que van a utilizarse para la inoculación con material tisular deben ser jóvenes (4-48 horas de edad), y en el momento de la inoculación deben estar en crecimiento activo (no confluyentes).

Se inoculan suspensiones de órganos tratados con antibióticos en cultivos celulares al menos a dos diluciones, es decir, la dilución madre y una dilución de esta a 1/10, que da lugar a diluciones finales de material tisular en el medio de cultivo celular de 1/100 y de 1/1000, respectivamente (para prevenir interferencia por homólogos). La proporción entre el tamaño del inóculo y el volumen de medio de cultivo celular debe ser de aproximadamente 1:10. Para cada dilución y cada línea celular, tiene que utilizarse un mínimo de aproximadamente 2 cm² de área celular, correspondiente a un pocillo de una bandeja de cultivo celular de 24 pocillos. Se recomienda utilizar bandejas de cultivo celular, pero también son aceptables otras unidades con áreas de crecimiento similares o mayores.

4.3.1.2.1.3. *Incubación de cultivos celulares*

Los cultivos celulares inoculados se incuban a 15°C durante 7-10 días. Si el color del medio de cultivo celular pasa de rojo a amarillo, indicando una acidificación del medio, debe realizarse un ajuste del pH con solución de bicarbonato estéril o sustancias equivalentes para garantizar la susceptibilidad de las células a la infección vírica.

Al menos cada 6 meses, o cuando se sospeche de disminución de la susceptibilidad celular, se lleva a cabo una titulación de los stocks congelados de VSHV para verificar la susceptibilidad de los cultivos celulares a la infección.

4.3.1.2.1.4. *Microscopía*

Los cultivos celulares inoculados deben inspeccionarse periódicamente (al menos tres veces a la semana) para comprobar si presentan ECP a 40-150 aumentos. Si se observa un ECP evidente, deben iniciarse de inmediato los procedimientos de identificación del virus. Se recomienda utilizar un microscopio de contraste de fases.

4.3.1.2.1.5. *Subcultivo*

Si pasados 7 a 10 días de la incubación inicial no se ha observado ECP, se lleva a cabo un subcultivo con cultivos celulares nuevos utilizando una zona celular similar a la del cultivo primario.

Se combinan alícuotas de medio (sobrenadante) de todos los cultivos/pocillos que constituyan el cultivo primario, según la línea celular, 7-10 días después de la inoculación. Las alícuotas combinadas se inoculan en cultivos celulares homólogos no diluidas y diluidas a 1/10 (obteniendo diluciones finales de 1/10 y 1/100, respectivamente, del sobrenadante) como se describe arriba (Inoculación de monocapas celulares).

Como alternativa, se inoculan alícuotas de un 10% del medio que constituye el cultivo primario directamente en un pocillo con cultivo celular nuevo (subcultivo de pocillo a pocillo). En el caso de muestras de salmónidos, la inoculación puede ir precedida de una preincubación de las diluciones con un antisuero anti-VNPI a una dilución adecuada, como se describe arriba (apartado 4.3.1.2.1.1 Extracción del virus).

A continuación, los cultivos inoculados se incuban 7 a 10 días a 15°C, observándolos, como se describe arriba (apartado 4.3.1.2.1.4 Microscopía). Si aparece ECP en los primeros 3 días de

incubación, puede realizarse un subcultivo en esa fase, pero después las células tienen que incubarse durante 7 días y subcultivarse de nuevo con otra incubación de 7 días. Cuando aparece ECP tóxico pasados 3 días, las células pueden pasarse una vez e incubarse para alcanzar un total de 14 días desde la inoculación primaria. No debe haber indicios de toxicidad en los últimos 7 días de incubación.

Si se produce contaminación bacteriana a pesar del tratamiento con antibióticos, el subcultivo debe ir precedido de una centrifugación a 2.000-4.000 *g* de 15–30 minutos a 2–5°C, y/o una filtración del sobrenadante por un filtro de 0,45 µm (membrana de baja unión de proteínas). Además de esto, los procedimientos de subcultivo son los mismos que en el caso del ECP tóxico.

Si no aparece ECP, la prueba puede declararse negativa.

4.3.1.2.1.6. Identificación del virus

Prueba de neutralización

- i) Se recoge el medio de cultivo de las monocapas celulares que presenten ECP y se centrifuga a 2.000 *g* durante 15 minutos a 4°C, o se filtra por una membrana de 0,45 µm (o 450 nm) de tamaño de poro para eliminar detritos celulares.
- ii) Se diluye el medio que contiene el virus, pasando de 10⁻² a 10⁻⁴.
- iii) Se mezclan las alícuotas (por ejemplo, de 200 µl) de cada dilución con volúmenes iguales de solución de anticuerpos anti-VSHV y, de igual forma, se tratan las alícuotas de cada dilución de virus con medio de cultivo celular. La solución de anticuerpos neutralizantes (NAb) debe tener un título de reducción del 50% en placa de al menos 2000.
- iv) Paralelamente, debe realizarse otra prueba de neutralización contra una cepa vírica homóloga (prueba de neutralización positiva).
- v) Si es necesario, puede realizarse una prueba de neutralización similar utilizando anticuerpos contra el VNPI.
- vi) Se incuban todas las mezclas a 15°C durante 1 hora.
- vii) Se transfieren las alícuotas de cada una de las mezclas anteriores a monocapas de 24-48 horas de edad cubiertas con medio de cultivo celular que contenga FBS al 10% (se inoculan dos pocillos por dilución) y se incuban a 15°C; para este fin, son adecuadas las placas de cultivo celular de 24 o de 12 pocillos, utilizando un inóculo de 50 µl.
- viii) Se observan los cultivos celulares para comprobar si ha empezado el ECP y se lee el resultado en cuanto se produce en controles no neutralizados (en los controles positivos de neutralización las monocapas celulares estarán protegidas). Los resultados se registran o bien tras un examen microscópico simple (preferiblemente de contraste de fases) o bien tras desechar el medio de cultivo celular y teñir las monocapas celulares con un solución de cristal violeta al 1% en etanol al 20%.
- ix) El virus analizado se identifica como VSHV cuando se previene el ECP o se retrasa considerablemente en los cultivos celulares que han recibido la suspensión de virus tratada con el anticuerpo específico contra el VSHV, mientras que sí se observa ECP en todos los demás cultivos celulares.
- x) En ausencia de neutralización alguna mediante NAb contra el VSHV, es obligatorio llevar a cabo una IFAT, una prueba de inmunoperoxidasa, un ELISA o una RT-PCR en la muestra sospechosa. Se han observado algunos casos de deriva antigénica del antígeno de superficie, que han dado lugar a fracasos ocasionales de la prueba de neutralización con NAb contra el VSHV.

Como alternativa se pueden utilizar otras pruebas de neutralización cuya eficacia se haya demostrado.

4.3.1.2.2. Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos

Para la detección del VSHV, a lo largo de los años se han desarrollado métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos, como la IFAT, el ELISA y varios procedimientos de inmunohistoquímica. En general se acepta que los órganos diana principales son el riñón, el corazón y el bazo. Estas técnicas permiten una detección e identificación relativamente rápidas en comparación con el aislamiento en cultivo celular. No obstante, existen distintos parámetros, como la sensibilidad y la especificidad del anticuerpo o la preparación de la muestra, que pueden influir en los resultados, de modo que un resultado negativo debe interpretarse con cautela. Estas técnicas no deben utilizarse en intentos de detectar peces portadores.

4.3.1.2.2.1 Pruebas de inmunofluorescencia indirecta en improntas

- i) Se desangra el pez por completo.
- ii) Se realizan improntas de riñón en portas de vidrio limpios o en el fondo de los pocillos de una placa de cultivo celular de plástico.
- iii) Se guardan trozos de riñón junto con los otros órganos necesarios para el aislamiento del virus por si tuvieran que utilizarse en otro momento.
- iv) Se deja secar la impronta al aire durante 20 minutos.
- v) Se fija con acetona o etanol/acetona y seca como se indica en el apartado 4.3.1.2.2.3, pasos v–vii.
- vi) Se rehidratan las preparaciones anteriores (véase el apartado 4.3.1.2.2.3, paso ix) y se bloquean con una solución de leche desnatada al 5% o de albúmina de suero bovino al 1% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) 0,01 M, pH 7,2, que contenga Tween-80 al 0,05% (PBST), durante 30 minutos a 37°C.
- vii) Se enjuagan cuatro veces con PBST.
- viii) Se tratan las improntas con la solución de anticuerpos anti-VSHV y se enjuagan como se indica en el apartado 4.3.1.2.2.3.
- ix) Se bloquean y se enjuagan como se ha descrito previamente en los pasos vi y vii.
- x) Se revela la reacción con un anticuerpo adecuado y específico conjugado con ITCF, se enjuagan y se observan como se indica en el apartado 4.3.1.2.2.3, pasos xii–xv.
- xi) Si la prueba es negativa, se procesan las muestras de órganos guardadas a 4°C para el aislamiento del virus en cultivo celular, como se ha descrito arriba.

4.3.1.2.2.2 Enzimoinmunoanálisis (modificado por Olesen y Jørgensen, 1991)

Procedimiento del ELISA en material tisular

Procedimientos de obtención de muestras: Véase el Capítulo 2.3.0. del *Manual de la OIE sobre la Vigilancia Sanitaria de los Animales Acuáticos* (2009).

Procesado de muestras de órganos: Véase el Capítulo 2.3.0. del *Manual de la OIE sobre la Vigilancia Sanitaria de los Animales Acuáticos* (2009).

Se sigue el procedimiento descrito a continuación (procedimiento del ELISA en sobrenadante de cultivo celular)

- i) Se aparta una alícuota de una dilución a 1/4 de cada homogenado por si se necesita otro aislamiento del virus en cultivo celular.
- ii) Se trata la parte restante del homogenado con un Triton X-100 al 2%; se mezcla con cuidado.
- iii) Se completan los otros pasos del procedimiento descrito en “Procedimiento del ELISA en sobrenadante de cultivo celular”
- v) Si la prueba es negativa, se procesan las muestras de órganos guardadas a 4°C para el aislamiento del virus en cultivo celular, como se ha descrito arriba.

Procedimiento del ELISA en sobrenadante de cultivo celular

- i) Se cubren los pocillos de microplacas diseñadas para ELISA con diluciones adecuadas de inmunoglobulinas (Ig) contra proteína A purificadas de antisueros de conejo anti-VSHV, en tampón carbonato, a pH 9,6 (50 µl/pocillo).
- ii) Se incuban toda la noche a 4°C.
- iii) Se enjuagan con PBS que contenga Tween-20 al 0,05% (PBST).
- iv) Se añade Triton X-100 al 1% a la suspensión vírica problema.
- v) Se distribuyen 50 µl/pocillo de diluciones de dos o cuatro pasos (en PBST que contenga albúmina de suero bovino al 1%) del virus problema y del VSHV control, así como un control negativo (por ejemplo, virus de la necrosis hematopoyética infecciosa), y se deja reaccionar con el anticuerpo de recubrimiento contra el VSHV durante 1 hora a 37°C.
- vi) Se enjuagan en PBST.

- vii) Se añaden a los pocillos MAb contra la proteína N del VSHV (IP5B11) a razón de 50 µl/pocillo.
- viii) Se incuban durante 1 hora a 37°C.
- ix) Se enjuagan en PBST.
- x) Anticuerpos monoclonales anti-ratón conjugados a peroxidasa de rábano (HRP).
- xi) Se incuban durante 1 hora a 37°C.
- xii) Se enjuagan en PBST.
- xiii) Se visualiza la reacción utilizando ortofenildiamina y se mide la absorbancia a una longitud de onda de 492 nm.

Esta versión de ELISA se indica como ejemplo, pero en su lugar pueden utilizarse otras versiones de ELISA cuya eficacia se haya demostrado.

4.3.1.2.2.3 Prueba de inmunofluorescencia indirecta

- i) Se preparan monocapas de células en pocillos de 2 cm² de placas de plástico de cultivo celular o en cubreobjetos con el fin de alcanzar alrededor de un 80% de confluencia, que normalmente se logra en un plazo de 24 horas de incubación a 22°C (se siembran seis monocapas celulares por cepa vírica a identificar, más de para los controles positivos y dos para los negativos). El contenido en FBS del medio de cultivo celular pueden reducirse al 2-4%. Si tienen que identificarse muchas cepas víricas, se recomienda vivamente utilizar placas Terasaki.
- ii) Cuando las monocapas celulares estén listas para la infección, es decir, el mismo día o el día después de la siembra, se inoculan las suspensiones del virus problema realizando pasos de dilución decimal directamente en los pocillos o frascos de cultivo celular.
- iii) Se diluye la suspensión de virus control de VSHV de forma similar, con el fin de obtener un título vírico de unas 5.000–10.000 unidades formadoras de placas (UFP) ml⁻¹ en el medio de cultivo celular.
- iv) Se incuba a 15°C durante 24 horas.
- v) Se retira el medio de cultivo celular, se enjuaga una vez con PBS 0,01 M, pH 7,2, y a continuación tres veces brevemente con una mezcla fría de un 30% de acetona y un 70% de etanol (v/v) (almacenada a -20°C).
- vi) Se deja actuar el fijador durante 15 minutos. Un volumen de 0,5 ml es suficiente para 2 cm² de monocapa celular.
- vii) Se dejan secar las monocapas celulares al aire durante al menos 30 minutos y se procesan de inmediato o se congelan a -20°C.
- viii) Se prepara una solución de anticuerpo anti-VSHV purificado o suero en PBST 0,01 M, pH 7,2, a la dilución adecuada (que se habrá establecido previamente o vendrá indicada por el fabricante del reactivo).
- ix) Se rehidratan las monocapas celulares secadas utilizando cuatro pasos de enjuagado con la solución de PBST, y se retira este tampón completamente tras el último enjuagado.
- x) Se tratan las monocapas celulares con la solución de anticuerpos durante 1 hora a 37°C en una cámara húmeda impidiendo la evaporación, por ejemplo añadiendo un trozo de algodón mojado en la cámara húmeda. El volumen de solución a utilizar es de 0,25 ml/pocillo de 2 cm².
- xi) Se enjuagan cuatro veces con PBS, como antes.
- xii) Se tratan las monocapas celulares durante 1 hora a 37°C con una solución de anticuerpo conjugado a isotiocianato de fluoresceína (ITCF) o a isotiocianato de tetrametilrodamina-5-(y-6) contra la inmunoglobulina utilizada como anticuerpo primario, y preparado según las instrucciones del fabricante. Estos anticuerpos conjugados normalmente son de conejo o de cabra.
- xiii) Se enjuagan cuatro veces con PBST.
- xiv) Se examinan las monocapas celulares tratadas en placas de plástico de inmediato, o se montan los cubreobjetos utilizando, por ejemplo, solución salina de glicerol, pH 8,5, antes de la observación al microscopio.

- xv) Se examinan con luz UV incidente utilizando un microscopio con oculares de 10 aumentos y objetivos de 20-40 aumentos y con una apertura numérica $>0,65$ y $>1,3$, respectivamente. Antes de proceder a observación alguna, hay que asegurarse de que los controles, positivos y negativos, dan los resultados esperados.

Como alternativa, puede utilizarse otras técnicas IFAT o inmunocitoquímicas (fosfatasa alcalina o peroxidasa) cuya eficacia se haya demostrado.

4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

Se utilizan con frecuencia pruebas moleculares (RT-PCR y RT-PCR en tiempo real) por su rapidez, sensibilidad y especificidad. Además, con la presencia de distintas cepas con distintas características de patogenicidad, descubrimiento de las distintas cepas marinas norteamericanas, asiáticas, europeas y del Atlántico, la secuenciación de los productos de la PCR puede proporcionar importantes datos epidemiológicos (Einer-Jensen *et al.*, 2002; Skall *et al.*, 2005). Las pruebas de RT-PCR en tiempo real en general son más sensibles que las de RT-PCR convencional. Aunque el uso de estas pruebas para la detección e identificación del virus durante la fase aguda de la enfermedad se ha justificado durante muchos años, la sensibilidad y especificidad de una prueba de RT-PCR en tiempo real en comparación con el aislamiento del virus mediante cultivo celular y la subsiguiente identificación hace poco que se han establecido definitivamente (Garver *et al.*, 2011; Jonstrup *et al.*, 2012). Se ha observado que estas dos pruebas son adecuadas para la identificación del VSHV de todos los genotipos.

En el momento de redactar este texto (2011), no puede recomendarse la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) para el VSHV como prueba general de detección del virus, puesto que la única técnica de LAMP publicada no está validada para todos los genotipos, y por alineación de secuencias es probable que la LAMP publicada no reconozca todos los genotipos (Soliman y El-Matbouli, 2006).

Preparación de ARN vírico

Todo el trabajo realizado con el ARN debe llevarse a cabo sobre hielo, utilizando guantes.

Se recogen alícuotas de medio de cultivo de células de monocapa infectada que presenten ECP. Se centrifugan a 1000 *g* durante 5 minutos para eliminar detritos celulares.

Se extrae ARN utilizando el método del fenol-cloroformo o mediante columnas de centrifugación por afinidad al ARN, según las instrucciones del fabricante. Debe resuspenderse ARN en agua destilada sin ARNasa (por ejemplo, agua tratada con un 0,1% de dietilpircarbonato).

4.3.1.2.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) convencional

La amplificación mediante RT-PCR puede llevarse a cabo en un paso o en dos. Ambos procedimientos se basan en un paso de amplificación mediante PCR en el que se utilizan cebadores: el cebador directo VN: 5'-ATG-GAA-GGA-GGA-ATT-CGT-GAA-GCG-3' y el cebador inverso VN: 5'-GCG-GTG-AAG-TGC-TGC-AGT-TCC-C-3' (Snow *et al.*, 2004). El cebador directo VN y el cebador VN inverso están diseñados para amplificar una región correspondiente a las bases 1 a 505 del gen N del VSHV (Snow *et al.*, 2004). **NOTA:** es posible que utilizando estos cebadores no se reconozcan cepas del genotipo IVb; por tanto, para la confirmación se recomienda el uso de la RT-PCR en tiempo real o de métodos basados en anticuerpos.

RT-PCR simple:

Puede llevarse a cabo una RT-PCR en tubo único de 50 μ l utilizando, por ejemplo, el sistema de RT-PCR simple de Qiagen (Qiagen, Alemania), según las instrucciones del fabricante. En pocas palabras, la mezcla para la reacción está formada por: 5 μ l de ARN vírico extraído, 2 μ l de dNTP 10 mM, 10 μ l tampón para la reacción de la RT-PCR 5x (con $MgCl_2$ 12,5 mM) y 2 μ l de mezcla de enzima. La RT-PCR se puede llevar a cabo utilizando cebador los cebadores directo VN e inverso VN a una concentración final de 0,6 μ M cada uno. Se recomiendan los siguientes ciclos: 50°C durante 30 minutos, 95°C durante 15 minutos, 35 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, y 68°C durante 60 segundos. A continuación, la reacción se mantiene a 68°C durante 7 minutos.

RT-PCR de dos pasos:

Puede llevarse a cabo una síntesis de 20 μ l de ADNc utilizando, por ejemplo, el kit de síntesis iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) según las instrucciones del fabricante. En resumen, la mezcla para la reacción está formada por: 5 μ l de ARN vírico extraído, 4 μ l de mezcla de

reacción (iScript Reaction Mix) 5x, 1 µl de transcriptasa inversa (iScript Reverse Transcriptase) y 10 µl de agua sin nucleasa. Se incuban las muestras utilizando el siguiente programa: 25°C durante 5 minutos, 42°C durante 30 minutos, 85°C durante 5 minutos. Para la PCR se utilizan 5 µl.

Puede llevarse a cabo una PCR de 25 µl tras la síntesis del ADNc (descrita arriba) utilizando, por ejemplo, Go Taq Flexi Polymerase (Promega), según las instrucciones del fabricante. En resumen, la mezcla para la reacción está formada por: 5 µl de ADNc, 11,125 µl de agua Milli Q, 5 µl de tampón Green GoTaq Flexi 5x, 2,5 µl de MgCl₂ 25 mM, 0,5 µl de cebador directo VN (10 µM), 0,5 µl de cebador inverso VN (10 µM), 0,25 µl de cada una de las dNTP 25 mM, 0,125 µl de polimerasa Go Taq Flexi DNA. Se incuban las muestras utilizando el siguiente programa: 94°C durante 5 minutos, 36 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, y 68°C durante 60 segundos. A continuación, se mantiene la reacción a 68°C durante 7 minutos.

Se puede evaluar la cantidad y la especificidad de las RT-PCR simple y de dos pasos mediante electroforesis en gel de una reacción 1/10 en gel de agarosa al 1,5% con bromuro de etidio y observarse mediante transiluminación con luz UV.

Nota: la PCR puede variar en función de las condiciones en las cuales se lleve a cabo; así, los protocolos de ciclado térmico podría precisar una optimización, dependiendo del termociclador utilizado. Además, pueden producirse falsos positivos debido, por ejemplo, a una falsa hibridación del cebador o a contaminación del laboratorio. También debe tenerse cuidado cuando el virus se cultiva en células BF-2, puesto que en ocasiones, aunque muy infrecuentes, puede observarse una banda falsamente positiva de un tamaño ligeramente inferior al de una verdadera banda de VSHV. Por tanto, es importante incluir controles positivos y negativos adecuados, y en caso de duda deben secuenciarse los amplicones.

4.3.1.2.3.2 RT-PCR en tiempo real

La amplificación mediante RT-PCR puede llevarse a cabo utilizando los cebadores/sonda adaptados de Jonstrup *et al.* (2012): Cebador directo: 5'-AAA-CTC-GCA-GGA-TGT-GTG-CGT-CC-3', Cebador inverso: 5'-TCT-GCG-ATC-TCA-GTC-AGG-ATG-AA-3', y sonda: 5'-FAM-TAG-AGG-GCC-TTG-GTG-ATC-TTC-TG-BHQ1. Estos cebadores van dirigidos a los nucleótidos 532-608 según el número de acceso de GenBank Z93412. Como alternativa, pueden adaptarse los cebadores/sonda de Garver *et al.* (2011): Cebador directo (2F): 5'-ATG-AGG-CAG-GTG-TCG-GAG-G-3', Cebador inverso (2R): 5'-TGT-AGT-AGG-ACT-CTC-CCA-GCA-TCC-3', y sonda (2-MGB): 5'-FAM-TAC-GCC-ATC-ATG-ATG-AGT-MGBNFQ-3' dirigidos a los nucleótidos 787-868, según el número de acceso de GenBank Z93412

RT-PCR en tiempo real de un solo paso:

Puede llevarse a cabo una RT-PCR de un solo tubo de 25 µl utilizando, por ejemplo, el kit de RT-PCR Quantitect Probe RT-PCR kit (Qiagen, Alemania), según las instrucciones del fabricante. En resumen, la mezcla para la reacción está formada por: 5 µl de ARN vírico extraído (unos 0,05–2 µg), 12,5 µl de mezcla madre para QRT-PCR 2x, y 0,25 µl de mezcla de enzima de bloqueo RT/ARNasa. La RT-PCR en tiempo real se puede llevar a cabo utilizando cebadores directo e inverso a una concentración final de 0,9 µM cada uno, y sonda a una concentración final de 0,25 µM. El programa de la PCR depende del kit y del equipo de PCR en tiempo real utilizado. En el caso de un mx3005p (Stratagene) utilizando un kit de RT-PCR Quantitect Probe RT-PCR kit (Qiagen, Alemania) se ejecuta el siguiente programa: 50°C durante 30 minutos, 95°C durante 15 minutos, 40 ciclos de 94°C durante 15 segundos, 60°C durante 40 segundos, 72°C durante 20 segundos, y si se utiliza otra plataforma y/o kit, se realizan los ajustes necesarios.

Obsérvese que la sensibilidad de la RT-PCR en tiempo real depende en gran medida del kit utilizado (consúltese Jonstrup *et al.*, 2012 para más detalles).

4.3.2. Métodos serológicos

La vigilancia basada en pruebas serológicas tiene varias ventajas respecto al aislamiento del virus, sobre todo en casos en que la temperatura del agua es demasiado alta para el aislamiento del virus y en poblaciones infectadas de forma endémica sin signos clínicos de la enfermedad. Sin embargo, la respuesta de anticuerpos detectarse por primera vez 3 a 4 semanas después de la infección. Por otra parte, los altos niveles de anticuerpos persistirán durante mucho tiempo: más de 6 meses tras la infección (Fregeneda-Grandes y Olesen, 2007; LaPatra, 1996; Lorenzen y LaPatra, 1999). El inconveniente de las pruebas serológicas es el lento desarrollo de los anticuerpos de los peces tras la infección, sobre todo a temperaturas del agua bajas. Se está llevando a cabo una evaluación final de la

sensibilidad, la especificidad y la reproducibilidad analítica de métodos serológicos para la detección de anticuerpos anti-VSHV en peces. Cuando estén adecuadamente evaluados y validados, se podrán añadir métodos a este capítulo.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

Los métodos actualmente disponibles para la vigilancia dirigida, la detección y el diagnóstico del VSHV se detallan en la Tabla 5.1. Las denominaciones utilizadas en la Tabla indican: a=el método es el recomendado por razones de disponibilidad, utilidad y especificidad y sensibilidad de diagnóstico; b= el método es estándar, con buena sensibilidad y especificidad de diagnóstico; c = el método tiene aplicación en algunas situaciones, pero el coste, la precisión u otros factores limitan seriamente su aplicación; y d= el método no se recomienda actualmente para este fin. Esta clasificación es de alguna forma subjetiva ya que la idoneidad implica cuestiones de fiabilidad, sensibilidad, especificidad y utilidad. Aunque no todas las pruebas incluidas en las categorías a o b se han sometido a estandarización y validación formales, su naturaleza sistemática y el hecho de que se hayan usado generalmente sin resultados dudosos las hace aceptables.

Tabla 5.1. Métodos de vigilancia, detección y diagnóstico

Método	Vigilancia dirigida			Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
	Larvas	Juveniles	Adultos		
Signos macroscópicos	d	d	d	b	d
Histopatología	d	d	d	b	d
ME de transmisión	d	d	d	c	d
Aislamiento en cultivo celular seguido de uno de los métodos de identificación	a	a	a	a	a
Pruebas basadas en anticuerpos	d	d	d	b	a
RT-PCR convencional seguida de secuenciación	c	c	c	b	a
RT-PCR en tiempo real	c	c	c	a	a

ME = microscopía electrónica; RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa.

6. Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de SHV

La prueba recomendada para la vigilancia dirigida es el cultivo de muestras de tejido de pez en células de la línea BF-2 con la posterior identificación del virus mediante pruebas inmunoquímicas o basadas en ácidos nucleicos, como se describe en el apartado 4 de este capítulo.

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

La presencia del VSHV debe sospecharse si se cumple al menos uno de los siguientes criterios:

- La presencia de hallazgos post-mortem compatibles con la SHV, con o sin signos clínicos de la enfermedad. Los hallazgos post-mortem y los signos clínicos de la enfermedad deben concordar con los descritos en los apartados 4.1 y 4.2 de este capítulo;

- ii) ECP típico del VSHV en cultivos celulares antes de la confirmación;
- iii) Cuando un estudio ponga de manifiesto relaciones epidemiológicas con piscifactorías sospechosas de presentar SHV o en las que se haya confirmado;
- iv) Detección de anticuerpo contra el VSHV en peces.

La sospecha de SHV se puede descartar si estudios continuados ponen de manifiesto que ya no hay indicios de presencia del agente patógeno.

7.2. Definición de caso confirmado

La presencia del VSHV se considera confirmada si, además de los criterios del apartado 7.1, se cumple uno o más de los siguientes:

- i) se realiza aislamiento del VSHV en cultivo celular seguido de la identificación del virus por pruebas basadas en anticuerpos (IFAT, ELISA, neutralización vírica, inmunohistoquímica) y/o por RT-PCR seguida de secuenciación del amplicón o por RT-PCR en tiempo real;
- ii) se detecta el VSHV en tejidos o preparaciones de tejidos mediante inmunoanálisis utilizando anticuerpos específicos anti-VSHV;
- iii) se detecta el VSHV en preparaciones de tejido mediante RT-PCR seguida de la secuenciación del amplicón o de RT-PCR en tiempo real.

La confirmación del primer caso de SHV en piscifactorías de zonas o compartimiento no infectados no puede basarse solamente en ii) o solamente en iii).

El material tisular para el examen virológico podría, en algunos casos, ir acompañado de material suplementario para un examen bacteriológico, parasitológico, histológico o de otro tipo para disponer de un diagnóstico diferencial.

8. Bibliografía

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2008). Scientific Opinion of the panel on AHAW on a request from the European Commission on aquatic animal species susceptible to diseases listed in the Council Directive 2006/88/EC. *The EFSA Journal*, **808**, 1–144.

AHNE W. (1982). Vergleichende Untersuchung über die Stabilität von vier fischpathogenen Viren (VHSV, PFR, SVCV, IPNV) (Comparative studies on the stability of four fish-pathogenic viruses [VHSV, PFR, SVCV, IPNV]). *Zentralbl. Veterinarmed. [B]*, **29**, 457–476. (In German).

AL-HUSSINEE L., HUBER P., RUSSELL S., LEPAGE V., REID A., YOUNG K.M., NAGY E., STEVENSON R.M.W. & LUMSDEN J.S. (2010). Viral haemorrhagic septicaemia virus IVb experimental infection of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), and fathead minnow, *Pimphales promelas* (Rafinesque). *J. Fish Dis.*, **33**, 347–360.

AL-HUSSINEE L., LORD S., STEVENSON R.M.W., CASEY R.N., GROOCKOCK G.H., BRITT K.L., KOHLER K.H., WOOSTER G.A., GETCHELL R.G., BOWSER P.R. & LUMSDEN J.S. (2011). Immunohistochemistry and pathology of multiple Great Lakes fish from mortality events associated with viral hemorrhagic septicemia virus type IVb. *Dis. Aquat. Org.*, **93**, 117–127.

ARIEL E. & OLESEN N.J. (2001). Assessment of a commercial kit collection for diagnosis of the fish viruses: IHNV, IPNV, SVCV and VHSV. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **21**, 6–11.

ARKUSH K.D., MENDONCA H.L., MCBRIDE A.M., YUN S., MCDOWELL T.S. & HEDRICK R.P. (2006). Effects of temperature on infectivity and of commercial freezing on survival of the North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). *Dis. Aquat. Org.*, **69**, 145–151.

BARONI A., GALESSO R. & BOVO G. (1982). Ultrastructural observations on the virus of viral haemorrhagic septicaemia in culture. *J. Fish Dis.*, **5**, 439–444.

BOVO G., HÄSTEIN T., HILL B., LAPATRA S., MICHEL C., OLESEN N.J., SHCHELKUNOV I., STORSET A., WOLLFROM T. & MIDTLING P.J. (2005a). QLK2-CT-2002-01546: Fish Egg Trade Work package 1 report: Hazard identification for vertical transfer of fish disease agents, 1–35. VESO, P.O. Box 8109, Dep., N-0032 Oslo, Norway. Available at http://www.crl-fish.eu/upload/sites/eurl-fish/reports/links/fisheggtrade%20wp_1.pdf

- BOVO G., HILL B., HUSBY A., HASTEIN T., MICHEL C., OLESEN N.J., STORSET A. & MIDTLYNG P. (2005b). Fish Egg Trade Work package 3 report: Pathogen survival outside the host, and susceptibility to disinfection, 1–53. VESO, P.O. Box 8109 Dep., N-0032 Oslo, Norway. Available at: http://www.crl-fish.eu/upload/sites/eurl-fish/links/fisheggtrade%20wp_3.pdf
- BREMONT M. (2005). Reverse genetics on fish rhabdoviruses: tools to study the pathogenesis of fish rhabdoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **292**, 119–141
- DALE O.B., ØRPETVEIT I., LYGSTAD T.M., KAHNS S., SKALL H.F., OLESEN N.J. & DANNEVIG B.H. (2009). Outbreak of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in seawater-farmed rainbow trout in Norway caused by VHS virus Genotype III. *Dis. Aquat. Org.*, **85**, 93–103.
- DORSON M., QUILLET E., HOLLEBECQ M.G., TORHY C. & CHEVASSUS B. (1995). Selection of rainbow trout resistant to viral haemorrhagic septicaemia virus and transmission of resistance by gynogenesis. *Vet. Res.*, **26**, 361–368.
- EINER-JENSEN K., AHRENS P., FORSBERG R. & LORENZEN N. (2004). Evolution of the fish rhabdovirus viral haemorrhagic septicaemia virus. *J. Gen. Virol.*, **85**, 1167–1179.
- EINER-JENSEN K., AHRENS P. & LORENZEN N. (2005). Parallel phylogenetic analyses using the N, G or Nv gene from a fixed group of VHSV isolates reveal the same overall genetic typing. *Dis. Aquat. Org.*, **67**, 39–45.
- EINER-JENSEN K., BJÖRKLUND H., ORESHKOVA S., SHCHELKUNOV I., VESELY T. & LORENZEN N. (2002). Detection and typing of fish viruses. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **22**, 158–165.
- ELSAIED E., FAISAL M., THOMAS M., WHELAN G., BATTIS W. & WINTON J. (2006). Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus from muskellunge, *Esox masquinongy* (Mitchill), in Lake St Clair, Michigan, USA reveals a new sublineage of the North American genotype. *J. Fish Dis.*, **29**, 611–619.
- ENZMANN P.J. & KONRAD M. (1985). Inapparent infections of brown trout with VHS-virus. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **5**, 81–83.
- EVENSEN Ø., MEIER W., WAHLI T., OLESEN N.J., JØRGENSEN P.E.V. & HASTEIN T. (1994). Comparison of immunohistochemistry and virus cultivation for detection of viral haemorrhagic septicaemia virus in experimentally infected rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Org.*, **20**, 101–109.
- FAISAL M. & SCHULZ C.A. (2009). Detection of Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from the leech *Myzobdella lugubris* Leidy, 1851. *Parasit. Vectors*, **2**, 45.
- FAISAL M. & WINTERS A.D. (2011). Detection of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from *Diporeia* spp. (Pontoporeiidae, Amphipoda) in the Laurentian Great Lakes, USA. *Parasit. Vectors*, **4**, 2.
- FREGENEDA-GRANDES J.M. & OLESEN N.J. (2007). Detection of rainbow trout antibodies against viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) by neutralisation test is highly dependent on the virus isolate used. *Dis. Aquat. Org.*, **74**, 151–158.
- GADD T., JAKAVA-VILJANEN M., EINER-JENSEN K., ARIEL E., KOSKI P. & SIHVONEN L. (2010). Viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) genotype II isolated from European river lamprey *Lampetra fluviatilis* in Finland during surveillance from 1999 to 2008. *Dis. Aquat. Org.*, **88**, 189–198.
- GARVER K.A., HAWLEY L.M., MCCLURE C.A., SCHROEDER T., ALDOUS S., DOIG F., SNOW M., EDES S., BAYNES C. & RICHARD J. (2011). Development and validation of a reverse transcription quantitative PCR for universal detection of viral hemorrhagic septicemia virus. *Dis. Aquat. Org.*, **95**, 97–112.
- GOODWIN A.E. & MERRY G.E. (2011). Mortality and carrier status of bluegills exposed to viral hemorrhagic septicemia virus genotype IVb at different temperatures. *J. Aquat. Anim. Health*, **23**, 85–91.
- GROOCKOCK G.H., GETCHELL R.G., WOOSTER G.A., BRITT K.L., BATTIS W.N., WINTON J.R., CASEY R.N., CASEY J.W. & BOWSER P.R. (2007). Detection of viral hemorrhagic septicemia in round gobies in New York State (USA) waters of Lake Ontario and the St. Lawrence River. *Dis. Aquat. Org.*, **76**, 187–192.
- HAWLEY L.M. & GARVER K.A. (2008). Stability of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in freshwater and seawater at various temperatures. *Dis. Aquat. Org.*, **82**, 171–178.

HEDRICK R.P., BATTS W.N., YUN S., TRAXLER G.S., KAUFMAN J. & WINTON J.R. (2003). Host and geographic range extensions of the North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus. *Dis. Aquat. Org.*, **55**, 211–220.

HENRYON M., BERG P., OLESEN N.J., KJÆR T.E., SLIERENDRECHT W.J., JOKUMSEN A. & LUND I. (2005). Selective breeding provides an approach to increase resistance of rainbow trout to the diseases, enteric redmouth disease, rainbow trout fry syndrome, and viral haemorrhagic septicaemia. *Aquaculture*, **250**, 621–636.

HENRYON M., JOKUMSEN A., BERG P., LUND I., PEDERSEN P.B., OLESEN N.J. & SLIERENDRECHT W.J. (2002a). Erratum to “Genetic variation for growth rate, feed conversion efficiency, and disease resistance exists within a farmed population of rainbow trout” (*Aquaculture*, 2002, **209**, 59–76). *Aquaculture*, **216**, 389–390.

HENRYON M., JOKUMSEN A., BERG P., LUND I., PEDERSEN P.B., OLESEN N.J. & SLIERENDRECHT W.J. (2002b). Genetic variation for growth rate, feed conversion efficiency, and disease resistance exists within a farmed population of rainbow trout. *Aquaculture*, **209**, 59–76.

ISSHIKI T., NISHIZAWA T., KOBAYASHI T., NAGANO T. & MIYAZAKI T. (2001). An outbreak of VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in Japan. *Dis. Aquat. Org.*, **47**, 87–99.

ITO T., OLESEN N.J., SKALL H.F., SANO M., KURITA J., NAKAJIMA K. & IIDA T. (2010). Development of a monoclonal antibody against viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) genotype IVa, *Dis. Aquat. Org.*, **89**, 17–27.

JONSTRUP S.P., KAHNS S., SKALL H.F., BOUTRUP T.S., OLESEN N.J. (2012). Development and validation of a novel Taqman based real time RT-PCR assay suitable for demonstrating freedom from viral haemorrhagic septicaemia virus. Submitted to *J. Fish Dis.* (in Press).

JØRGENSEN P.E.V. (1982). Egtved virus: occurrence of inapparent infections with virulent virus in free-living rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, at low temperature. *J. Fish Dis.*, **5**, 251–255.

KANE-SUTTON M., KINTER B., DENNIS P.M. & KOONCE J.F. (2010). Viral hemorrhagic septicemia virus infection in yellow perch, *Perca flavescens*, in Lake Erie, *J. Great Lakes Res.*, **36**, 37–43.

KIM R. & FAISAL M. (2010). Experimental studies confirm the wide host range of the Great Lakes viral haemorrhagic septicaemia virus genotype IVb, *J. Fish Dis.*, **33**, 83–88.

KIM S.-M. & PARK S.-I. (2004). Detection of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in wild marine fishes in the coastal region of Korea, *J. Fish Pathol.*, **17**, 1–10.

KOCAN R., BRADLEY M., ELDER N., MEYERS T.R., BATTS W.N. & WINTON J.R. (1997). North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus is highly pathogenic for laboratory-reared pacific herring. *J. Aquat. Anim. Health*, **9**, 279–290.

KOCAN R.M., HERSHBERGER P.K., ELDER N.E. & WINTON J.R. (2001). Survival of the North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in filtered seawater and seawater containing ovarian fluid, crude oil and serum-enriched culture medium. *Dis. Aquat. Org.*, **44**, 75–78.

LAPATRA S.E. (1996). The use of serological techniques for virus surveillance and certification of finfish. *Ann. Rev. Fish Dis.*, **6**, 15–28.

LEE W.-L., YUN H.-M., KIM S.-R., JUNG S.-J. & OH M.-J. (2007). Detection of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from marine fish in the South Western Coastal Area and East China Sea, *J. Fish Pathol.*, **20**, 201–209.

LÓPEZ-VÁZQUEZ C., CONDE M., DOPAZO C.P., BARJA J.L. & BANDÍN I. (2011). Susceptibility of juvenile sole *Solea senegalensis* to marine isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus from wild and farmed fish. *Dis. Aquat. Org.*, **93**, 111–116.

LÓPEZ-VÁZQUEZ C., RAYNARD R.S., BAIN N., SNOW M., BANDÍN I. & DOPAZO C.P. (2006). Genotyping of marine viral haemorrhagic septicaemia virus isolated from the Flemish Cap by nucleotide sequence analysis and restriction fragment length polymorphism patterns. *Dis. Aquat. Org.*, **73**, 23–31.

LORENZEN E., CARSTENSEN B. & OLESEN N.J. (1999). Inter-laboratory comparison of cell lines for susceptibility to three viruses: VHSV, IHNV and IPNV. *Dis. Aquat. Org.*, **37**, 81–88.

LORENZEN N. & LAPATRA S.E. (1999). Immunity to rhabdoviruses in rainbow trout: the antibody response. *Fish Shellfish Immunol.*, **9**, 345–360.

- LORENZEN N. & LAPATRA S.E. (2005). DNA vaccines for aquacultured fish. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **24**, 201–213.
- LORENZEN N., OLESEN N.J. & VESTERGÅRD JØRGENSEN P.E. (1988). Production and characterization of monoclonal antibodies to four Egtved virus structural proteins. *Dis. Aquat. Org.*, **4**, 35–42.
- LUMSDEN J.S., MORRISON B., YASON C., RUSSELL S., YOUNG K., YAZDANPANAH A., HUBER P., AL-HUSSINEEL., STONE D. & WAY K. (2007). Mortality event in freshwater drum *Aplodinotus grunniens* from Lake Ontario, Canada, associated with viral haemorrhagic septicemia virus, Type IV. *Dis. Aquat. Org.*, **76**, 99–111.
- MEIER W. & JØRGENSEN P.E.V. (1980). Isolation of VHS virus from pike fry (*Esox lucius*) with hemorrhagic symptoms. In: Fish Diseases, Third COPRAQ Session, Ahne W., ed. Springer-Verlag, Berlin, Germany and New York, USA, 8–17.
- MEYERS T.R., SHORT S. & LIPSON K. (1999). Isolation of the North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) associated with epizootic mortality in two new host species of Alaskan marine fish. *Dis. Aquat. Org.*, **38**, 81–86.
- MEYERS T.R. & WINTON J.R. (1995). Viral hemorrhagic septicemia virus in North America. *Ann. Rev. Fish Dis.*, **5**, 3–24.
- NISHIZAWA T., IIDA H., TAKANO R., ISSHIKI T., NAKAJIMA K. & MUROGA K. (2002). Genetic relatedness among Japanese, American and European isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) based on partial G and P genes. *Dis. Aquat. Org.*, **48**, 143–148.
- NISHIZAWA T., SAVAS H., ISIDAN H., ÜSTÜNDAG C., IWAMOTO H. & YOSHIMIZU M. (2006). Genotyping and pathogenicity of viral hemorrhagic septicemia virus from free-living turbot (*Psetta maxima*) in a Turkish coastal area of the Black Sea. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 2373–2378.
- OLESEN N.J. (1998). Sanitation of viral haemorrhagic septicaemia (VHS). *J. Appl. Ichthyol.*, **14**, 173–177.
- OLESEN N.J. & JØRGENSEN P.E.V. (1991). Rapid detection of viral haemorrhagic septicaemia virus in fish by ELISA. *J. Appl. Ichthyol.*, **7**, 183–186.
- OLESEN N.J. & KORSHOLM H. (1997). Control measures for viral diseases in aquaculture: eradication of VHS and IHN. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **17**, 229–233.
- OLESEN N.J., LORENZEN N. & JØRGENSEN P.E.V. (1993). Serological differences among isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus detected by neutralizing monoclonal and polyclonal antibodies. *Dis. Aquat. Org.*, **16**, 163–170.
- OLESEN N.J. & VESTERGÅRD JØRGENSEN P.E. (1982). Can and do herons serve as vectors for Egtved virus? *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **2**, 48.
- OLESEN N.J. & VESTERGÅRD JØRGENSEN P.E. (1992). Comparative susceptibility of three fish cell lines to Egtved virus, the virus of viral haemorrhagic septicaemia (VHS). *Dis. Aquat. Org.*, **12**, 235–237.
- PARRY L. & DIXON P.F. (1997). Stability of nine viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) isolates in seawater. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **17**, 31–36.
- PEDDIE S., MCLAUCHLAN P.E., ELLIS A.E. & SECOMBES C.J. (2003). Effect of intraperitoneally administered IL-1b-derived peptides on resistance to viral haemorrhagic septicaemia in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Org.*, **56**, 195–200.
- PETERS F. & NEUKIRCH M. (1986). Transmission of some fish pathogenic viruses by the heron, *Ardea cinerea*. *J. Fish Dis.*, **9**, 539–544.
- ROSS K., MCCARTHY U., HUNTLY P.J., WOOD B.P., STUART D., ROUGH E.I., SMAIL D.A. & BRUNO D.W. (1994). An outbreak of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in turbot (*Scophthalmus maximus*) in Scotland. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **14**, 213–214.
- SCHLOTTFELDT H.J. & AHNE W. (1988). Epizootics in brown trout (*Salmo trutta fario*) caused by VHSV-F1. *J. Appl. Ichthyol.*, **4**, 147–148.
- SCHLOTTFELDT H.-J., AHNE W., JØRGENSEN P.E.V. & GLENDE W. (1991). Occurrence of viral haemorrhagic septicaemia in turbot (*Scophthalmus maximus*) – a natural outbreak. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **11**, 105–107.

SKALL H.F., OLESEN N.J. & MELLERGAARD S. (2005). Viral haemorrhagic septicaemia virus in marine fish and its implications for fish farming – a review. *J. Fish Dis.*, **28**, 509–529.

SNOW M., BAIN N., BLACK J., TAUPIN V., CUNNINGHAM C.O., KING J.A., SKALL H.F. & RAYNARD R.S. (2004). Genetic population structure of marine viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV). *Dis. Aquat. Org.*, **61**, 11–21.

SNOW M., CUNNINGHAM C.O., MELVIN W.T. & KURATH G. (1999). Analysis of the nucleoprotein gene identifies distinct lineages of viral haemorrhagic septicaemia virus within the European marine environment. *Virus Res.*, **63**, 35–44.

SOLIMAN H. & EL-MATBOULI M. (2006). Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for rapid detection of viral hemorrhagic septicaemia virus (VHS), *Vet. Microbiol.*, **114**, 205–213.

STONE D.M., FERGUSON H.W., TYSON P.A., SAVAGE J., WOOD G., DODGE M.J., WOOLFORD G., DIXON P.F., FEIST S.W. & WAY K. (2008). The first report of viral haemorrhagic septicaemia in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in the United Kingdom, *J. Fish Dis.*, **31**, 775–784

TAKANO R., NISHIZAWA T., ARIMOTO M. & MUROGA K. (2000). Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from wild Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **20**, 186–192.

THOMPSON T.M., BATTS W.N., FAISAL M., BOWSER P., CASEY J.W., PHILLIPS K., GARVER K.A., WINTON J. & KURATH G. (2001). Emergence of Viral hemorrhagic septicemia virus in the North American Great Lakes region is associated with low viral genetic diversity. *Dis. Aquat. Org.*, **96** (1), 29–43.

TRAXLER G.S., KIESER D. & RICHARD J. (1999). Mass mortality of pilchard and herring associated with viral hemorrhagic septicemia virus in British Columbia, Canada. *Fish Health Sect. Am. Fish Soc. Newslett.*, **27**, 3–4.

WALKER PJ, BENMANSOUR A, DIETZGEN R *ET AL.* (2000). Family Rhabdoviridae. *In: Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L. *et al.*, eds. 563–583.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA), Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS), Veterinary Service (VS). Species affected by the Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS) Federal Order, Available at: http://dnr.wi.gov/fish/documents/vhs_fedorderModList.pdf

UNITED STATES DEPARTMENT OF THE INTERIOR, US GEOLOGICAL SURVEY (2007). Detection of viral hemorrhagic septicemia virus. USGS FS 2007-3055. US Department of the Interior, US Geological Survey. Fact Sheets.

WOLF K. (1988). Viral hemorrhagic septicemia. *In: Fish Viruses and Fish Viral Diseases*. Cornell University Press, Ithaca, New York, USA, 217–249.

*
* *

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la Septicemia hemorrágica viral (puede consultarse en la Tabla del final de este *Manual Acuático* o en la página web de la OIE: www.oie.int)

CAPÍTULO 2.3.10.

HERPESVIROSIS DEL SALMÓN MASOU

1. Ámbito de aplicación

La herpesvirosis del salmón masou (*Oncorhynchus masou*) (HVSM) es un trastorno oncógeno que cursa con ulceraciones de la piel y hepatitis en peces salmónidos de Japón, y que probablemente también tiene lugar en los ríos costeros de Asia oriental en los que habita salmón del Pacífico.

2. Información sobre la enfermedad

2.1. Factores del agente

2.1.1. El agente patógeno, cepas del agente

El agente etiológico es el virus de *Oncorhynchus masou* (VOM), de la familia Herpesviridae, aunque también se ha denominado virus Nerka del Lago Towada, un lago de la prefectura de Akita y Amori (VNLT), virus del tumor de Yamame (VTY), virus del tumor del coho (VTSC), virus de *O. kisutch* (VOK), herpesvirus del coho (HVSC), virus del riñón de la trucha arco iris (VRTA) o herpesvirus de la trucha arco iris (HVRTA) (Yoshimizu *et al.*, 1995).

2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

Se observó una reducción significativa en el título infeccioso del VOM en un plazo de 3 y de 7 días en agua ambiental a 15°C y a 10°C, respectivamente. No obstante, la infectividad se mantuvo durante 7-14 días en un ambiente de menos de 5°C (Yoshimizu *et al.*, 2005), lo cual indica la presencia de cepas bacterianas con actividad antivírica en el agua.

2.1.3. Estabilidad del agente (métodos eficaces de inactivación)

En acuicultura, a menudo es fundamental disponer de suministros de agua libre de patógenos. El agua que procede de ríos o lagos, a menudo utilizada en los viveros, contiene agentes patógenos para los peces. Este tipo de suministros de agua abierta no deben utilizarse sin un tratamiento que permita matar dichos agentes patógenos para los peces. Los virus de los peces se clasifican en dos grupos en función de su sensibilidad a la luz UV. El VOM pertenece a un grupo sensible y se inactiva por tratamiento con una dosis de radiación ultravioleta de 10^4 μ W segundo cm^{-2} (Yoshimizu *et al.*, 1986). A 15°C durante 20 minutos, las concentraciones mínimas de yodóforos, solución de hipoclorito de sodio, solución de cloruro de benzalconio, solución de cresol saponificada, solución de formaldehído y solución de permanganato de potasio que permiten un 100% de reducción de la placa de VOM fueron de 40, 50, 100, 100, 3.500 y 16 mg litro^{-1} , respectivamente (Hatori *et al.*, 2003).

El VOM es sensible al calor, al éter y al medio ácido (pH 3) y no hemaglutina células O humanas. Se inactiva por completo mediante radiación ultravioleta (UV) con $3,0 \times 10^3$ μ W segundo cm^{-2} . En presencia de 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ del análogo de la pirimidina 5- yododesoxiuridina (IUdR), la replicación se inhibe. La replicación del VOM también se inhibe mediante agentes antiherpéticos, como el fosfonoacetato (PA), el aciclovir (ACV), la (E)-5-(2-bromovinil)-2'-desoxiuridina (BVdU), y la 1-B-D-arabino- furanosilcitosina (Ara-C), debido a la inhibición de la ADN polimerasa inducida por el VOM (Kimura *et al.*, 1981a; 1983a; 1983b).

2.1.4. Ciclo de vida

Tras la fase de septicemia de la infección por el VOM, tiene lugar una respuesta inmunitaria que da lugar a la síntesis de anticuerpos neutralizantes contra el VOM. A menudo se produce un estado de portador que hace que el virus se excrete con los productos sexuales en el momento del desove.

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles (nombres comunes y científicos)

Las especies de peces que son susceptibles al VOM son las siguientes: el salmón rojo (*Oncorhynchus nerka*), el salmón masou (*O. masou*), el keta (*O. keta*), el coho (*O. kisutch*) y la trucha arco iris (*O. mykiss*) (Kimura *et al.*, 1983c).

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

La edad de los peces es crucial y los alevines de 1 mes son la diana más susceptible del virus (Kimura *et al.*, 1981b; 1983c). El factor ambiental que más favorece la infección por el VOM es una baja temperatura del agua, inferior a los 15°C (Kumagai *et al.*, 1994).

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

Los salmónidos son los únicos peces susceptibles a la infección por el VOM; de más a menos susceptibles, los peces se ordenan como sigue: salmón rojo, keta, salmón masou, coho y trucha arco iris (Kimura *et al.*, 1983a).

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

Clínicamente, la infección inicial por el VOM es sistémica y a menudo letal, y se asocia a edema y hemorragias. La multiplicación del virus en células endoteliales de los capilares sanguíneos, tejidos hematopoyéticos y hepatocitos subyace a los signos clínicos. Cuatro meses después de los primeros signos clínicos, una cantidad variable de peces supervivientes presenta epitelomas que tienen lugar principalmente alrededor de la boca (mandíbula superior o inferior), y, en menor grado, en la aleta caudal, el opérculo y la superficie del cuerpo (Kimura *et al.*, 1981a; Yoshimizu *et al.*, 1987). Esta neoplasia puede persistir durante incluso 1 año tras la infección. En el caso del coho, en concreto peces infectados de 1 año de edad presentan úlceras en la piel, manchas blancas en el hígado y tejidos neoplásicos alrededor de la boca o en la superficie del cuerpo. En el caso de la trucha arco iris, peces de tamaño comercial fueron infectados y los peces enfermos casi no presentaron signos externos, aunque algunos manifestaron lesiones ulcerantes en la piel. Internamente, se observaron hemorragias intestinales y manchas blancas en el hígado (Furihata *et al.*, 2003).

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

En condiciones naturales, los supervivientes a la HVSM quedan infectados de forma persistente por el virus y lo excretan; los peces retienen el virus hasta la edad adulta (Yoshimizu *et al.*, 1993).

2.2.6. Vectores

El agua es el principal vector abiótico. No obstante, en la transmisión también pueden intervenir otras especies de peces, como invertebrados parasitarios o aves y mamíferos piscívoros.

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

Existe un caso de ejemplares de salmón masou que se capturaron en la boca del río y que presentaban neoplasias alrededor de la boca, de las cuales se aisló el VOM. Recientemente, se ha observado que truchas arco iris que vivían en el río y que podrían haber escapado de piscifactorías estaban infectadas por el VOM y murieron (Furihata *et al.*, 2003; Yoshimizu y Nomura, 2001).

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mecanismos de transmisión

Los reservorios del VOM son peces infectados clínicamente y abarcan portadores de entre grupos de peces de piscifactoría, asilvestrados o salvajes. El virus infeccioso se excreta con las heces, la orina, productos sexuales y probablemente el moco de la piel, mientras que el riñón, el bazo, el hígado y los tumores son los lugares donde el virus es más abundante durante el curso de una infección manifiesta. La transmisión del VOM es horizontal y posiblemente “se asocia a la superficie de los huevos”. La transmisión horizontal puede ser directa o vectorial, en la que el agua es el principal factor abiótico. La desinfección de los huevos justo después de la fecundación y del desarrollo embrionario es eficaz para la prevención de la infección por el VOM. La enfermedad causada por el VOM no se ha observado en alevines procedentes de huevos desinfectados que han sido incubados y desovados en agua libre del virus (Yoshimizu, 2009).

2.3.2. Prevalencia

Se ha aislado el VOM del salmón masou en todos los lugares estudiados a excepción de un vivero. En base a nuestro estudio epizootiológico, se considera que las raíces del VOM se encuentran en la costa del Mar de Japón a la altura de Hokkaido, y se considera que el salmón masou fue una de las primeras especies hospedadoras. En los años 1960, se recogieron huevos de salmón masou de los ríos de la costa del Mar de Japón a la altura de Hokkaido, y se transportaron a la isla de Honshu, la principal del archipiélago japonés. Con los desplazamientos de peces sin restricción, el virus se propagó a varios lugares de Honshu, donde se observó el primer cáncer en salmón masou (Kimura, 1976). Posteriormente, se llevaron a cabo cultivos de coho y de trucha arco iris en las mismas aguas en las que se había cultivado el salmón masou. El coho podría haber resultado infectado por el VOM en la fase de alevín en agua dulce, porque se hallaron tejidos tumorales alrededor de la boca de ejemplares de coho cultivados en compartimientos en el mar; el vivero del cual se trasplantaron ejemplares de coho a compartimientos en el mar tenía antecedentes de HVSM (Furihata *et al.*, 2003; Kumagai *et al.*, 1994; Yoshimizu y Nomura, 2001).

2.3.3. Distribución geográfica

Tras los primeros informes de HVSM en el norte de Japón (Kimura *et al.*, 1980), la zona geográfica considerada afectada por la enfermedad se ha vuelto muy amplia dentro de Japón. No se dispone de informes de la aparición de la enfermedad fuera de este país.

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

Se ha estudiado experimentalmente la susceptibilidad de los alevines de varias especies de salmónidos al VOM, mediante inmersión en agua que contenía 100 DICT₅₀ (mediana de la dosis infectiva en cultivo tisular) ml⁻¹ de VOM a 10°C durante 1 hora. Al comparar los alevines de las cinco especies distintas de salmónidos, a la edad de 1 mes, se observó que el salmón rojo presentaba la mayor sensibilidad, con un 100% de mortalidad. El salmón masou y el keta también presentaron una alta sensibilidad, con mortalidades del 87% y del 83%, respectivamente. El coho y la trucha arco iris presentaron menos sensibilidad a la infección por el VOM, con mortalidades del 39% y de 29%, respectivamente. Así, el VOM tiene muchos hospedadores entre las especies de salmónidos (Kimura *et al.*, 1983c). Ocho grupos de edad de keta (de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 meses de edad) se sumergieron en las mismas condiciones. La mortalidad acumulada del keta acabado de desovar, observada a lo largo de los 4 meses siguientes, fue del 35%, pero en alevines de entre 1 y 5 meses de vida, fue superior al 80%. A los 6 y 7 meses, la susceptibilidad de los alevines se redujo y solo un 7% y un 2% de los peces, respectivamente, sucumbieron a la enfermedad. No hubo muertes en los alevines de 8 meses de edad. Por otra parte, los alevines de salmón masou de 1 mes de vida fueron más sensibles y la mortalidad acumulada alcanzó el 87%. En alevines de entre 3 y 5 meses de vida, la mortalidad acumulada descendió del 65% al 24% (Kimura *et al.*, 1983c). Desde 1988, se habían aislado herpesvirus del hígado, el riñón y neoplasias en desarrollo en coho cultivados en estanque y en compartimientos en el mar (Kumagai *et al.*, 1994). Los peces afectados mostraban los siguientes signos clínicos: úlceras en la piel, manchas blancas en el hígado y tejidos neoplásicos en la boca o la superficie corporal. El cultivo del coho resultó afectado económicamente por esta enfermedad. Todos estos virus se neutralizaron mediante suero de conejo anti-VOM o anti-VNLT, y se confirmó oncogenicidad mediante infección experimental. El virus aislado mostró una fuerte patogenicidad en el coho. En cuanto a la trucha arco iris, se han observado casos de mortalidad masiva en cultivos de estanque de Hokkaido desde 1992. Los peces enfermos casi no han mostrado signos clínicos. Algunos peces han presentado lesiones ulcerantes en la piel. Internamente, se han observado hemorragias intestinales y manchas blancas en el hígado. Tuvieron lugar epizootias en trucha arco iris de piscifactoría de entre 12 g y 1,5 kg de peso en 18 piscifactorías entre febrero del 2000 y enero del 2001 en la Prefectura de Nagano, en Japón. Se hallaron títulos de infectividad altos, de alrededor de 10⁸ DICT₅₀ g⁻¹ en los principales órganos internos y se observaron múltiples focos necróticos en el hígado. El virus se identificó como VOM utilizando pruebas serológicas y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En más del 80% de los casos, los brotes se asociaron a introducciones de peces vivos (Furihata *et al.*, 2003).

2.3.5. Factores ambientales

En los viveros se aplican medidas de higiene general por norma. Debe tenerse cuidado de evitar los traslados de equipo de un tanque a otro, todo el cual debe desinfectarse tras cada uso. Deben desarrollarse cuidadosamente métodos de desinfección de cada unidad de desove, teniendo en cuenta la toxicidad de las sustancias químicas para los peces, los efectos de la temperatura del agua y su uso reiterado. Debe recordarse que los trabajadores en sí podrían servir de eficientes vectores a los agentes patógenos y que una cuidadosa desinfección de manos y botas será necesaria para prevenir la diseminación de los virus. Aunque tal vez sea difícil desinfectar las unidades de desove y engorde cuando se están utilizando, los canales y estanques deben desinfectarse con cloro antes y después de ser usados (Yoshimizu, 2009).

2.4. Control y prevención

El VOM es sensible al tratamiento con radiación ultravioleta, con ozono y con iodóforos (Yoshimizu y Kasai, 2011). Desde 1983, se ha recomendado vivamente como estrategia de control la inspección del líquido ovárico de peces adultos y la desinfección con yodo de huevos recogidos en todos los viveros de Hokkaido al inicio de la fase de desarrollo embrionario. Actualmente, en la mayoría de viveros de esta zona ya no se detecta el VOM. Hoy en día, todos los huevos e instalaciones se han desinfectado con iodóforos justo antes de la fecundación y de nuevo al principio del desarrollo embrionario. Gracias a ello, ya no se aísla VOM de la zona de Hokkaido y Tohoku, y se podrían evitar los brotes de HVSM en salmón masou y en coho, aunque no en trucha arco iris (Furihata *et al.*, 2003; Yoshimizu, 2009).

2.4.1. Vacunación

La vacunación de trucha arco iris adulta con VOM inactivado por formalina podría reducir el porcentaje de resultados positivos al VOM en los análisis de líquido ovárico (Yoshimizu y Kasai, 2011). Además, la vacunación con VOM inactivado por formalina es muy eficaz para proteger a los alevines de la infección por el VOM (Yoshimizu y Kasai, 2011).

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

La eficacia terapéutica del compuesto ACV (manzana, sidra y vinagre) se evaluó utilizando el VOM y alevines de keta. Los peces se infectaron experimentalmente con el VOM, y se trataron con ACV por vía oral o por inmersión. La inmersión diaria de peces en solución de ACV ($25 \mu\text{g ml}^{-1}$, 30 minutos día^{-1} , 15 veces) redujo la mortalidad de los peces infectados. La administración por vía oral de ACV ($25 \mu\text{g pez}^{-1}$ al día, 60 veces) no afectó a la supervivencia del keta. Por el contrario, el grupo al que se administró IUdR por vía oral mostró una mayor supervivencia que el grupo al que se administró ACV. Esto sugirió que no se mantuvo un nivel eficaz de ACV en los peces que recibieron el producto por vía oral. La inmersión diaria de peces infectados en solución de ACV ($25 \mu\text{g ml}^{-1}$, 30 minutos día^{-1} , 60 veces) suprimió considerablemente el desarrollo de tumores inducidos por el VOM (Kimura *et al.*, 1983a; 1983b).

2.4.3. Inmunoestimulación

Actualmente no se dispone de ninguna información publicada sobre el uso de inmunoestimulantes para el control de la HVSM en salmónidos. Sin embargo, se sabe que este es un campo de investigación interesante.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

Actualmente no se dispone de ninguna información publicada sobre el uso de la selección genética a favor de la resistencia para el control de la HVSM en salmónidos.

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

Los híbridos constituyen un posible método de control para prevenir pérdidas importantes derivadas de la HVSM. En estudios sobre una población de salmónidos híbridos triploides (trucha arco iris tetrámera x trucha marina) se ha observado que son resistentes a la HVSM.

2.4.6. Agentes bloqueantes

No es aplicable.

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

La desinfección de los huevos puede llevarse a cabo mediante tratamiento con iodóforos. Se ha observado que el VOM se inactiva mediante iodóforos a razón de 50 mg litro^{-1} durante 15 minutos a 15°C , o 25 mg litro^{-1} durante 20 minutos a 15°C (Yoshimizu, 2009).

2.4.8. Prácticas generales de manejo

Las medidas de bioseguridad deben incluir el garantizar que los peces que se introduzcan procedan de lugares libres de la enfermedad, así como la instalación de un sistema de cuarentena donde puedan alojarse los peces recién llegados con peces centinela, a temperaturas que permitan la infección por la HVSM. Así, los peces serán sometidos a cuarentena durante un mínimo de 4 semanas y hasta 2 meses antes de ser transferidos al estanque principal y mezclados con peces nunca antes expuestos al virus. Las medidas de higiene de dicho lugar deben ser similares a las recomendadas

para la necrosis hematopoyética infecciosa (NHI) e incluir desinfección de huevos, desinfección periódica de los estanques, desinfección química del equipo de la piscifactoría y una cuidadosa manipulación de los peces para no causarles estrés, así como una eliminación inocua de los peces muertos.

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

Peces afectados clínicamente: alevines enteros (longitud corporal ≤ 4 cm), vísceras, incluido el riñón ($4 \text{ cm} \leq \text{longitud corporal} \leq 6 \text{ cm}$) o, en el caso de peces más grandes, lesiones ulcerantes cutáneas o tejidos neoplásicos, y el riñón, el bazo, el hígado y el encéfalo.

Peces aparentemente sanos: el riñón, el bazo y el encéfalo (en peces de cualquier tamaño) y/o líquido ovárico de reproductores en el momento del desove.

3.2. Conservación de las muestras para su envío

Deben enviarse peces enteros al laboratorio vivos o muertos y empaquetados individualmente en recipientes asépticos precintados. No obstante, es claramente preferible y recomendable obtener muestras de órganos de los peces inmediatamente después de extraerlos del agua. Deben enviarse al laboratorio peces enteros o muestras de órganos seleccionados, en recipientes refrigerados ($+0^{\circ}\text{C}$ a 5°C) y con hielo. Debe evitarse la congelación tanto de peces como de órganos.

3.3. Combinación de varias muestras

Cuando se analizan peces afectados clínicamente mediante cultivo celular o métodos basados en la PCR, debe evitarse la combinación de muestras, o restringirse a un máximo de cinco peces por muestra combinada. En el caso del cultivo celular para la vigilancia sanitaria, las muestras deben estar formadas por un máximo de cinco peces cada una.

3.4. Órganos y tejidos de elección

Peces afectados clínicamente: alevines enteros (longitud corporal ≤ 4 cm), vísceras, incluido el hígado o el riñón ($4 \text{ cm} \leq \text{longitud corporal} \leq 6 \text{ cm}$) o, en el caso de peces más grandes, lesiones ulcerantes cutáneas o tejidos neoplásicos, y el hígado o el riñón.

Peces aparentemente sanos: el hígado, el riñón, el bazo y el encéfalo (en peces de cualquier tamaño) y/o líquido ovárico de reproductores en el momento del desove.

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados(es decir, en los que nunca es posible detectar el agente)

Los peces muertos en los que se observen signos de descomposición tisular muy avanzada pueden no ser adecuados para el análisis por ningún método.

4. Métodos de diagnóstico

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

Clínicamente, la infección inicial por el VOM es una infección sistémica y a menudo letal que se asocia a edema y hemorragias. La multiplicación del virus en células endoteliales de los capilares sanguíneos, tejidos hematopoyéticos y hepatocitos subyace a los signos clínicos (Kimura *et al.*, 1981b). Cuatro meses después de los primeros signos clínicos, una cantidad variable de peces supervivientes presenta epitelomas que tienen lugar principalmente alrededor de la boca (mandíbula superior o inferior), y, en menor grado, en la aleta caudal, el opérculo y la superficie corporal (Kimura *et al.*, 1981a; Yoshimizu *et al.*, 1987). Esta neoplasia puede persistir durante incluso 1 año tras la infección. En el caso del coho, en concreto peces infectados de 1 año de edad presentan úlceras en la piel, manchas blancas en el hígado y tejidos neoplásicos alrededor de la boca o en la superficie del cuerpo. En el caso de la trucha arco iris, peces de tamaño comercial fueron infectados y los peces enfermos casi no presentaron signos externos, aunque algunos manifestaron lesiones ulcerantes en la piel.

Internamente, se observaron hemorragias intestinales y manchas blancas en el hígado (Furihata *et al.*, 2003).

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Los peces se vuelven letárgicos, y se agrupan en la salida de agua o en los laterales de un estanque. Algunos pueden sufrir pérdida del equilibrio y desorientación.

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

En los peces infectados, los signos clínicos son falta de apetito y exoftalmia, así como petequias en la superficie corporal, sobre todo debajo de la mandíbula inferior. No se ha observado natación agónica ni anómala. Internamente, el hígado presenta manchas blancas, y en los casos avanzados todo el hígado se vuelve de color blanco perla. En algunos casos, se observa hinchazón esplénica. En el tracto digestivo no hay alimento (Kimura *et al.*, 1981b).

4.2.2. Bioquímica clínica

No se dispone de información publicada.

4.2.3. Anatomopatología microscópica

El riñón de los ejemplares infectados de salmón masou de 1 y 3 meses de vida, del coho de 1 mes de vida y del keta de 2 meses de vida es el principal órgano diana del virus, a juzgar por la gravedad de las alteraciones histopatológicas halladas en salmón masou infectado de 1 mes de vida. Se observó necrosis de células epiteliales y de riñón en los primeros ejemplares moribundos, y necrosis del hígado, del bazo y del páncreas en los últimos ejemplares moribundos de este grupo. Se observó necrosis del tejido hematopoyético del riñón en salmón masou infectado de 3 meses de vida. Aunque el riñón se consideró el órgano diana del VOM, progresivamente adquirió resistencia a la infección por el VOM. Por ello, se interpretó que el principal órgano diana pasaba de ser el riñón a ser el hígado, y en las últimas fases se observaron destacadas alteraciones histopatológicas hepáticas. Los focos de necrosis del hígado tendían a ser más intensos con un periodo de incubación más largo. Había hepatocitos que presentaban marginación de la cromatina. También se observó degeneración celular en el bazo, el páncreas, el músculo cardíaco y el encéfalo (Kimura *et al.*, 1983c). Las alteraciones histopatológicas observadas en coho y en keta fueron las mismas que las observadas en salmón masou (Tanaka *et al.*, 1984). En el caso de la trucha arco iris, se observaron altos títulos de infectividad en los principales órganos internos y múltiples focos necróticos en el hígado. La alteración definitiva fue una necrosis de las células infectadas por el VOM, que se observaron en el bazo, tejidos hematopoyéticos del riñón, el hígado, el intestino, el corazón, los filamentos de las branquias, la epidermis y la musculatura lateral. En concreto, el intestino mostró una intensa necrosis y hemorragia en el epitelio y tejidos subyacentes, lo cual es la nueva descripción del herpesvirus de la trucha arco iris (Furihata *et al.*, 2003).

4.2.4. Preparaciones húmedas

El VOM se ha identificado en improntas de contacto de riñón mediante la prueba de la inmunofluorescencia indirecta (IFAT).

4.2.5. Frotis

No se dispone de información publicada.

4.2.6. Microscopía electrónica/citopatología

Se han detectado partículas víricas mediante examen por microscopía electrónica de transmisión (MET) de tejidos hepáticos de keta, salmón masou, coho y trucha arco iris infectados clínicamente (Kimura *et al.*, 1980; Tanaka *et al.*, 1984). La microscopía electrónica de células infectadas pone de manifiesto que las cápsidas hexagonales intranucleares tienen un diámetro de 115 nm. También se observan abundantes viriones con envoltura protuyendo, de 200 x 240 nm de diámetro, en la superficie y dentro de vesículas citoplasmáticas. El número calculado de capsómeros de viriones teñidos negativamente es de 162. Estas características confirman que el VOM es un herpesvirus.

4.3. Métodos de detección e identificación del agente

La infectividad del agente permanece intacta durante al menos 2 semanas a 0-5°C, pero a -20°C, el 99,9% de la infectividad se pierde en un plazo de 17 días. El aislamiento del virus debe llevarse a cabo utilizando peces transportados sobre hielo al laboratorio. Para la filtración del VOM, se recomienda utilizar un filtro (de policarbonato) con un nucleoporo de 0,40 µm porque el filtro de membrana de acetato de celulosa atrapa partículas víricas. Para un estudio virológico de salmónidos adultos, se recoge líquido ovárico por el método descrito por Yoshimizu *et al.* (1985), añadiendo el mismo volumen de antibiótico y dejándolo reaccionar a 5°C durante toda la noche. En el caso del tejido tumoral, se corta el tejido y se desinfecta con yodóforo, y después se lava con BSS de Hank y se transporta con una solución de antibiótico al laboratorio. Los tejidos tumorales deben prepararse para el cultivo primario o el co-cultivo con células RTG-2. Tras cada subcultivo de células de cultivo primario, debe llevarse a cabo la inspección de virus en el medio de cultivo. Normalmente se recogen células RTG-2 y se inoculan; la temperatura adecuada para la incubación es de 15°C. Se utilizó en el laboratorio suero de conejo o anticuerpo monoclonal contra el VOM para una prueba de inmunofluorescencia (Hayashi *et al.*, 1993), y también se utilizó una sonda de ADN para la detección del genoma vírico (Gou *et al.*, 1991). Con la PCR, utilizando un cebador F10 y un cebador R05 (Aso *et al.*, 2001) se amplificó un segmento de ADN de 439 pares de bases de cepas del VOM aisladas de salmón masou, coho y trucha arco iris, y de tejido de hígado, riñón, encéfalo y sistema nervioso. El perfil de ADN amplificado en el gel de agarosa permitió distinguir el VOM del herpesvirus *H. salmonis* (Aso *et al.*, 2001).

4.3.1. Métodos directos de detección

Se identificó el VOM en improntas de contacto de riñón, mediante IFAT. El método más utilizado para la detección del VOM directamente en tejidos de pez es la PCR específica del VOM.

4.3.1.1. Métodos microscópicos

4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

Se han detectado antígenos del virus en tejidos infectados, mediante IFAT. En el caso del coho, se trasplantan peces cultivados en un estanque a un compartimiento de red en el mar. Se someten a gran presión tejidos de riñón para que se adapten al medio marino. Durante este periodo, se replica VOM y aparece antígeno de VOM en tejidos renales. El método de la inmunofluorescencia indirecta es útil y eficaz para detectar los peces infectados por el VOM (Kumagai *et al.*, 1994).

4.3.1.1.2. Frotis

No se dispone de información publicada.

4.3.1.1.3. Cortes fijados

Este método se detalla en el apartado 4.3.1.1.1 anterior, y también es adecuado para la detección de antígeno del VOM en cortes incluidos en parafina y fijados en formalina tamponada neutra (NBF) al 10%. Un tratamiento frecuente es la incubación de los cortes con tripsina al 0,1% en PBS a 37°C durante 30 minutos. A continuación, los cortes se lavan en PBS fría.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

Línea celular a utilizar: RTG-2 o CHSE-214.

Inoculación de monocapas celulares

- i) Se prepara una dilución decimal adicional de los sobrenadantes de homogenado de órgano a 1/10 y se transfiere un volumen adecuado de cada una de las dos diluciones a monocapas celulares de 24 horas de edad. Se inoculan al menos 2 cm² de monocapa celular drenada con 100 µl de cada dilución.
- ii) Se deja adsorber durante 1 hora a 15°C y, sin retirar el inoculado, se añade medio de cultivo celular tamponado a pH 7,4 y suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 2% (1 ml pocillo⁻¹ en el caso de las placas de cultivo celular de 24 pocillos), y se incuba a 15°C.

Seguimiento de la incubación

- i) Se sigue el curso de la infección en controles positivos y otros cultivos celulares inoculados, mediante examen microscópico a 4 o 10 aumentos y durante 14 días. Se recomienda utilizar un microscopio de contraste de fases.

- ii) Durante la incubación, se mantiene el pH del medio de cultivo celular a 7,2-7,4. Esto se puede lograr añadiendo tampón bicarbonato estéril (en el caso de los frascos de cultivo celular muy bien cerrados) o solución de tampón de Tris (en el caso de las placas de cultivo) al medio de cultivo celular inoculado o, mejor aun, utilizando medio tamponado con HEPES (HEPES= ácido N-2-hidroxietil-piperazina-N-2-etanosulfónico).
- iii) Si aparece un efecto citopático (ECP) en los cultivos celulares inoculados con las diluciones de los sobrenadantes del homogenado problema, deben llevarse a cabo los procedimientos de identificación de inmediato (véase la prueba de neutralización, abajo).

Si se está implementando un programa de vigilancia/control, tal vez tengan que tomarse medidas para suspender el reconocimiento del estado sanitario de la unidad y/o zona de producción (si con anterioridad se reconoció) de la cual proceda la muestra positiva al virus. La suspensión del reconocimiento sanitario se mantendrá hasta que se demuestre que el virus en cuestión no es el VOM.
- iv) Si no aparece ECP en los cultivos inoculados (a pesar del avance normal del ECP en los controles positivos), los cultivos inoculados deben subcultivarse durante 7 días más. En el caso de que el control positivo no desarrolle ECP, el proceso debe repetirse con células susceptibles nuevas y nuevos lotes de muestra

Procedimientos del subcultivo

- i) Se recogen alícuotas de medio de cultivo celular de todas las monocapas inoculadas con diluciones de cada sobrenadante de homogenado de órganos.
- ii) Si es necesario, se repite la prueba de neutralización del virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI) y/o del virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (VNHI) como se ha descrito anteriormente (véase el Capítulo 2.30, apartado, 2.2.3), con una dilución del sobrenadante anterior (1/10 a 1/100).
- iii) Se inoculan monocapas celulares como se ha descrito arriba.
- iv) Se incuban y controlan como se ha descrito arriba.
- v) Si no aparece ECP, la prueba puede declararse negativa.

Aislamiento del VOM de cultivos de células neoplásicas

- i) Se recogen tejidos neoplásicos, se desinfectan con yodóforo, a razón de 50 partes por millón durante 20 minutos, y se lavan tres veces con solución salina equilibrada de Hanks.
- ii) Los tejidos se dejan toda la noche en tripsina al 0,25% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a 5°C. A continuación, se siembran $3,5 \times 10^5$ células neoplásicas/ml en un frasco de cultivo tisular y se incuban con medio de cultivo que contenga FBS al 20%.
- iii) Se recoge el cultivo celular neoplásico primario y se co-cultiva con células RTG-2 o CHSE-214.
- iv) Se incuba y se controla como se ha descrito arriba.

4.3.1.2.2. Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos

Prueba de neutralización

- i) Se recoge el medio de cultivo de la monocapa celular que presente ECP y se centrifuga a 2.000 g durante 15 minutos a 4°C para eliminar detritos celulares.
- ii) Se diluye el medio que contiene el virus, pasando de 10^{-2} a 10^{-4}
- iii) Se mezclan las alícuotas de cada dilución de virus (por ejemplo, de 200 µl) con volúmenes iguales de una solución de anticuerpos específicos contra el VOM, y de forma similar se tratan alícuotas de cada dilución del virus con medio de cultivo celular. (La solución del anticuerpo neutralizante [MAb] debe tener un título de reducción del 50% en placa de al menos 2000).
- iv) Paralelamente, deben llevarse a cabo otras pruebas de neutralización contra:
 - una cepa de virus homóloga (prueba de neutralización positiva)
 - una cepa de virus heteróloga (prueba de neutralización negativa).

- v) Si es necesario, puede llevarse a cabo una prueba de neutralización similar utilizando anticuerpos contra el VNPI, para garantizar que no haya escapado ningún VNPI a la primera prueba anti-VNPI.
- vi) Se incuban todas las mezclas a 15°C durante 1 hora.
- vii) Se transfieren alícuotas de cada una de las mezclas anteriores a monocapas celulares (se inoculan dos cultivos celulares por dilución) y se dejan adsorber durante 0,5-1 hora a 15°C; para este fin son adecuadas las placas de cultivo celular de 24 o de 12 pocillos, utilizando un inóculo de 50 µl.
- viii) Cuando ha terminado la adsorción, se añade a cada pocillo medio de cultivo celular suplementado con FBS al 2% y tamponado a pH 7,4-7,6 y se incuba a 10-15°C.
- ix) Se comprueba en los cultivos celulares si ha empezado el ECP y se leen los resultados en cuanto este empieza en controles no neutralizados (protegiendo las monocapas celulares de los controles de neutralización positivos). Los resultados se registran tras un examen por microscopía simple (preferiblemente de contraste de fases) o tras desechar el medio de cultivo celular y teñir las monocapas celulares con una solución de cristal violeta al 1% en etanol al 20%.
- x) El virus problema se identifica como VOM cuando el ECP se previene o se retrasa considerablemente en los cultivos celulares que han recibido la suspensión de virus tratada con el anticuerpo específico contra el VOM, siempre que se observe ECP en todos los demás cultivos celular
- xi) En ausencia de neutralización del VOM por parte de los NAb, es obligatorio llevar a cabo una IFAT con la muestra sospechosa.

4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

PCR (Aso et al., 2001)

- i) Se extrae ácido nucleico de células infectadas por la cepa OO-7812 del VOM y por *H. salmonis* utilizando la InstGene Matrix (Biorad¹).
- ii) Se sedimentan los tejidos infectados por el virus o las células cultivadas infectadas mediante centrifugación a 19.000 *g* durante 15 minutos.
- iii) Se lavan los sedimentos dos veces con 1 ml de PBS y se mezclan con 200 µl de resina quelante (Sigma).
- iv) Se incuba la mezcla a 56°C durante 20 minutos en un baño de agua, se somete al vortex y, a continuación, se introduce en un baño de agua hirviendo durante 8 minutos.
- v) Se someten las muestras al vortex y se centrifugan a 8.200 *g* (10.000 rpm) durante 90 segundos.
- vi) Se somete el sobrenadante a PCR.
- vii) El cebador directo (F10) es 5'-GTA-CCG-AAA-CTC-CCG-AGT-C-3', y el inverso (R5), 5'-AAC-TTG-AAC-TAC-TCC-GGG-G-3'.
- viii) Se incuban las muestras, los conjuntos de cebadores y las mezclas de reacción durante 30 ciclos en un termociclador automático (GeneAmp PCR 9700, Applied Biosystems), y cada uno de estos ciclos consistirá en una desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 56°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 30 segundos.
- ix) Se analiza el tamaño y la pureza del producto amplificado mediante electroforesis (100 V durante 30 minutos) en gel de agarosa al 2% y se tiñe con bromuro de etidio.
- x) Con una PCR en la que se utilizaron estos conjuntos de cebadores se amplificó un segmento de ADN de 439 pb de cepas del VOM aisladas de salmón masou, coho y trucha arco iris, y tejido de hígado, riñón, encéfalo y sistema nervioso, y un segmento de ADN de 800 pares de bases de herpesvirus 1 de los salmónidos (HVSa1-1). El HVSa1-1 se pudo distinguir del herpesvirus 2 de los salmónidos (HVSa1-2) mediante el perfil de este ADN amplificado en el gel de agarosa (Aso et al., 2001).

1 La referencia a productos comerciales específicos como ejemplos no implica su aprobación por parte del a OIE. Esto es aplicable a todos los productos comerciales indicados en este *Manual Acuático*.

4.3.2. Métodos serológicos

4.3.2.1. Prueba de la inmunofluorescencia indirecta

- i) Se preparan monocapas de células en pocillos de 2 cm² de placas de plástico de cultivo celular o en cubreobjetos con el fin de alcanzar alrededor de un 80% de confluencia, que normalmente se logra en un plazo de 4 horas tras la incubación a 22°C (se siembran seis monocapas celulares por cepa vírica problema, más dos para el control positivo y dos para el control negativo). El contenido en FBS del medio de cultivo celular se puede reducir al 2-4%. Si tienen que identificarse muchas cepas víricas, es muy recomendable utilizar placas Terasaki.
- ii) Cuando las placas celulares estén listas para la infección, es decir, el mismo día o el día después de la siembra, se inoculan las suspensiones del virus problema por pasos de diluciones decimales seriadas directamente en los pocillos o frascos de cultivo celular.
- iii) Se diluye la suspensión de virus control de VOM de forma similar, con el fin de obtener un título vírico de unas 5.000–10.000 unidades formadoras de placa (UFP) ml⁻¹ en el medio de cultivo celular.
- iv) Se incuba a 15°C durante 48 horas.
- v) Se retira el medio de cultivo celular, se enjuaga una vez con solución PBS 0,01 M, pH 7,2, y a continuación tres veces brevemente con acetona fría (guardada a -20°C) en el caso de los portas o cubreobjetos, o bien una mezcla de acetona al 30%/etanol al 70%, también guardada a -20°C, en el caso de los pocillos de plástico.
- vi) Se deja actuar el fijador durante 15 minutos. Un volumen de 0,5 ml es suficiente para 2 cm² de monocapa celular.
- vii) Se dejan las monocapas celulares secar al aire durante al menos 30 minutos y se procesan de inmediato o se congelan a -20°C.
- viii) Se prepara una solución de anticuerpo purificado o suero contra el VOM en PBS 0,01 M, a pH 7,2, que contenga Tween 80 al 0,05% (PBST), a la dilución adecuada (que se habrá establecido previamente o que suministrará el proveedor del reactivo).
- ix) Se rehidratan las monocapas celulares mediante cuatro pasos de enjuagado con la solución de PBST, y se retira este tampón por completo tras cada enjuagado.
- x) Se tratan las monocapas celulares con la solución de anticuerpos durante 1 hora a 37°C en una cámara húmeda y se impide la evaporación. El volumen de solución a utilizar es de 0,25 ml por cada pocillo de 2 cm².
- xi) Se enjuagan cuatro veces con PBST, como arriba.
- xii) Se tratan las monocapas celulares durante 1 hora a 37°C con una solución de anticuerpos contra la inmunoglobulina utilizada en la primera capa, y preparados según las instrucciones del proveedor, conjugados a isotiocianato de fluoresceína (ITCF). Estos anticuerpos conjugados a ITCF suelen ser de conejo o de cabra.
- xiii) Se enjuagan cuatro veces con PBST.
- xiv) Se examinan las monocapas celulares tratadas en placas de plástico de inmediato, o se montan los cubreobjetos utilizando solución salina de glicerol a pH 8,5 antes de la observación al microscopio.
- xv) Se examinan bajo luz UV incidente utilizando un microscopio con oculares de 10 aumentos y objetivos de 20 a 40 aumentos con aperturas numéricas de >0,65 y >1,3, respectivamente. Antes de proceder a observación alguna, hay que asegurarse de que los controles positivo y negativo dan los resultados esperados.

4.3.2.2. Enzimoinmunoanálisis

- i) Se recubren los pocillos de microplacas diseñadas para enzimoinmunoanálisis (ELISA) con diluciones adecuadas de anticuerpos monoclonales o inmunoglobulinas (Ig) purificadas específicas del VOM, en PBS 0,01 M, a pH 7,2 (200 µl pocillo⁻¹).
- ii) Se incuban durante toda la noche a 4°C.
- iii) Se enjuagan cuatro veces con PBS 0,01 M que contenga Tween 20 al 0,05% (PBST).
- iv) Se bloquean con leche desnatada (al 5% en PBST) u otra solución bloqueante durante 1 hora a 37°C (200 µl pocillo⁻¹).
- v) Se enjuagan cuatro veces con PBST.

- vi) Se añade Triton X-100 al 2% a la suspensión de virus problema.
- vii) Se distribuyen 100 µl/pocillo de una dilución de dos o cuatro pasos del virus problema y de virus control VOM, y se dejan reaccionar con el anticuerpo de recubrimiento contra el VOM durante 1 hora a 20°C.
- viii) Se enjuagan cuatro veces con PBST.
- ix) Se añade a los pocillos anticuerpo policlonal biotinilado contra el VOM.
- x) Se incuban durante 1 hora a 37°C.
- xi) Se enjuagan cuatro veces con PBST.
- xii) Se añade peroxidasa de rábano conjugada a estreptavidina a los pocillos que han recibido el anticuerpo conjugado a biotina, y se incuban 1 hora a 20°C.
- xiii) Se enjuagan cuatro veces con PBST.
- xiv) Se añade el sustrato y cromógeno. Se detiene el curso de la prueba cuando reaccionan los controles positivos, y se realiza un seguimiento de los resultados.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

A modo de ejemplo, los métodos actualmente disponibles para la vigilancia dirigida y el diagnóstico de la HVSM se detallan en la Tabla 5.1. Las denominaciones utilizadas en la Tabla indican: a =el método es el recomendado por razones de disponibilidad, utilidad y especificidad y sensibilidad de diagnóstico; b= el método es estándar, con buena sensibilidad y especificidad de diagnóstico; c = el método tiene aplicación en algunas situaciones, pero el coste, la precisión u otros factores limitan seriamente su aplicación; y d= el método no se recomienda actualmente para este fin. Esta clasificación es de alguna forma subjetiva ya que la idoneidad implica cuestiones de fiabilidad, sensibilidad, especificidad y utilidad. Aunque no todas las pruebas incluidas en las categorías a o b se han sometido a estandarización y validación formales, su naturaleza sistemática y el hecho de que se hayan usado generalmente sin resultados dudosos las hace aceptables.

Tabla 5.1. Métodos para la vigilancia dirigida y el diagnóstico

Método	Vigilancia dirigida				Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
	Larvas	PL	Juveniles	Adultos		
Signos macroscópicos	d	b	b	b	b	c
Cultivo celular	b	b	b	b	b	a
MO directa	d	d	d	d	d	d
Histopatología	b	b	b	b	b	a
ME de transmisión	c	c	c	c	c	c
Pruebas basadas en anticuerpos	b	b	b	b	b	a
Sondas de ADN <i>in situ</i>	c	c	c	c	c	c
PCR	b	b	b	b	a	a
Secuenciación	d	d	d	d	d	d

PL = postlarvas; MO=microscopía óptica; ME = microscopía electrónica; PCR = reacción en cadena de la polimerasa.

6. Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de herpesvirosis del salmón masou

Para la prevención de la transmisión de la enfermedad desde salmónidos adultos a su descendencia es importante disponer de información sobre la distribución e incidencia del VOM. Por tanto, es importante el estudio de la frecuencia del VOM entre salmónidos adultos. Se obtuvo una muestra de sesenta peces y cada ejemplar se extrajo individualmente. Se obtuvieron muestras de líquido ovárico según el método de Yoshimizu *et al.* (1985). Se insertó una punta de pipeta automática esterilizada en el orificio urogenital del pez adulto. Se tomó un mililitro de líquido ovárico del pez y se trató con el método del tratamiento con antibiótico. Se transportaron muestras tratadas con antibiótico al laboratorio, con hielo.

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

Debe sospecharse del VOM si se cumple al menos uno de los siguientes criterios:

- i) La presencia de signos clínicos típicos de la HVSM en una población de peces susceptibles.
- ii) La presencia de alteraciones histopatológicas típicas en cortes de tejido hepático, compatibles con la HVSM.
- iii) Un solo resultado positivo en una de las pruebas de diagnóstico, como la IFAT en improntas de tejido hepático o renal, o la PCR.
- iv) La transferencia de peces vivos de un lugar donde se ha confirmado la presencia del VOM, o se ha sospechado del mismo, debido a la presencia de enfermedad clínica, a lugares sin sospecha del VOM.
- v) La detección de anticuerpos contra el VOM.

7.2. Definición de caso confirmado

Para la confirmación del VOM deben cumplirse los siguientes criterios:

- i) Mortalidad, signos clínicos y alteraciones anatomopatológicas compatibles con la HVSM y detección del VOM mediante uno o más de los siguientes métodos:
 - a) Aislamiento e identificación del VOM en cultivo celular a partir de al menos una muestra de cualquier pez del lugar, como se ha descrito en el apartado 4.3.1.2.1.
 - b) Detección del VOM mediante PCR por los métodos descritos en el apartado 4.3.1.2.3.
 - c) Detección del VOM en preparaciones tisulares por medio de anticuerpos específicos contra el VOM (por ejemplo, la IFAT en improntas de tejido, como se describe en el apartado 4.3.2);
- ii) En ausencia de mortalidad o signos clínicos, mediante uno o más de los siguientes métodos:
 - a) Detección y confirmación del VOM mediante PCR por los métodos descritos en el apartado 4.3.1.2.3;
 - b) Resultados positivos en dos pruebas diagnósticas independientes y distintas, de entre las descritas arriba.

8. Bibliografía

ASO Y., WANI J., KLENNER D.A.S. & YOSHIMIZU M. (2001) Detection and identification of *Oncorhynchus masou* virus (VOM) disease by polymerase chain reaction (PCR). *Bull. Fish. Sci. Hokkaido Univ.*, **52**, 111–116.

FURIHATA M., HOSOE A., TAKEI K., KOHARA M., NAKAMURA J., MOTONISHI A. & YOSHIMIZU M. (2003). Outbreak of salmonid herpesviral disease in cultured rainbow trout. *Fish Pathol.*, **38**, 23–25.

GOU, D. F., KUBOTA, H., ONUMA, M. & KODAMA, H. (1991) Detection of salmonid herpesvirus (*Oncorhynchus masou* virus) in fish by southern-blot technique. *J. Vet. Med. Sci.*, **53**, 43–48.

- HATORI S., MOTONISHI A., NISHIZAWA T. & YOSHIMIZU M. (2003). Virucidal effect of disinfectants against *Oncorhynchus masou* virus (VOM). *Fish Pathol.*, **38**, 185–187.
- HAYASHI Y., IZAWA H., MIKAMI T. & KODAMA H. (1993). A monoclonal antibody cross-reactive with three salmonid herpesviruses. *J. Fish Dis.*, **16**, 479–486.
- KIMURA I. (1976). Tumor of lower vertebrates. In: Cancer, Sugiyama T. & Yamamoto Y., eds. Iwanami-Shoten, Tokyo, Japan, 270–283.
- KIMURA T., SUZUKI, S. & YOSHIMIZU M. (1983a). *In vitro* antiviral effect of 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine on the fish herpesvirus *Oncorhynchus masou* virus (VOM). *Antiviral Res.*, **3**, 93–101.
- KIMURA T., SUZUKI S. & YOSHIMIZU M. (1983b). *In vivo* antiviral effect of 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine on experimental infection of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) fry with *Oncorhynchus masou* virus (VOM). *Antiviral Res.*, **3**, 103–108.
- KIMURA T., YOSHIMIZU M. & TANAKA M. (1980). Salmonid viruses, a syncytium-forming herpesvirus from landlocked *Oncorhynchus masou*. *Fish Health News*, **9**, iii.
- KIMURA T., YOSHIMISU M. & TANAKA M. (1981a). Studies on a new virus (VOM) from *Oncorhynchus masou* II. Oncogenic nature. *Fish Pathol.*, **15**, 149–153.
- KIMURA T., YOSHIMISU M. & TANAKA M. (1983c). Susceptibility of different fry stages of representative salmonid species to *Oncorhynchus masou* virus (VOM). *Fish Pathol.*, **17**, 251–258.
- KIMURA T., YOSHIMIZU M., TANAKA M. & SANNOHE H. (1981b). Studies on a new virus (VOM) from *Oncorhynchus masou* virus (VOM) I. Characteristics and pathogenicity. *Fish Pathol.*, **15**, 143–147.
- KOHARA K. & DENDA I. (2010). Production of allotriploid “Shinsyu Salmon” by chromosome manipulation. *Fish Henet. Breed. Sci.*, **37**, 6–66.
- KUMAGAI A., TAKAHASHI K. & FUKUDA H. (1994). Epizootics caused by salmonid herpesvirus type 2 infection in maricultured coho salmon. *Fish Pathol.*, **29**, 127–134.
- TANAKA M., YOSHIMISU M. & KIMURA T. (1984). *Oncorhynchus masou* virus: Pathological changes in masu salmon (*Oncorhynchus masou*), chum salmon (*O. keta*) and coho salmon (*O. kisutch*) fry infected with VOM by immersion method. *Bull. Jpn Soc. Scientif. Fisheries*, **50**, 431–437.
- YOSHIMIZU M. (2009). Control strategy for viral diseases of salmonid fish, flounders and shrimp at hatchery and seeds production facility in Japan. *Fish Pathol.*, **44**, 9–13.
- YOSHIMIZU M., FUKUDA H., SANO T. & KIMURA T. (1995). Salmonid herpesvirus 2. Epizootiology and serological relationship. *Vet. Res.*, **26**, 486–492.
- YOSHIMIZU M. & KASAI H. (2011). Chapter 7: Oncogenic viruses and *Oncorhynchus masou* virus. In: Fish Diseases and Disorders, Vol. 3, Second Edition: Viral, Bacterial and Fungal Infections, Woo P.T.K. & Bruno D.D., eds., CAB International, UK, 276–301.
- YOSHIMIZU M., KIMURA T. & WINTON J.R. (1985). An improved technique for collecting reproductive fluid samples from salmonid fishes. *Prog. Fish Culturist*, **47**, 199–200.
- YOSHIMIZU M. & NOMURA T. (2001). *Oncorhynchus masou* virus (VOM): Epidemiology and its control strategy. *Bull. Nat. Res. Inst. Aquaculture*, Suppl. **5**, 11–14.
- YOSHIMISU M., NOMURA T., EZURA Y. & KIMURA T. (1993). Surveillance and control of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and *Oncorhynchus masou* virus (VOM) of wild salmonid fish retraining to the northern part of Japan 1976 to 1991. *Fisheries Res.*, **17**, 163–173.
- YOSHIMIZU M., TAKIZAWA H. & KIMURA T. (1986). U.V. susceptibility of some fish pathogenic viruses. *Fish Pathol.*, **21**, 47–52.
- YOSHIMISU M., TANAKA M. & KIMURA T. (1987). *Oncorhynchus masou* virus (VOM): Incidence of tumor development among experimentally infected representative salmonid species. *Fish Pathol.*, **22**, 7–10.

YOSHIMIZU M., YOSHINAKA T., HATORI S. & KASAI H. (2005). Survivability of fish pathogenic viruses in environmental water, and inactivation of fish viruses. *Bull. Fish. Res. Agen.*, Suppl. 2, 47–54.

*
* *

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la herpesvirosis del salmón masou (puede consultarse en la Tabla del final de este *Manual Acuático* o en la página web de la OIE: www.oie.int).

CAPÍTULO 2.3.11.

ENCEFALOPATÍA Y RETINOPATÍA VIRALES

1. Ámbito de aplicación

A efectos de este capítulo, la enfermedad de la encefalopatía y retinopatía virales (ERV), también denominada necrosis nerviosa viral (NNV), se considera una enfermedad grave de varias especies de peces marinos, caracterizada por importantes pérdidas asociadas a lesiones de vacuolación del sistema nervioso central y de la retina.

2. Información sobre la enfermedad

2.1. Factores del agente

2.1.1. El agente patógeno, factores del agente

El agente causal de la ERV o NNV se identificó por primera vez como nuevo miembro de la familia Nodaviridae tras la purificación de tejidos encefálicos de larvas de jurel dentón (*Pseudocaranx dentex*) afectadas, y se adoptó la denominación de virus de la necrosis nerviosa del jurel dentón (VNNJD) (Mori *et al.*, 1992). Posteriormente, se han purificado otros agentes causales de la ERV/NNV de algunas especies de peces afectados (Chi *et al.*, 2001; Comps *et al.*, 1994). La taxonomía actual clasifica los virus en el género Betanodavirus, dentro de la familia Nodaviridae (Thiéry *et al.*, 2011). Los betanodavirus son virus sin envoltura y esféricos, y miden unos 25 nm de diámetro. El genoma está formado por dos moléculas de ARNs de sentido positivo: ARN1 (3,1 kb) codifica la replicasa (110 kDa) y ARN2 (1,4 kb) codifica la proteína de recubrimiento (42 kDa). Están documentadas las secuencias de nucleótidos completas tanto del ARN1 como del ARN2 del VNNJD y de otros virus (Iwamoto *et al.*, 2001; 2004; Sommerset & Nerland, 2004; Tan *et al.*, 2001). En base al análisis filogenético de la región variable T4 del ARN 2, los betanodavirus se han agrupado de forma preliminar en cuatro principales genotipos, que se denominan como sigue: virus de tipo VNNJD (virus de la necrosis nerviosa del jurel dentón), virus de tipo VNNTR (virus de la necrosis nerviosa de Takifugu rubripes [especie de pez globo]), virus de tipo VNNVM (virus de la necrosis nerviosa de Veasper moseri), y virus de tipo VNNEA (virus de la necrosis nerviosa de mero de pintas rojas [*Epinephelus akaara*]) (Nishizawa *et al.*, 1997). Los genotipos identificados se correlacionan en parte con tres serotipos distintos que se han identificado mediante neutralización del virus con anticuerpos policlonales, con distintas especies hospedadoras y con la temperatura óptima de crecimiento in vitro (Iwamoto *et al.* 2000; Mori *et al.* 2003). Además, se ha propuesto otro genotipo, que incluye una cepa de betanodavirus de rodaballo (VNR) (Johansen *et al.*, 2004). Para evitar confusión respecto a la taxonomía, Thiéry *et al.* (2004) han propuesto una nomenclatura numérica (agrupación I, II, III y IV), independiente del origen de la especie hospedadora. En la Tabla 2.1., se indican los genotipos oficiales, las especies hospedadoras diana y la temperatura óptima de crecimiento in vitro (Iwamoto *et al.*, 2000).

Tabla 2.1. Variantes genotípicas y fenotípicas de betanodavirus

Genotipo	Serotipo	Pez hospedador diana	Temperatura óptima de crecimiento
VNNJD	A	Jurel dentón	20–25°C
VNNTR	B	<i>Takifugu rubripes</i> (especie de pez globo)	20°C
VNNVM	C	Peces de aguas frías: halibut, bacalao del Atlántico, lenguados, etc.	15–20°C
VNNEA	C	Peces de aguas cálidas: perca gigante, lubina, meros, etc.	25–30°C

2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

Los betanodavirus son muy resistentes en el medio acuático y pueden sobrevivir durante mucho tiempo en aguas marinas a bajas temperaturas (Frerichs *et al.*, 2000), mientras que a 25°C o más, la supervivencia resulta considerablemente afectada. La contaminación del medio acuático tras la aparición de un brote puede persistir durante largos periodos y suponer una fuente de infección para especies salvajes susceptibles. En peces congelados, el virus puede persistir durante largos periodos y puede representar un posible riesgo si se utiliza este pescado crudo para alimentar a otros peces (Mori *et al.*, 2005). Fuera del ambiente acuático, los betanodavirus parecen perder su citopatogenicidad muy fácilmente. En condiciones de desecación, se ha observado >99% de inactivación tras un periodo de 7 días a 21°C (Maltese *et al.*, 2007).

2.1.3. Estabilidad del agente (métodos eficaces de inactivación)

Los desinfectantes de uso común, como el hipoclorito de sodio, el yodo, el peróxido de hidrógeno y el cloruro de benzalconio son muy útiles para inactivar betanodavirus, mientras que la formalina no es demasiado útil (Frerichs *et al.* 2000). Se ha utilizado ozono para evitar o reducir la contaminación vírica en la superficie de los huevos (Grotmol & Totland, 2000), y el agua contaminada por virus puede esterilizarse de forma eficaz mediante exposición a luz UV (Frerichs *et al.*, 2000).

2.1.4. Ciclo de vida

La presencia de reservorios en la naturaleza es muy probablemente la fuente original de infección de poblaciones de piscifactoría, mientras que el comercio de juveniles infectados supone la forma más frecuente de propagación de grandes cantidades de partículas víricas en el medio. Se sabe poco sobre el ciclo de vida de los betanodavirus. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en infecciones experimentales llevadas a cabo por distintos autores, lo más probable es que el virus invada el hospedador por el epitelio intestinal y el sistema nervioso periférico, y que alcance muy pronto los tejidos del sistema nervioso central, donde puede inducir la muerte del hospedador o permanecer durante varios años en los supervivientes (Johansen *et al.*, 2004). Los peces muertos descompuestos pueden diseminar el virus en el medio, que desde ahí llegará a distintos vectores biológicos. Además, los peces enfermos pueden resultar fácilmente ingeridos por depredadores que, además de poder resultar infectados, pueden diseminar el virus con las heces contaminadas. Se ha sospechado mucho de la transmisión vertical en algunas especies (Arimoto *et al.*, 1992; Comps *et al.*, 1994; Grotmol & Totland, 2000; Mushiake *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 2000); en este caso, el virus puede alcanzar las gónadas en desarrollo, donde se ha detectado con frecuencia (Dalla Valle *et al.*, 2000; Mushiake *et al.*, 1994; Nishizawa *et al.*, 1996) e infectar los huevos y el líquido seminal (Nishizawa *et al.*, 1994).

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Hasta la fecha, esta enfermedad se ha notificado en más de 50 especies de peces, principalmente marinas, y las más afectadas han sido el jurel dentón, la lubina (*Dicentrarchus labrax*), los meros y los peces planos (Munday *et al.* 2002; Sano *et al.* 2011). También se han documentado unos pocos brotes en piscifactorías de agua dulce (Bovo *et al.*, 2011; Chi *et al.*, 2003). Las especies de peces afectadas de forma natural por la VER se indican en la Tabla 2.2; otras especies de peces ornamentales de agua dulce han desarrollado signos clínicos tras una infección experimental (Furusawa *et al.*, 2007), lo cual sugiere la posibilidad de nuevos hospedadores, en concreto en el futuro cuando se escojan nuevas especies para acuicultura.

Tabla 2.2. Especies de peces afectadas por VER/NNV

Orden	Familia	Nombre común	Nombre científico
Acipenseriformes	Acipenseridae	Esturión del Danubio	<i>Acipenser gueldenstaedti</i>
Anguilliformes	Anguillidae	Anguila europea	<i>Anguilla anguilla</i>
Gonorynchiformes	Chanidae	Sabalote	<i>Chanos chanos</i>
Siluriformes	Siluridae	-	<i>Parasilurus asotus</i>
	Siluridae	-	<i>Tandanus tandanus</i>
Gadiformes	Gadidae	Bacalao del Atlántico	<i>Gadus morhua</i>
	Gadidae	Eglefino	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>

Orden	Familia	Nombre común	Nombre científico
Cyprinodontiformes	Poeciliidae	-	<i>Poecilia reticulata</i>
Perciformes	Acanthuridae	Navajón carcelario	<i>Acanthurus triostegus</i>
	Apogonidae	-	<i>Apogon exostigma</i>
	Anarhichadidae	Perro pintado	<i>Anarhichas minor</i>
	Carangidae	Jurel dentón	<i>Pseudocaranx dentex</i>
Perciformes		pez de limón	<i>Seriola dumerili</i>
		pámpano palometa	<i>Trachinotus falcatus</i>
		-	<i>Trachinotus blochii</i>
	Centropomatidae	Perca gigante	<i>Lates calcarifer</i>
		Serránido japonés	<i>Lateolabrax japonicus</i>
	Cichlidae	Tilapia	<i>Oreochromis niloticus</i>
	Eleotridae	-	<i>Oxyeleotris lineolata</i>
	Ephippidae	-	<i>Platax orbicularis</i>
	Latridae	-	<i>Latris Lineata</i>
	Lutjanidae	Pargo carmesí	<i>Lutjanus erythropterus</i>
		Pargo de manglar	<i>Lutjanus argentimaculatus</i>
	Malacanthidae	-	<i>Branchiostegus japonicus</i>
	Mugilidae	Mugil	<i>Mugil cephalus</i>
		Galupe	<i>Liza aurata</i>
		Salmonete de roca	<i>Mullus barbatus</i>
	Oplegnathidae	Sama de roca	<i>Oplegnathus fasciatus</i>
		-	<i>Oplegnathus punctatus</i>
	Percichthyidae	Lubina	<i>Dicentrarchus labrax</i>
	Rachicentridae	Cobia	<i>Rachycentron canadum</i>
	Sciaenidae	Corvinón ocelado	<i>Sciaenops ocellatus</i>
	Sciaenidae	Verrugato fusco	<i>Umbrina cirrosa</i>
	Sciaenidae	Corvinata blanca	<i>Atractoscion nobilis</i>
	Scombridae	Atún de aleta azul del Pacífico	<i>Thunnus orientalis</i>
	Serranidae	Mero de pintas rojas	<i>Epinephelus akaara</i>
		-	<i>E. awoara</i>
		-	<i>E. septemfasciatus</i>
		-	<i>E. fuscoguttatus</i>
		Mero malabárico	<i>E. malabaricus</i>
		-	<i>E. marginatus</i>
		-	<i>E. moara</i>
		Mero lutria	<i>E. tauvina</i>
		Obispo coronado	<i>E. lanceolatus</i>
		-	<i>Chromileptes altivelis</i>
		Cherna de ley	<i>Epinephelus aeneus</i>

Orden	Familia	Nombre común	Nombre científico
		-	<i>E. coioides</i>
	Sparidae	Dorada	<i>Sparus aurata</i>
	Cichlidae	Tilapia del Nilo	<i>Oreochromis niloticus niloticus</i>
Tetraodontiformes	Monacantidae	-	<i>Stephanolepis cirrifer</i>
Tetraodontiformes	Tetraodontidae	Pez globo (especie de)	<i>Takifugu rubripes</i>
Pleuronectiformes	Pleuronectidae	-	<i>Verasper moseri</i>
	Soleidae	Lenguado común	<i>Solea solea</i>
	Scophthalmidae	Rodaballo	<i>Psetta maxima</i>
	Scophthalmidae	Falso halibut del Japón	<i>Paralichthys olivaceus</i>
	Scophthalmidae	Halibut	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>
Scorpaeniformes	Sebastidae	Corvinata blanca	<i>Sebastes oblongus</i>

Para conocer las fuentes, por favor contáctese con el Laboratorio de Referencia de la OIE.

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

Aunque esta enfermedad afecta principalmente a larvas y juveniles, también se han observado importantes mortalidades en peces de tamaño comercial y adultos, como en el caso de *Hippoglossus hippoglossus*, *Epinephelus septemfasciatus* y *Dicentrarchus labrax*.

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

En piscifactorías infectadas, la probabilidad de detectar el agente causal normalmente es más alta en juveniles que en peces de más edad, mientras que durante la época del desove, el virus puede hallarse en las gónadas de los reproductores (Dalla Valle *et al.*, 2000; Mushiake *et al.*, 1994). Por ello, los programas de vigilancia deben incluir peces jóvenes, tejidos gonadales, líquido ovárico y líquido espermático.

2.2.4. Órganos diana y tejidos afectados

El encéfalo, la médula espinal y la retina se consideran los órganos diana en los que el virus se replica activamente, causando una gran vacuolación tisular. Se han descrito inclusiones intracitoplasmáticas en las células encefálicas de lubina (*Dicentrarchus labrax*), perca gigante (*Lates calcarifer*), *Oplegnathus fasciatus* y mero malabárico (*Epinephelus malabaricus*) (Munday *et al.*, 2002). El virus también se ha detectado en gónadas de reproductores (Dalla Valle *et al.*, 2000; Mushiake *et al.*, 1994; Nishizawa *et al.*, 1996). En algunas especies, como el jurel dentón, la lubina, *Verasper moseri*, *E. septemfasciatus* y halibut, es probable que los reproductores sean el reservorio de virus más constante y la fuente más importante de infección para larvas y juveniles de peces (Mushiake *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 2000). Es posible que el virus no se replique ni resida en los órganos reproductores en todo momento, sino que se halle ahí tras la aparición de condiciones estresantes (Mushiake *et al.*, 1994).

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

En el perro pintado (*Anarhichas minor*) infectado experimentalmente por inmersión, el virus se ha detectado en el encéfalo al menos hasta las 16 semanas post-exposición (Johansen *et al.*, 2003). Tras un brote natural en halibut, se ha estudiado el avance de la infección en supervivientes a lo largo de un periodo de observación de 1 año (Johansen *et al.*, 2002). El porcentaje de peces que han dado positivo en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y en el ensayo inmunoenzimático (ELISA) ha permanecido alto a lo largo de todo el periodo, y el virus se ha vuelto a aislar de un pez infectado subclínicamente al final del año, lo cual sugiere que los peces que sobreviven a la infección pueden portar el virus durante un largo periodo de tiempo y podrían llegar a transmitir la infección a otros peces. Recientemente se ha establecido una línea celular (BB) derivada de tejido encefálico de perca gigante y ofrecerá un modelo válido para estudiar la infección vírica y los mecanismos de replicación tanto in vivo como in vitro (Chi *et al.*, 2005).

2.2.6. Vectores

Teniendo en cuenta que el agua es el principal vector abiótico, los betanodavirus se pueden propagar fácilmente, durante un brote clínico, de una parte de la piscifactoría a otra directamente por el agua y contaminando personal, redes, botas y demás equipo. Deben establecerse medidas de bioseguridad suficientes, en concreto dentro de los viveros (Mori *et al.*, 1998). En mar abierto, la transmisión de la infección de un lugar a otro deriva de la marea, de las corrientes dominantes, de los barcos que visitan distintas piscifactorías y de los peces salvajes migratorios. Debido a la alta resistencia del virus a las condiciones ácidas y a temperaturas de 37°C (Frerichs *et al.*, 2000), las aves ictiófagas deben considerarse posibles vectores. Además, dado el gran volumen de comercio, debe prestarse especial atención a los moluscos procedentes de zonas contaminadas. Este virus también se ha detectado en gusanos de arena pertenecientes a la familia Nereidae, género *Nereis*, recogidos cerca de una piscifactoría infectada (Bovo *et al.*, observaciones no publicadas). El gran mercado internacional de este tipo de gusanos como cebo también debe considerarse un riesgo añadido de propagación de betanodavirus de una zona a otra.

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

Aunque el papel de los portadores salvajes todavía no se comprende del todo, se han publicado datos sobre la detección de betanodavirus en especies salvajes de distintas regiones (Barker *et al.*, 2002; Ciulli *et al.*, 2006; Gometz *et al.*, 2004). Todavía no está claro si los ejemplares infectados deben considerarse simplemente un reservorio del virus en el que el agente patógeno se puede replicar sin causar mortalidad alguna, o bien considerarse animales susceptibles. Por ello, se precisa llevar a cabo pruebas de infección experimental, con el fin de comprender mejor el significado de la infección por Betanodavirus en los peces salvajes.

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mecanismos de transmisión

Esta enfermedad se puede reproducir en peces sanos por co-habitación, inmersión o inyección (Munday *et al.*, 2002). La transmisión horizontal, a menudo observada en estado salvaje, debe considerarse la forma más frecuente de transmisión de la enfermedad por agua contaminada. Además, existen ciertos indicios de transmisión vertical de reproductores a su descendencia en el jurel dentón, la lubina, la perca gigante, *Verasper moseri*, halibut y *E. septemfasciatus*, como se ha mencionado anteriormente (Comps *et al.* 1994; Mori *et al.*, 1998; Mushiake *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 2000). Este hecho se refleja principalmente en la temprana aparición de la enfermedad clínica y en la detección de material genético vírico en gónadas de animales adultos (Dalla Valle *et al.*, 2000; Mushiake *et al.*, 1994; Nishizawa *et al.*, 1996); todavía no se ha demostrado definitivamente si el virus se encuentra dentro, o bien fuera de los huevos en forma de contaminante superficial. Otra posibilidad en cuanto a la transmisión de la enfermedad es la de la alimentación de reproductores con pescado crudo (Mori *et al.*, 2005). También hay muchos indicios de que la ozonación de huevos fecundados de reproductores infectados elimina o reduce la tasa de infección en la descendencia (Mori *et al.* 1998), lo cual indica que podría producirse transmisión vertical en forma de contaminación de la superficie de los huevos, al menos en algunas especies.

2.3.2. Prevalencia

Se dispone de muy pocos datos sobre la prevalencia de la enfermedad. En Canadá, ciertas poblaciones de peces salvajes son sospechosas de actuar como auténticos reservorios naturales; de hecho, el virus ya se ha detectado por PCR en un 0,23% de la población salvaje de *Pleuronectes americanus* (Barker *et al.*, 2002). En Japón, una muestra representativa de 30 especies recogida en dos bahías distintas confirmó que la mayoría de peces de piscifactoría y salvajes daban positivo (Gómez *et al.*, 2004).

2.3.3. Distribución geográfica

La enfermedad se ha notificado oficialmente en muchas regiones, como países del sur y el este asiático (China [Rep. Pop. de], Taipei chino, India, Indonesia, Irán, Japón, Corea, Malasia, Filipinas, Tailandia, Vietnam), de Oceanía (Australia, Tahití), del Mediterráneo (Francia, Grecia, Israel, Italia, Malta, Portugal, España, Túnez), el Reino Unido, Noruega, el Caribe y Norteamérica (Canadá, EE.UU.) (Munday *et al.*, 2002). Además, se ha documentado la sospecha de mortalidades causadas por betanodavirus en meros salvajes que viven a lo largo de las costas senegalesa y libia.

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

Existen considerables variaciones en la edad a la cual la enfermedad se observa por primera vez y en el periodo a lo largo del cual se produce mortalidad (Munday *et al.*, 2002). En general, cuanto antes aparecen los signos clínicos, mayor es la mortalidad. En el jurel dentón (*Pseudocaranx dentex*), se

observan mortalidades con más frecuencia en los primeros 10 días tras el desove, mientras que la aparición más temprana de la enfermedad tiene lugar 2 días post-desove, lo cual da lugar a una pérdida de casi todas las larvas. En la lubina (*Dicentrarchus labrax*) no suele observarse mortalidad hasta unos 30 días post-desove, pero pueden aparecer brotes incluso en peces de tamaño comercial. La mortalidad depende de la edad. Cuando resultan afectados los estadios larvarios, se observa la mayor mortalidad, a menudo del 100%, mientras que en los juveniles y en peces de más edad en general se han comunicado menores pérdidas.

2.3.5. Factores ambientales

La temperatura del agua es un factor importante, que puede afectar de forma significativa a la aparición de los signos clínicos. El efecto de la temperatura está especialmente bien estudiado en el cultivo de la lubina, y anteriormente la enfermedad se denominaba Enfermedad de Verano. La correlación entre la aparición de signos clínicos y la temperatura del agua está parcialmente respaldada por estudios in vitro (Iwamoto *et al.*, 2000). En el genotipo VNNEA parece existir especificidad de hospedador por peces de aguas cálidas, y en el genotipo VNNVM, por peces de aguas frías. En larvas de jurel dentón afectadas por el VNNJD (temperatura óptima de crecimiento in vitro: 20-25°C) no se ha observado diferencia de mortalidad entre distintos grupos criados a distintas temperaturas del agua, de entre 20°C y 26°C (Arimoto *et al.* 1994), mientras que en *Epinephelus akaara* infectado por el VNNEA (temperatura óptima de crecimiento in vitro: 25–30°C) la temperatura del agua en la que se crían los peces (16-28°C) puede influir en el desarrollo de la enfermedad. En mero jorobado (*Chromileptes altivelis*), se ha observado una mayor mortalidad y una aparición más temprana de la enfermedad a mayores temperaturas (Tanaka *et al.*, 1998), mientras que a temperaturas del agua superiores a los 31°C, se ha inhibido la proliferación del VNNEA en (Yuasa *et al.*, 2007). Por otra parte, la infección por NVHA (Nodavirus del halibut) (genotipo VNNVM, temperatura óptima: 15-20°C) en el halibut tiene lugar a 6°C (Grotmol *et al.*, 1999). La salinidad no parece influir en absoluto en la aparición de la enfermedad, puesto que se han observado brotes en especies de agua dulce.

2.4. Control y prevención

Es posible que solo se consiga prevenir la enfermedad evitando la exposición de poblaciones de piscifactoría a los agentes causales. Desafortunadamente, este método es muy difícil de aplicar en instalaciones de engorde, pero puede ser muy útil en viveros siempre que utilicen agua libre del virus e introduzcan larvas procedentes de reproductores libres del virus.

2.4.1. Vacunación

En distintos estudios se ha observado que la inmunización con proteína vírica recombinante de recubrimiento expresada por *Escherichia coli* o con partículas de tipo vírico en un sistema de expresión de baculovirus o con virus inactivado químicamente puede ser eficaz para controlar la enfermedad (Kai & Chi, 2008; Tanaka *et al.*, 2001; Thiéry *et al.*, 2006; Yamashita *et al.*, 2009a). No obstante, actualmente no se dispone de ninguna vacuna comercial. En un estudio se observó que la infección primaria con un aquabirnavirus avirulento suprimió de forma eficaz la infección secundaria por betanodavirus, lo cual sugiere el uso del aquabirnavirus como posible inmunomodulador (Yamashita *et al.*, 2009b).

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

No se dispone de ninguno.

2.4.3. Inmunoestimulación

No se dispone de datos.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

No se dispone de datos.

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

No se dispone de datos relativos a la selección de linajes resistentes entre las especies susceptibles.

2.4.6. Agentes bloqueantes

No se dispone de datos.

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

El lavado de huevos fecundados en agua de mar tratada con ozono o el tratamiento con ozono o cloración del agua utilizada para el cultivo parecen ser eficaces para el control de la enfermedad en la producción de larvas de jurel dentón, *Verasper moseri* y halibut (Arimoto *et al.*, 1996; Grotmol & Totland, 2000; Mori *et al.*, 1998; Watanabe *et al.*, 2000).

2.4.8. Prácticas generales de manejo

Además de las prácticas generales de higiene, como el tratamiento con luz UV del agua que entra en los viveros, la adopción de barreras sanitarias, el descanso periódico y la desinfección de los tanques y los filtros biológicos, la desinfección de las instalaciones y los utensilios y el evitar alimentar a los peces con pescado crudo, es importante reducir los factores estresantes mejorando el método de inducción del desove, lo cual incluye aportar suficiente alimento a los reproductores y disminuir la densidad de población de larvas y juveniles (Mushiake *et al.*, 1994). Para evitar la transmisión vertical en los viveros, se ha propuesto analizar a todos los reproductores mediante PCR extrayendo biopsias de gónada y desechando los ejemplares que den resultados positivos (Mori *et al.*, 1998; Mushiake *et al.*, 1994; Nishizawa *et al.*, 1994); no obstante, en algunas ocasiones se ha observado que la PCR no ha detectado la infección vírica en determinados desovadores (Nishizawa *et al.*, 1996).

Para controlar la ERV en *Verasper moseri* también se ha propuesto una estrategia de control integrado, que incluya el uso de ELISA para analizar el nivel de anticuerpos específicos en cada reproductor, la PCR en productos sexuales y la desinfección de huevos embrionados con agua ozonada (Watanabe *et al.*, 2000).

Desafortunadamente, la detección de anticuerpos específicos mediante ELISA o pruebas de neutralización no se ha investigado lo suficiente, y se sabe muy poco sobre la interpretación de los resultados de la serología.

En la industria de la producción de lubina, se ha sugerido que la repoblación de instalaciones de engorde situadas en zonas infectadas debe llevarse a cabo durante el otoño, cuando el número de brotes clínicos está disminuyendo.

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

Los peces que presentan una natación anómala, junto con una pérdida del apetito y una alteración progresiva de la pigmentación, deben considerarse potencialmente infectados, y a efectos del diagnóstico para confirmar la sospecha solo deben escogerse estos ejemplares, además de peces moribundos y que acaben de morir. Se suelen enviar al laboratorio peces enteros, excepto si los ejemplares son muy grandes, en cuyo caso puede enviarse solo la cabeza. En los programas de vigilancia, debe adoptarse un muestreo de peces aparentemente sanos ceñido a una pauta que permita significación estadística.

3.2. Conservación de las muestras para su envío

A la espera del envío al laboratorio, las muestras deben guardarse a 4°C (2–3 días) o congeladas a –20°C o –80°C (2–3 semanas).

3.3. Combinación de varias muestras

A efectos del diagnóstico, son aceptables las muestras combinadas formadas por 5–10 peces con signos clínicos cada una. Cuando se busquen posibles portadores, deben analizarse peces individualmente.

3.4. Órganos o tejidos de elección

El encéfalo y los ojos son los tejidos diana a efectos del diagnóstico. Cuando se sospecha de estadios larvarios o de muy corta edad (<1 cm), puede procesarse el cuerpo entero. Cuando la longitud del pez se sitúe entre 1 y 6 cm, debe separarse la cabeza entera, incluidos encéfalo y ojos, del resto del cuerpo y utilizarse como muestra. En el caso de peces más grandes, la muestra solo debe consistir en el encéfalo y los ojos.

Los órganos distintos del encéfalo y los ojos deben considerarse no adecuados para el diagnóstico. No obstante, cuando deben analizarse reproductores mediante métodos no invasivos, los huevos, los líquidos ovárico y seminal y las biopsias de gónada deben considerarse muestras adecuadas.

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

El riñón, el bazo y el corazón, que normalmente se recomiendan para la detección de varios agentes víricos de los peces, no son adecuados para el diagnóstico de la ERV o NNV.

4. Métodos de diagnóstico

Durante varios años, el método de referencia para detectar la ERV o NNV ha sido el aislamiento de agentes víricos en cultivos celulares seguido de una identificación inmunológica o molecular. Hoy en día existen varias herramientas moleculares descritas que se caracterizan por una alta sensibilidad, pero su uso definitivo precisa una mayor validación mediante pruebas de eficiencia interlaboratoriales, o mediante pruebas de equivalencia respecto al método de referencia.

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

En los peces infectados no se observan signos externos en la superficie corporal ni las branquias, excepto una progresiva alteración de la pigmentación descrita en unas pocas especies por varios autores. En la lubina (*Dicentrarchus labrax*), en ocasiones se han observado erosiones cutáneas en las zonas mandibular y craneal, posiblemente debidas a un traumatismo causado por una perturbación visual.

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Los peces infectados presentan gran variedad de patrones de conducta natatoria errática, ya que se desplazan en espiral, se arremolinan o quedan panza arriba cuando están en reposo (a veces con la vejiga natatoria inflada), o bien yacen en el fondo del tanque o nadan rápidamente en círculos o en línea recta hacia adelante. Los peces planos suelen mostrar menos signos evidentes. Los peces pueden permanecer durante largos periodos en el fondo doblando el cuerpo con la cabeza y la cola levantadas. A menudo se ha observado pérdida del apetito.

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

No se han asociado lesiones macroscópicas a la infección, excepto un hiperinflado de la vejiga natatoria, que se ha observado con frecuencia en distintas especies.

4.2.2. Bioquímica clínica

No se dispone de datos.

4.2.3. Anatomopatología microscópica

Los hallazgos microscópicos más frecuentes detectados en distintas especies consisten en vacuolación y necrosis de células nerviosas de la médula espinal, el encéfalo y/o la retina. Estas lesiones son de lejos más llamativas en las larvas y los juveniles, mientras que en peces sintomáticos de mayor edad a veces son muy infrecuentes o difíciles de detectar. El proceso inflamatorio suele ser muy discreto y la presencia de macrófagos posiblemente se debe a una infección secundaria.

4.2.4. Preparaciones húmedas

No aplicable.

4.2.5. Frotis

No aplicable.

4.2.6. Cortes fijados

No aplicable.

4.2.6. Microscopía electrónica/citopatología

En el encéfalo, la médula espinal y la retina de los animales intensamente infectados pueden observarse partículas víricas subesféricas de unos 25 nm de diámetro. Los viriones pueden observarse libres en el citoplasma o asociados a membranas reticuloendoplásmicas, principalmente en los astrocitos del tejido

nervioso, oligodendrocitos y microglíocitos. No obstante, dada la escasa sensibilidad analítica, este método no es una herramienta diagnóstica fiable.

4.3. Métodos de detección e identificación del agente

4.3.1. Métodos directos de detección

En general, los protocolos basados en la PCR aplicados al diagnóstico de enfermedades víricas tienen como ventaja un procesamiento rápido, rapidez de comunicación de resultados y una alta sensibilidad y especificidad, y por tanto son herramientas adecuadas para la detección rápida de betanodavirus en peces infectados tanto clínicamente como subclínicamente. No obstante, estos métodos precisan una mayor validación mediante pruebas de eficiencia interlaboratoriales. Por ello, el aislamiento en cultivo celular seguido de identificación por inmunotinción o molecular sigue constituyendo el método de referencia a efectos del diagnóstico.

Además, el virus se ha identificado mediante inmunofluorescencia (IF) aplicada a improntas de encéfalo o cortes congelados y mediante inmunohistoquímica (IHC) en encéfalo o retina. La IHC es la prueba más adecuada para la detección del virus en material fijado para análisis histológico.

Se han publicado métodos basados en ELISA de detección de antígenos de betanodavirus en tejidos diana (Arimoto *et al.*, 1992).

4.3.1.1. Métodos microscópicos

4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

No se dispone de datos.

4.3.1.1.2. Frotis

Se ha observado que las improntas de encéfalo teñidas según la prueba de la IF clásica sean un método adecuado para la detección de la infección por betanodavirus. Dado que no se conoce su sensibilidad, este método se recomienda solo para peces afectados clínicamente.

4.3.1.1.2.1. Prueba de la inmunofluorescencia indirecta en improntas de encéfalo

Este protocolo se ha aplicado con ventajas durante mucho tiempo en el Laboratorio de Referencia de la OIE, pero el procedimiento no se ha validado adecuadamente en cuanto a sensibilidad y reproducibilidad. Este método se recomienda solo en peces afectados clínicamente:

- i) Se obtiene encéfalo de peces afectados clínicamente (al menos tres ejemplares).
- ii) Se utiliza papel absorbente para eliminar el posible exceso de líquido.
- iii) Se llevan a cabo improntas suaves sobre la superficie del porta (cinco de cada uno de los tres ejemplares).
- iv) Se dejan secar las improntas al aire.
- v) Se fijan las improntas en etanol absoluto o acetona fría (-20°C) durante 10 minutos.
- vi) Se enjuagan tres veces con PBS-Tween 80 (PBST) al 0,05%.
- vii) Se cubren las improntas con el anticuerpo primario (es decir, suero inmune de conejo anti-betanodavirus) y se incuban durante 30 minutos a 37°C en una cámara húmeda.
- viii) Se enjuagan tres veces con PBST al 0,05%.
- ix) Se cubren las improntas con un anticuerpo comercial secundario conjugado a isotiocianato de fluoresceína (es decir, anticuerpo anti-Ig de ratón) y se incuban a 37°C durante 30 minutos.
- x) Se enjuagan tres veces con PBST.
- xi) Se montan con un cubreobjetos utilizando solución salina de glicerol, pH 8,5.
- xii) Se observan en un microscopio de IF a 100–250×.

Interpretación de los resultados:

Muestras positivas: son fáciles de detectar células fluorescentes que contienen gránulos de color verde brillante con aspecto de polvo estelar.

Muestras negativas: no debe haber señal fluorescente.

4.3.1.1.3. Cortes fijados

Puede lograrse una detección específica del agente causal mediante la prueba de la inmunofluorescencia indirecta (IFAT) aplicada a tejidos incluidos en parafina o criostáticos, o bien mediante IHC aplicada a tejidos incluidos en parafina, como han observado varios autores (Johansen *et al.*, 2003; Nguyen *et al.*, 1997), utilizando anticuerpos policlonales o monoclonales.

4.3.1.1.3.1. Prueba de la inmunofluorescencia indirecta en cortes de fijados en parafina

El siguiente protocolo se indica como ejemplo, pero pueden utilizarse otros protocolos de IFA validados.

- i) Se realizan cortes de 5 µm de espesor y se transfieren a portas recubiertos de polilisina.
- ii) Se secan los portas durante toda la noche a 37°C.
- iii) Se desparafinan con xileno 2 × 10 minutos y con etanol absoluto 2 × 5 minutos.
- iv) Se rehidratan los cortes: 95°, 70°, 50° y agua destilada.
- v) Se enjuagan con PBST.
- vi) Se cubren los cortes con tripsina al 0,1% en PBS y se incuban a 37°C durante 30 minutos.
- vii) Se enjuagan tres veces con PBST.
- viii) Se cubren los cortes con el anticuerpo primario (es decir, suero inmune de conejo anti-betanodavirus) durante 30 minutos a 37°C en una cámara húmeda.
- ix) Se enjuagan tres veces con PBST.
- x) Se cubren los cortes durante 30 minutos a 37°C con un anticuerpo comercial conjugado a isotiocianato de fluoresceína (es decir, anticuerpo anti-Ig de conejo).
- xi) Se enjuagan tres veces con PBST.
- xii) Se montan con cubreobjetos utilizando solución salina de glicerol, pH 8,5.
- xiii) Se observan al microscopio de IF y se comparan con un control positivo y uno negativo.

Interpretación de los resultados:

Muestras positivas: se observa fluorescencia brillante específica en el citoplasma de las células afectadas de encéfalo y retina.

Muestras negativas: en el control negativo no debe haber señal fluorescente.

4.3.1.1.3.1. Prueba de la inmunofluorescencia indirecta en cortes criostáticos

El siguiente protocolo se indica como ejemplo, pero pueden utilizarse otros protocolos de IFA validados. Dada la escasa sensibilidad del método, solo es aplicable a peces afectados clínicamente.

- i) Se obtienen encéfalos de 2-3 peces afectados clínicamente.
- ii) Se introducen todos los encéfalos en el mismo criostato.
- iii) Se lleva el criostato a la cámara criostática, que estará a -20°C.
- iv) Cuando estén completamente congelados, se realizan cortes de 5 µm de espesor y se transfieren a portas recubiertos de polilisina.
- v) Se dejan secar los cortes al aire.
- vi) Se fijan los cortes con etanol absoluto o acetona fría (-20°C).
- vii) Se cubren los cortes con el anticuerpo primario (es decir, suero de conejo anti-betanodavirus) durante 30 minutos a 37°C en una cámara húmeda.
- viii) Se enjuagan tres veces con PBST.

- ix) Se cubren los cortes durante 30 minutos a 37°C con un anticuerpo comercial (es decir, anticuerpo conjugado anti-Ig de conejo) conjugado a isotiocianato de fluoresceína.
- x) Se enjuagan como antes con PBST.
- xi) Se montan con un cubreobjetos utilizando solución salina de glicerol, pH 8,5.
- xii) Se observan en un microscopio de IF y se comparan con un control positivo y uno negativo.

Interpretación de los resultados:

Muestras positivas: se observa fluorescencia específica en el citoplasma de las células afectadas del encéfalo o la retina.

Muestras negativas: en el control negativo no debe haber señal fluorescente.

4.3.1.1.3.3. Inmunohistoquímica (técnica de la avidina-biotina-peroxidasa)

Este protocolo se ha utilizado con ventajas durante mucho tiempo en el Laboratorio de Referencia de la OIE y se da como ejemplo; pueden adoptarse otros protocolos validados de IHC.

- i) Se desparafinan los cortes con xileno (2 × 10 minutos) y se rehidratan con etanol (2 × 5 minutos).
- ii) Se incuban en H₂O₂ al 3% durante 20 minutos a temperatura ambiente (RT), para bloquear la peroxidasa endógena.
- iii) Se rehidratan los cortes de tejido en una serie de alcoholes de graduación decreciente (95°, 70°, 50°) y en agua destilada (1 minuto).
- iv) Se enjuagan en PBS (pH 7,3) a 37°C.
- v) Se incuban los cortes con tripsina al 0,1% y CaCl₂ al 0,1% + tampón Tris, durante 30 minutos a 37°C.
- vi) Se enjuagan tres veces con PBS.
- vii) Se incuban los cortes con BSA al 5% en PBS durante 20 minutos a RT.
- viii) Se elimina el BSA y se limpia el exceso.
- ix) Se incuban los cortes con el anticuerpo primario (es decir, anticuerpo de conejo anti-betánodavirus) diluido en BSA al 2,5% durante 60 minutos.
- x) Se enjuagan tres veces con Tampón Tris.
- xi) Se incuban con el suero secundario biotinilado (es decir, anticuerpos de cabra anti-Ig de conejo en BSA al 2,5%) durante 20 minutos.
- xii) Se enjuagan tres veces con tampón Tris.
- xiii) Se incuban con complejo AB/HRP (preparado justo antes de su uso) durante 20 minutos a RT.
- xiv) Se elimina el complejo AB/HRP.
- xv) Se enjuagan tres veces con tampón Tris.
- xvi) Se incuban con sustrato cromógeno AEC (3-amino-9-etilcarbazol; preparado justo antes de su uso) durante 20 minutos a RT.
- xvii) Se enjuagan con agua destilada durante 5 minutos.
- xviii) Se aplica tinción de contraste con hematoxilina de Harris durante 30 segundos.
- xix) Se montan cortes en gelatina de glicerol.
- xx) Cada vez que se ejecute la inmunohistoquímica se debe incluir un corte control positivo y uno negativo

Interpretación de los resultados:

Muestras positivas: en los tejidos se pueden detectar depósitos granulares rojos. Una tinción difusa de color rojo claro de los tejidos no se considera un inmunomarcaje específico (fondo).

Muestras negativas: no se detecta inmunomarcaje

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

4.3.1.2.1. Cultivo celular

Está bien documentado el aislamiento de betanodavirus en un pequeño número de líneas celulares de peces establecidas. En la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) se dispone de dos líneas celulares de peces en las que se pueden aislar y propagar betanodavirus, para fines de diagnóstico e investigación: la línea celular SSN-1, derivada de *Channa striata* (Frerichs *et al.*, 1996) y una línea celular clonada (E-11) derivada de la propia SSN-1 (Iwamoto *et al.*, 2000). Ambas son útiles para análisis cualitativos y cuantitativos de todos los betanodavirus. Se han desarrollado y descrito otros cultivos celulares susceptibles (GF-1) (Chi *et al.*, 1999) que pueden ser utilizados para fines de investigación y diagnóstico siempre que se lleve a cabo un seguimiento periódico de la sensibilidad. Para verificar la sensibilidad de los cultivos celulares que se utilizan, debe realizarse una titulación del virus de referencia congelado al menos cada 6 meses o siempre que se sospeche que ha disminuido la sensibilidad de las células.

Inoculación de monocapas celulares

Para conocer los detalles sobre el transporte, el tratamiento con antibióticos y la extracción del virus, consúltese el capítulo Información General.

- i) Se homogeneizan muestras con volúmenes de 1:5-1:10 de solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) u otro medio equivalente que contenga antibióticos, para evitar contaminaciones bacterianas.

Nota: Se sugiere utilizar gentamicina (1000 µg/ml) o penicilina (800 Unidades Internacionales [IU]/ml) y estreptomina (800 µg/ml), pero pueden utilizarse otros antibióticos eficaces. Los compuestos antifúngicos micostatina o fungizona también pueden añadirse al medio a una concentración final de 400 UI/ml. Además, puede añadirse suero o albúmina al 5%.

El tratamiento antibiótico puede llevarse a cabo durante 4 horas a 15°C o durante toda la noche a 4°C. Como alternativa, puede utilizarse una filtración por un filtro de membrana de 0,22 µm.

- ii) Se inocula la suspensión de tejido tratada con antibiótico a dos diluciones distintas, es decir, la solución primaria y, además, una dilución de la misma a 1:10, obteniendo así unas diluciones finales de material tisular en medio de cultivo celular de 1:50–100 y 1:500–1000, respectivamente.

Nota: cada una de las diluciones de 100 µl debe inocularse en al menos 2 cm² de monocapa de cultivo celular en replicación activa.

- iii) En el caso de aplicar el método de la adsorción, se deja adsorber el inóculo sobre las monocapas drenadas, durante 1 hora a 20-25°C. Una vez transcurrido el periodo de adsorción, se añade el nuevo medio suplementado con FBS al 5%.
- iv) Si se adopta el método normal, se puede cambiar el medio de cultivo por uno nuevo suplementado con FBS al 5%, antes de añadir la suspensión tratada con antibiótico.
- v) Se incuba a 20–25°C según el genotipo esperado.

Nota: Las temperaturas óptimas de crecimiento vírico son distintas en cada una de las cuatro variantes genotípicas: 25–30°C en el caso del genotipo VNNEA, 20–25°C en el caso del genotipo VNNJD, 20°C en el caso del genotipo VNNTR, y 15–20°C en el caso del genotipo VNNVM (Tabla 2.1). Por ello, debe escogerse la temperatura de incubación según los genotipos presentes en la zona muestreada.

Seguimiento de la incubación

- i) Se sigue el curso de la infección en controles positivos y otros cultivos celulares inoculados mediante el examen microscópico a 40-100 aumentos durante 10 días.
- ii) Si aparece efecto citopático (ECP), deben llevarse a cabo los procedimientos de identificación (véase abajo).

Nota: El ECP de las células SSN-1 o E-11 se caracteriza por células delgadas o redondeadas, refringentes, granulares y vacuoladas, y una desintegración parcial o completa de la monocapa.

- iii) Si no aparece ECP tras el periodo de incubación primaria (10 días), debe realizarse un subcultivo en cultivos nuevos, utilizando una zona de crecimiento celular similar a la del cultivo primario.

Procedimientos para el subcultivo

- i) Se recogen alícuotas (10%) de medio de cultivo celular de todas las monocapas inoculadas.
- ii) Se inoculan alícuotas que constituyan el cultivo primario en pocillos con las nuevas monocapas celulares, como se ha descrito arriba (subcultivo pocillo a pocillo).
- iii) Se incuban y controlan como se ha descrito arriba, durante 10 días más
- iv) Si no aparece ECP durante este periodo, la prueba puede considerarse negativa.
- v) Si aparece ECP, deben llevarse a cabo los procedimientos de identificación (véase abajo).

4.3.1.2.2. Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos

4.3.1.2.2.1. Prueba de la inmunofluorescencia indirecta

- i) Se preparan monocapas de células susceptibles directamente en pocillos de 2 cm² de placas de plástico de cultivo celular o en cubreobjetos o portas de cámaras con el fin de lograr alrededor de un 70-80% de confluencia, que suele alcanzarse en 24 horas de incubación a 25°C.
- ii) Se inoculan las suspensiones del virus a identificar utilizando al menos dos diluciones decimales.
- iii) Se incuban a 20°C o 25°C durante 48–72 horas (Véase el apartado 4.3.1.2.1 Cultivo celular).
- iv) Se retira el medio de cultivo y se fija con etanol absoluto o acetona fría al 80% (-20°C) durante 10-30 minutos.
- v) Se enjuagan tres veces con PBST.
- vi) Se dejan secar las monocapas celulares al aire.
- vii) Se tratan las monocapas celulares con el anticuerpo primario (es decir, suero inmune de conejo anti-betánodavirus) durante 30 minutos a 37°C en una cámara húmeda.
- viii) Se enjuagan tres veces con PBST.
- ix) Se cubren las monocapas celulares durante 30 minutos a 37°C con anticuerpo comercial conjugado a isotiocianato de fluoresceína (es decir, anticuerpo anti-Ig de conejo).
- x) Se enjuagan con PBST.

Se examinan las monocapas celulares tratadas directamente en placas, o se montan los cubreobjetos utilizando solución salina de glicerol, pH 8,5, antes de la observación al microscopio.

Interpretación de los resultados:

Muestras positivas: Se observan células fluorescentes brillantes repartidas por la monocapa.

Muestras negativas: No debe detectarse señal fluorescente.

4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

4.3.1.2.3.1. PCR convencional

La creciente disponibilidad de secuencias ha permitido el desarrollo de métodos de diagnóstico basados en la PCR para la detección de betánodavirus, que pueden optimizarse según las necesidades concretas de cada caso. El conjunto de cebadores F2-R3, que tiene por diana la región variable T4 del segmento RNA2 (Nishizawa *et al.*, 1994), se ha utilizado mucho en varios estudios tanto de diagnóstico como de investigación. No obstante, estos cebadores en ocasiones no sirvieron debido a los límites de sensibilidad y especificidad. Nishizawa *et al.* (1996) observaron que cuando hay una cantidad muy pequeña del virus en desovadores, esta puede escapar a la detección mediante PCR, dando falsos negativos. Por otra parte, Thiéry *et al.* (1999a) observaron que el conjunto de cebadores F2-R3 no fue capaz de reconocer el genoma de una cepa de betánodavirus de origen atlántico debido a la diversidad genética de este virus. En concordancia con esta observación, Grotmol *et al.* (2000) establecieron la hipótesis de que la variación de la secuencia entre

betanodavirus podría dar lugar a una falta de coincidencia entre oligonucleótidos y su región diana, perjudicando así la potencia diagnóstica de la PCR. Desde la publicación del conjunto de cebadores F2-R3, se han desarrollado otros varios protocolos basados en la PCR para aumentar la sensibilidad y la especificidad del diagnóstico de betanodavirus, algunos de los cuales se indican en la Tabla 4.1. Las pruebas diseñadas por Dalla Valle *et al.* (2000) y Thiéry *et al.* (1999b) se probaron en cepas de betanodavirus de origen mediterráneo, mientras que el protocolo desarrollado por Grotmol *et al.* (2000) es adecuado para detectar cepas de agua fría.

Tabla 4.1. Conjuntos de cebadores utilizados para la detección de betanodavirus mediante PCR convencional

Cebador	Diana	Secuencia 5' → 3'	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
NNVV1 NNVV2 NNVV3 NNVV4	RNA2	ACA-CTG-GAG-TTT-GAA-ATT-CA GTC-TTG-TTG-AAG-TTG-TCC-CA ATT-GTG-CCC-CGC-AAA-CAC GAC-ACG-TTG-ACC-ACA-TCA-GT	605 255	Dalla Valle <i>et al.</i> , 2000
AH95-F1 AH95-R1		AGT-GCT-GTG-TCG-CTG-GAG-TG CGC-CCT-GTG-TGA-ATG-TTT-TG	341	
F2 R3		CGT-GTC-AGT-CAT-GTG-TCG-CT CGA-GTC-AAC-ACG-GGT-GAA-GA	unas 430	
F2-atl R3-atl		CGT-GTC-GGT-GTT-ATG-TCG-CT CGC-ATC-GAC-CCT-GGT-GAA-GG		
F2 R3 F'2 R'3	RNA2	CGT-GTC-AGT-CAT-GTG-TCG-CT CGA-GTC-AAC-ACG-GGT-GAA-GA GTT-CCC-TGT-ACA-ACG-ATT-CC GGA-TTT-GAC-GGG-GCT-GCT-CA	420 294	Thiéry <i>et al.</i> , 1999b

4.3.1.2.3.2. PCR en tiempo real

En términos generales, los métodos basados en la PCR en tiempo real presentan un mejor rendimiento analítico que las PCR convencionales, y proporcionan resultados fiables con poca manipulación de la muestra. Grove *et al.* (2006) desarrollaron y validaron un método de RT-PCR en tiempo real para detectar específicamente el virus de la necrosis nerviosa del halibut. Esta prueba parecía ser óptima para el reconocimiento de virus de aguas frías, pero ineficaz para detectar cepas de aguas cálidas (como el VNNEA). Dalla Valle *et al.* (2005) estandarizaron una PCR en tiempo real basada en verde SYBR sensible para la detección de betanodavirus de peces basada en dos dianas moleculares (RNA1 y RNA2). Este método permitió detectar los cuatro genotipos conocidos y se ha validado parcialmente utilizando una cepa de tipo VNNEA. Aunque el uso de tinciones de ADN bicatenario inespecíficas da lugar a una considerable mejora de la sensibilidad analítica, el análisis de la curva de fusión en ocasiones da resultados dudosos. Se sabe que la química basada en sondas es más rápida y ofrece mayor especificidad. Hick *et al.* (2010) optimizaron una RT-qPCR basada en TaqMan (prueba qR2T) para la detección de betanodavirus, que se ha validado extensamente. Se evaluaron la sensibilidad, la repetibilidad y la reproducibilidad analíticas y diagnósticas. También se determinó la especificidad de la prueba, pero el protocolo no se ha probado en cepas víricas de agua fría. Hasta ahora, el método basado en TaqMan desarrollado por el Laboratorio de Referencia de la OIE para la ERV o NNV, validado según las normas de la OIE, parece ser adecuado para detectar los cuatro genotipos establecidos, así como betanodavirus del bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) y del halibut (Panzarin *et al.*, 2010). Todos los conjuntos de cebadores y sonda relacionados con la bibliografía citada se indican en la Tabla 4.1. Abajo se detalla el protocolo de Panzarin *et al.* (2010), aunque pueden utilizarse otros métodos.

Purificación de ARN

Puede extraerse ARN total directamente de homogenados de tejido diluidos a 1:5 en medio mínimo esencial de Eagle (el mismo homogenado se puede utilizar para el aislamiento del virus en cultivos celulares; arriba se indica cómo preparar la muestra) o monocapas celulares infectadas, utilizando el NucleoSpin RNAII (Macherey–Nagel GmbH&Co.¹) según las recomendaciones del fabricante. Pueden utilizarse otros kits de aislamiento del ARN cuyo rendimiento se haya demostrado.

¹ La referencia a productos comerciales concretos como ejemplos no implica la aprobación por parte de la OIE. Esto es aplicable a todos los productos comerciales mencionados en este *Manual Acuático*.

Transcripción inversa (RT) y síntesis de ADNc

- i) Se prepara una mezcla de reacción para el número de muestras a analizar. Se prepara la mezcla madre de 30 µl para cada reacción del siguiente modo (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems): 6,3 µl de agua de grado PCR; 3 µl de tampón RT 10×; 1,2 µl de mezcla de dNTP 25× (100 mM); 3 µl de cebadores aleatorios RT 10×; 1,5 µl de transcriptasa inversa MultiScribe™ (50 U/µl); 15 µl de ARN purificado.
- ii) Se colocan los tubos en el termociclador y se aplican las siguientes condiciones: 10 minutos de pre-incubación a 25°C, 120 minutos de transcripción inversa a 37°C.
- iii) Se mantiene el ADNc a –20°C hasta que se utilice.

PCR TaqMan en tiempo real

- i) Se prepara una mezcla de reacción para el número de muestras a analizar. La mezcla madre de 20 µl para cada reacción se prepara del siguiente modo (LightCycler® TaqMan® Master, Roche Diagnostics GmbH): 7,7 µl de agua de grado PCR; 0,9 µl de cebador RNA2 directo (20 µM); 0,9 µl de cebador RNA2 inverso (20 µM); 1,5 µl de sonda RNA2 (10 µM); 4 µl de Master Mix 5×; 5 µl de ADNc.
- ii) Se colocan las muestras en la plataforma de tiempo real y se empieza el siguiente perfil térmico: una incubación de 10 minutos a 95°C seguida de 45 ciclos de 10 segundos de desnaturalización a 95°C, 35 segundos de hibridación a 58°C y 1 segundo de elongación a 72°C. Estas condiciones de ciclado son para la plataforma LightCycler 2.0.
- iii) Se analizan los datos con el programa informático asociado al instrumental. El valor de corte diagnóstico se fija en 36 CP (punto de cruce). En caso de resultados dudosos (por ejemplo CP ≥ 36), se repite el análisis.

NOTA: El rendimiento analítico puede variar en función de las condiciones en las que se lleve a cabo el protocolo (por ejemplo, el perfil término podría precisar optimización, según la plataforma utilizada). Es importante destacar que se recomienda llevar a cabo el protocolo de Panzarin *et al.* (2010) en dos pasos, de lo contrario podría resultar afectada la sensibilidad de la prueba.

Tabla 4.2. Conjuntos de cebadores/sonda utilizados para la detección de betanodavirus mediante PCR en tiempo real

Cebador	Diana	Secuencia 5' → 3'	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
Q-RdRP-1	RNA1	GTG-TCC-GGA-GAG-GTT-AAG-GAT-G	273	Dalla Valle <i>et al.</i> , 2005
Q-RdRP-2		CTT-GAA-TTG-ATC-AAC-GGT-GAA-CA		
Q-CP-1	RNA2	CAA-CTG-ACA-ACG-ATC-ACA-CCT-TC	230	
Q-CP-2		CAA-TCG-AAC-ACT-CCA-GCG-ACA		
P1	RNA2	GGT-ATG-TCG-AGA-ATC-GCC-C	194	Grove <i>et al.</i> , 2006
P2		TAA-CCA-CCG-CCC-GTG-TT		
Probe		TTA-TCC-CAG-CTG-GCA-CCG-GC*		
qR2TF	RNA2	CTT-CCT-GCC-TGA-TCC-AAC-TG	93	Hick <i>et al.</i> , 2010
qR2TR		GTT-CTG-CTT-TCC-CAC-CAT-TTG		
R2probe2		CAA-CGA-CTG-CAC-CAC-GAG-TTG*		
RNA2 FOR	RNA2	CAA-CTG-ACA-RCG-AHC-ACA-C	69	Panzarin <i>et al.</i> , 2010
RNA2 REV		CCC-ACC-AYT-TGG-CVA-C		
RNA2 probe		TYC-ARG-CRA-CTC-GTG-GTG-CVG*		

* Tinción indicadora, FAM; quencher, BHQ1

NOTA: a excepción del método anterior, ninguno de los protocolos citados en los párrafos 4.3.1.2.3.1. y 4.3.1.2.3.2. se ha validado oficialmente mediante pruebas de eficiencia interlaboratoriales documentadas. El protocolo de Panzarin *et al.* (2012) se ha sometido a un ensayo de validación en círculo en el que han intervenido cinco laboratorios europeos.

4.3.1.2.3.3. Secuenciación

La secuenciación del genoma, además de ser útil para la confirmación del diagnóstico, también es fundamental para los estudios epidemiológicos. El análisis de la secuencia de la región variable T4 (Nishizawa *et al.*, 1997) permite la asignación al genotipo correcto. No obstante, el análisis filogenético basado en la secuencia de ambos segmentos genómicos, parece aportar más información, y se recomienda para destacar posibles episodios de recombinación que tengan lugar entre distintos genotipos de betanodavirus y dentro de cada genotipo (Oliveira *et al.*, 2009; Panzarin *et al.*, 2012; Toffolo *et al.*, 2007).

4.3.1.2.4. *Purificación del agente*

Los betanodavirus pueden ser fáciles de purificar mediante ultracentrifugación por gradientes de cloruro de cesio (Chi *et al.*, 2001; Comps *et al.*, 1994; Mori *et al.*, 1992).

4.3.2. **Métodos serológicos**

Dado que no ha habido suficiente investigación, la detección de anticuerpos específicos hasta ahora no se ha considerado un método de detección sistemático para la evaluación del estado de las poblaciones de peces respecto a los virus. No obstante, varios autores han comunicado indicios de anticuerpos específicos. Según observaciones de campo, un título de ELISA $\geq 1:40$ debe considerarse indicador de infección vírica, mientras que valores $\leq 1:10$ deben considerarse indicadores de ausencia de la enfermedad (Watanabe *et al.*, 2000).

5. **Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto**

Los métodos actualmente disponibles para la vigilancia dirigida y el diagnóstico de la VER/NNV se detallan en la Tabla 5.1. Las denominaciones utilizadas en la Tabla indican: a = el método es el recomendado por razones de disponibilidad, utilidad y especificidad y sensibilidad de diagnóstico; b = el método es estándar, con buena sensibilidad y especificidad de diagnóstico, pero cuyo coste y disponibilidad limitan su aplicación; c = el método tiene aplicación en algunas situaciones, pero la precisión u otros factores limitan seriamente su aplicación; y d = el método no se recomienda actualmente para este fin. Esta clasificación es de alguna forma subjetiva ya que la idoneidad implica cuestiones de fiabilidad, sensibilidad, especificidad y utilidad. Aunque no todas las pruebas incluidas en las categorías a o b se han sometido a estandarización y validación formales, su naturaleza sistemática y el hecho de que se hayan usado generalmente sin resultados dudosos las hace aceptables.

Tabla 5.1. *Métodos de vigilancia, detección y diagnóstico de betanodavirus*

Método	Vigilancia dirigida	Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
Histopatología	d	b	d
Histopatología seguida de inmunotinción	c	b	a
ME de transmisión	d	c	d
Aislamiento en cultivo celular seguido de inmunotinción, PCR en tiempo real o PCR y secuenciación	b	a	a
RT-PCR	c	a	c
RT-PCR seguida de secuenciación	b	a	a
PCR en tiempo real	a	a	a*

ME = microscopía electrónica; RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa.

6. **Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de encefalopatía y retinopatía virales**

La vigilancia dirigida debe basarse en un seguimiento periódico de las piscifactorías en las que se críen especies susceptibles. Si hay fases larvares y juveniles, deben tomarse muestras de las mismas preferiblemente durante la época más adecuada, teniendo en cuenta la temperatura óptima de los genotipos esperados.

NOTA: Actualmente no hay ningún procedimiento descrito, ni oficial ni recomendado, de análisis de las poblaciones sanas para demostrar la ausencia de la enfermedad. La PCR en tiempo real seguida del aislamiento del virus debe considerarse el método más adecuado para la vigilancia dirigida destinada a detectar betanodavirus.

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

Debe sospecharse de ERV o NNV si se cumple al menos uno de los siguientes criterios:

- i) Aparición de conducta natatoria anómala en especies susceptibles;
- ii) Detección de lesiones histopatológicas típicas detectadas en una población de especies susceptibles;
- iii) Observación del ECP típico en cultivos celulares sin identificación del agente causal;
- iv) Un resultado positivo en una de las pruebas diagnósticas calificadas como “a” o “b” en la columna “Diagnóstico provisional” de la Tabla 5.1.;
- v) Transferencia de peces vivos de una piscifactoría infectada a otro lugar;
- vi) Existencia de distintos enlaces epidemiológicos entre una piscifactoría infectada y una segunda piscifactoría;
- vii) Detección de actividad de anticuerpos específicos.

7.2. Definición de caso confirmado

Un caso de ERV o NNV confirmado se define como un caso sospechoso que haya producido un ECP típico en cultivo celular con posterior identificación del agente causal mediante una prueba molecular basada en anticuerpos o

Un segundo resultado positivo en una prueba de diagnóstico diferente clasificada como “a” en la columna “Diagnóstico confirmativo” de la Tabla 5.1.

8. Bibliografía

- ARIMOTO M., MARUYAMA K. & FURUSAWA I. (1994). Epizootiology of viral nervous necrosis (VNN) in striped jack. *Fish Pathol.*, **29**, 19–24.
- ARIMOTO M., MUSHIAKE K., MIZUTA Y., NAKAI T., MUROGA K. & FURUSAWA I. (1992). Detection of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Fish Pathol.*, **27**, 191–195.
- ARIMOTO M., SATO J. MARUYAMA K., MIMURA G. & FURUSAWA I. (1996). Effect of chemical and physical treatments on the inactivation of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Aquaculture* **143**, 15–22.
- BARKER D.E., MACKINNON A.M., BOSTON L., BURT M.D.B., CONE D.K., SPEARE D.J., GRIFFITHS S., COOK M., RITCHIE R. & OLIVIER G. (2002). First report of piscine nodavirus infecting wild winter flounder *Pleuronectes americanus* in Passamaquoddy Bay, New Brunswick, Canada. *Dis. Aquat. Org.*, **49**, 99–105.
- BOVO G, GUSTINELLI A., QUAGLIO F., GOBBO F., PANZARIN V., FUSARO A., MUTINELLI F., CAFFARA M., FIORAVANTI M. L. (2011). Viral encephalopathy and retinopathy outbreak in freshwater fish farmed in Italy. *Dis. Aquat.Org.*, **96**, 45–54.
- CHI S.C., HU W.W. & LO B.L. (1999). Establishment and characterization of a continuous cell line (GF-1) derived from grouper, *Epinephelus coioides* (Hamilton): a cell line susceptible to grouper nervous necrosis virus (GNNV). *J. Fish Dis.*, **22**, 173–182.
- CHI S.C., LO C.F. & LIN S.C. (2001). Characterization of grouper nervous necrosis virus. *J. Fish Dis.*, **24**, 3–13.
- CHI S.C., SHIEH J.R. & LIN S.J. (2003). Genetic and antigenic analysis of betanodaviruses isolated from aquatic organisms in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.*, **55**, 221–228.
- CHI S.C.,WU Y.C. & CHENG T.M. (2005). Persistent infection of betanodavirus in a novel cell line derived from the brain tissue of barramundi *Lates calcarifer*. *Dis. Aquat. Org.*, **65**, 91–98.

CIULLI S., DI MARCO P., NATALE A., GALLETTI E., BATTIMANI M., SCAGLIARINI A., PUR PARI G., CANNELLA V., CASTIGLIONE F. & GUERCIO A. (2006). Detection and characterization of Betanodavirus in wild fish from Sicily, Italy. *Ittiopatologia*, **3**, 101–112.

COMPS M., PEPIN J.F. & BONAMI J.R. (1994). Purification and characterization of two fish encephalitis viruses (FEV) infecting *Lates calcarifer* and *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, **123**, 1–10.

DALLA VALLE L., TOFFOLO V., LAMPRECHT M., MALTESE C., BOVO G., BELVEDERE P. & COLOMBO L. (2005). Development of a sensitive and quantitative diagnostic assay for fish nervous necrosis virus based on two-target real-time PCR. *Vet. Microbiol.*, **110**, 167–179.

DALLA VALLE L., ZANELLA L., PATARNELLO P., PAOLUCCI L., BELVEDERE P. & COLOMBO L. (2000). Development of a sensitive diagnostic assay for fish nervous necrosis virus based on RT-PCR plus nested PCR. *J. Fish Dis.*, **23**, 321–327.

FRERICHS G.N., RODGER H.D. & PERIC Z. (1996). Cell culture isolation of piscine neuropathy nodavirus from juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *J. Gen. Virol.*, **77**, 2067–2071.

FRERICHS G.N., TWEEDIE A., STARKEY W.G. & RICHARDS R.H. (2000). Temperature, pH, and electrolyte sensitivity, and heat, UV and disinfectant inactivation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) neuropathy nodavirus. *Aquaculture*, **185**, 13–24.

FURUSAWA R., OKINAKA Y., UEMATSU K. & NAKAI T. (2007). Screening of freshwater fish species for their susceptibility to a betanodavirus. *Dis. Aquat. Org.*, **77**, 119–125.

GOMEZ D.K., SATO J., MUSHIAKE K., ISSHIKI T., OKINAKA Y. & NAKAI T. (2004). PCR-based detection of betanodaviruses from cultured and wild marine fish with no clinical signs. *J. Fish Dis.*, **27**, 603–608.

GROTMOL S., BERGH O & TOTLAND G.K. (1999). Transmission of viral encephalopathy and retinopathy (VER) to yolk-sac larvae of the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*: occurrence of nodavirus in various organs and a possible route of infection. *Dis. Aquat. Org.*, **36**, 95–106.

GROTMOL S., NERLAND A.H., BIERING E., TOTLAND G.K. & NISHIZAWA T. (2000). Characterisation of the capsid protein gene from a nodavirus strain affecting the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* and design an optimal reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection assay. *Dis. Aquat. Org.*, **39**, 79–88.

GROTMOL S. & TOTLAND G.K. (2000). Surface disinfection of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* eggs with ozonated sea-water inactivates nodavirus and increases survival of the larvae. *Dis. Aquat. Org.*, **39**, 89–96.

GROVE S., FALLER R., SOLEIM K.B. & DANNEVIG B.H. (2006). Absolute quantitation of RNA by a competitive real-time RT-PCR method using piscine nodavirus as a model. *J. Virol. Methods*, **132**, 104–112.

HICK P. & WHITTINGTON R.J. (2010). Optimisation and validation of a real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for detection of betanodavirus. *J. Virol. Methods*, **163**, 368–377.

IWAMOTO T., NAKAI T., MORI K., ARIMOTO M. & FURUSAWA I. (2000). Cloning of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses. *Dis. Aquat. Org.*, **43**, 81–89.

IWAMOTO T., MISE K., MORI K., ARIMOTO M., NAKAI T. & OKUNO T. (2001). Establishment of an infectious RNA transcription system for *Striped jack nervous necrosis virus*, the type species of the betanodavirus. *J. Gen. Virol.*, **82**, 2653–2662.

IWAMOTO T., OKINAKA Y., MISE K., MORI K., ARIMOTO M., OKUNO T. & NAKAI T. (2004). Identification of host-specificity determinants in betanodaviruses by using reassortants between striped jack nervous necrosis virus and sevenband grouper nervous necrosis virus. *J. Virol.*, **78**, 1256–1262.

JOHANSEN R., RANHEIM T., HANSEN M.K., TAKSDAL T. & TOTLAND G.K. (2002). Pathological changes in juvenile Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* persistently infected with nodavirus. *Dis. Aquat. Org.*, **50**, 161–169.

JOHANSEN R., AMUNDSEN M., DANNEVIG B.H. & SOMMER A.I. (2003). Acute and persistent experimental nodavirus infection in spotted wolffish *Anarhichas minor*. *Dis. Aquat. Org.*, **57**, 35–41.

- JOHANSEN R., ROVE S., SVENDSEN N.A.K., MODAHL I. & DANNEVIG B. (2004). A sequential study of pathological findings in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L), throughout one year after an acute outbreak of viral encephalopathy and retinopathy. *J. Fish Dis.*, **27**, 327–341.
- KAI Y.H. & CHI S.C. (2008). Efficacies of inactivated vaccines against betanodavirus in grouper larvae (*Epinephelus coioides*) by bath immunization. *Vaccine*, **26**, 1450–1457.
- MALTESE C. & BOVO G. (2007). Viral encephalopathy and retinopathy. *Ittiopatologia*, **4**, 93–146.
- MORI K., NAKAI T., MUROGA K., ARIMOTO M., MUSHIAKE K. & FURUSAWA I. (1992). Properties of a new virus belonging to Nodaviridae found in larval striped jack (*Pseudocaranx dentex*) with nervous necrosis. *Virology* **187**, 368–371.
- MORI K., MANGYOKU T., IWAMOTO T., ARIMOTO M., TANAKA S. & NAKAI T. (2003). Serological relationships among genotypic variants of betanodavirus. *Dis. Aquat. Org.*, **57**, 19–26.
- MORI K., MUSHIAKE K. & ARIMOTO M. (1998). Control measures for viral nervous necrosis in striped jack. *Fish Pathol.*, **33**, 443–444.
- MORI K., SUGAYA T., NISHIOCAT., GOMEZ D.K., FUJINAMY Y., OKA M., ARIMOTO M., OKINAKA Y. & NAKAI T. (2005). Detection of Betanodaviruses from feed fish used in marine aquaculture. In: 12th International Conference Diseases of Fish and Shellfish, European Association of Fish Pathologists. Copenhagen (Denmark), 11–16 September 2005. Abstract O-142.
- MUNDAY B.L., KWANG J. & MOODY N. (2002). Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *J. Fish Dis.*, **25**, 127–142.
- MUSHIAKE K., NISHIZAWA T., NAKAI T., FURUSAWA I. & MUROGA K. (1994). Control of VNN in striped jack: Selection of spawners based on the detection of SJNNV gene by polymerase chain reaction (PCR). *Fish Pathol.*, **29**, 177–182.
- NGUYEN H.D., MUSHIAKE K., NAKAI T. & MUROGA K. (1997). Tissue distribution of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in adult striped jack. *Dis. Aquatic. Org.*, **28**, 87–91.
- NISHIZAWA T., MORI K., NAKAI T., FURUSAWA I. & MUROGA K. (1994). Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Dis. Aquat. Org.*, **18**, 103–107.
- NISHIZAWA T., MUROGA K. & ARIMOTO M. (1996). Failure of the polymerase chain reaction (PCR) method to detect jack nervous necrosis virus (SJNNV) in striped jack *Pseudocaranx dentex* selected as spawners. *J. Aquat. Anim. Health.*, **8**, 332–334.
- NISHIZAWA T., FURUHASHI M., NAGAI T., NAKAI T. & MUROGA K. (1997). Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 1633–1636.
- OLIVEIRA J.G., SOUTO S., DOPAZO C.P., THIÉRY R., BARJA J.L. & BANDÍN I. (2009). Comparative analysis of both genomic segments of betanodaviruses isolated from epizootic outbreaks in farmed fish species provides evidence for genetic reassortment. *J. Gen. Virol.*, **90**, 2940–2951.
- PANZARIN V., FUSARO A., MONNE I., CAPPELLOZZA E., PATARNELLO P., BOVO G., CAPUA I., HOLMES E.C. & CATTOLI G. (2012). Molecular epidemiology and evolutionary dynamics of betanodavirus in southern Europe. *Infect Genet Evol* **12**, 63–70.
- PANZARIN V., PATARNELLO P., MORI A., RAMPAZZO E., CAPPELLOZZA E., BOVO G. & CATTOLI G. (2010). Development and validation of a real-time TaqMan PCR assay for the detection of betanodavirus in clinical specimens. *Arch. Virol.*, **155**, 1193–1203.
- SANO M., NAKAI T. & FIJAN N. (2011). Viral diseases and agents of warmwater fish. In: Fish Diseases and Disorders, Vol. 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections, 2nd edition, Woo P.T.K & Bruno D.W., eds. CABI, London, UK, 166–244.
- SOMMERSET I. & NERLAND A.H. (2004). Complete sequence of RNA1 and subgenomic RNA3 of Atlantic halibut nodavirus (AHNV). *Dis. Aquat. Org.*, **58**, 117–125.
- TAN C., HUANG B., CHANG S.F., NGOH G.H., MUNDAY B.L., CHEN S.C. & KWANG J. (2001). Determination of the complete nucleotide sequence of RNA1 and RNA2 from greasy grouper (*Epinephelus tauvina*) nervous necrosis virus, Singapore strain. *J. Gen. Virol.*, **82**, 647–653.

TANAKA S., MORI K., ARIMOTO M., IWAMOTO T. & NAKAI T. (2001). Protective immunity of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, against experimental viral nervous necrosis. *J. Fish Dis.*, **24**, 15–22.

TANAKA S., AOKI H. & NAKAI T. (1998). Pathogenicity of the nodavirus detected from diseased sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *Fish Pathol.*, **33**, 31–36.

THIÉRY R., ARNAULD C., DELSERT C. (1999a). Two isolates of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., nervous necrosis virus with distinct genomes. *J. Fish Dis.*, **22**, 201–207.

THIÉRY R., RAIMOND J.C., CASTRIC J. (1999b). Natural outbreak of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*: study by nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Virus Res.*, **63**, 11–17.

THIÉRY R., COZIEN J., DE BOISSESON C., KERBART-BOSCHER S. & NEVAREZ L. (2004). Genomic classification of new betanodavirus isolates by phylogenetic analysis of the coat protein gene suggest a low host-fish species specificity. *J. Gen. Virol.*, **85**, 3079–3087.

THIÉRY R., COZIEN J., CABON J., LAMOUR F., BAUD M. & SCHNEEMANN A. (2006). Induction of a protective immune response against viral nervous necrosis in the European sea bass *Dicentrarchus labrax* by using betanodavirus virus-like particles. *J. Virol.*, **80**, 10201–10207.

THIÉRY R., JOHNSON K.L., NAKAI T., SCHNEEMANN A., BONAMI J.R., LIGHTNER D.V. (2011). Family Nodaviridae. In: *Virus Taxonomy Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B. & Lefkowitz E.J., eds. Elsevier Academic Press, London, UK, 1061–1067.

TOFFOLO V., NEGRISOLO E., MALTESE C., BOVO G., BELVEDERE P., COLOMBO L. & DALLA VALLE L. (2007). Phylogeny of betanodaviruses and molecular evolution of their RNA polymerase and coat proteins. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **43**, 298–308.

WATANABE K., NISHIZAWA T. & YOSHIMIZU M. (2000). Selection of broodstock candidates of barfin flounder using an ELISA system with recombinant protein of barfin flounder nervous necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.*, **41**, 219–223.

YAMASHITA H., MORI K., KURODA A. & NAKAI T. (2009a). Neutralizing antibody levels for protection against betanodavirus infection in sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* (Thunberg), immunized with an inactivated virus vaccine. *J. Fish Dis.*, **32**, 767–775.

YAMASHITA H., MORI K. & NAKAI T. (2009b). Protection against viral nervous necrosis conferred by simultaneous inoculation of aquabirnavirus and inactivated betanodavirus in sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* (Thunberg). *J. Fish Dis.*, **32**, 201–210.

YUASA K., ISTI KOESHARYANI & KETUT MAHARDIKA (2007). Effect of high water temperature on betanodavirus infection of fingerling humpback grouper *Cromileptes altivelis*. *Fish Pathol.*, **42**, 219–221.

*
* *

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la Encefalopatía y retinopatía virales (puede consultarse en la Tabla del final de este *Manual Acuático* o en la página web de la OIE <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>). Para más información sobre la Anemia infecciosa del salmón, por favor contacte con el Laboratorio de Referencia de la OIE

APARTADO 2.4.

ENFERMEDADES DE LOS MOLUSCOS

CAPÍTULO 2.4.0.

INFORMACIÓN GENERAL

La siguiente información y los siguientes procedimientos son adecuados para los agentes patógenos de la lista de la OIE, y proporcionarán una orientación a los patólogos que estudien brotes de enfermedades de los moluscos o que lleven a cabo procedimientos de vigilancia de las enfermedades. No obstante, si un trastorno persiste o se propaga más allá de los lugares en los que se ha detectado inicialmente debe consultarse el caso con patólogos con experiencia en marisco.

1. Evaluación del estado sanitario de la unidad epidemiológica

1.1. Muestras a utilizar en las pruebas

Las muestras a utilizar dependen de la especie, la fase de vida y el tamaño de los animales, así como del objetivo de la prueba (es decir, si se trata de diagnosticar una enfermedad manifiesta o de tomar muestras para una vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de una enfermedad concreta). En los capítulos de este *Manual Acuático* sobre cada enfermedad se indican detalles concretos sobre los requisitos referentes a las muestras.

1.2. Especificaciones relativas al tamaño del molusco

1.2.1. Para detectar los parásitos de la lista

Juveniles de menos de 1 cm: se toma una muestra de animales enteros pero se elimina la concha o se procesa con un protocolo de descalcificación. Deben realizarse cortes que incluyan la mayor parte de los órganos. Esto pueden comportar tomar dos cortes de cada bloque histológico para disponer de órganos de distintas zonas (por ejemplo, los situados cerca de la superficie o más profundamente en el bloque).

Juveniles y adultos de 1-6 cm: se toma una muestra de todo el molusco y se realizan uno o varios cortes de 3-5 mm de espesor que incluyan el palpo labial, las branquias y la glándula digestiva.

Moluscos de más de 6 cm: se realizan varios cortes del cuerpo que contengan órganos/tejidos determinados, incluidos el manto, las branquias, la glándula digestiva, las gónadas y el riñón.

1.2.2. Para detectar el síndrome de marchitamiento de las orejas de mar

En el caso de orejas de mar ≥ 20 mm, se toman varios cortes de 3-5 mm de espesor que contengan el esófago posterior (post-esófago), la glándula digestiva y el músculo del pie.

1.2.3 Para detectar infecciones por el herpesvirus de las orejas de mar

Se toman muestras como se ha indicado en el apartado 1.2.2 anterior añadiendo un corte transversal de la cabeza para disponer del ganglio cerebroideo y tomando varios cortes del complejo del músculo del pie y aductor incluyendo un corte de 0,25-1,0 cm (la distancia depende de la longitud máxima de la oreja de mar) posterior a la cabeza para disponer del ganglio podal. Además, debe tomarse un corte longitudinal que abarque desde el ganglio podal anterior hasta la parte posterior de la musculatura del pie. Se indican más detalles sobre la toma de muestras en el apartado C de la introducción general a esta parte del *Manual Acuático*: Parte 2. Recomendaciones aplicables a enfermedades específicas.

1.3. Especificaciones relativas a las poblaciones de moluscos

Para disponer de una orientación general, consúltese la Guía de la OIE para la Vigilancia Sanitaria de los Animales Acuáticos (2009), y para conocer detalles sobre los requisitos respecto a las muestras para cada enfermedad concreta, consúltese los capítulos de este *Manual Acuático* sobre cada enfermedad.

- Normalmente, las poblaciones de moluscos que se cultivan hasta el peso comercial se crían en condiciones semi-intensivas (en bandejas, bolsas o sobre cuerdas o estacas, y utilizando métodos de cultivo en el fondo) e interaccionan mucho con los medios naturales;
- Algunas de las fases de vida de las poblaciones de moluscos cultivadas a menudo tienen lugar en estado salvaje (por ejemplo, las fases larvarias, que se recogen en el medio natural para después cultivarlas hasta el peso comercial), y a este tipo de poblaciones no siempre se puede llegar para observarlas y muestrearlas;
- Pueden existir múltiples métodos de cultivo para la misma especie dentro de la misma jurisdicción, los cuales pueden representar distintas poblaciones respecto a las características de riesgo;
- Las zonas geográficas extremadamente grandes pueden estar formadas por muchas pequeñas piscifactorías o unidades de producción contiguas con distintos propietarios y gestiones. Esto puede suponer un problema a la hora de diseñar programas de muestreo basados en la gestión de la población de moluscos;
- En algunos momentos de su ciclo de vida, los moluscos pueden ser sésiles (como por ejemplo, las ostras adultas) y muy móviles en otras fases (como por ejemplo, las larvas de ostras);
- Las poblaciones de moluscos, en concreto de moluscos salvajes, pueden ser difíciles de localizar debido a su hábitat (como por ejemplo, las almejas enterradas o las poblaciones submareales);
- Determinadas zonas geográficas a menudo contienen muchas especies y clases de edad de moluscos procedentes de distintos orígenes, lo cual dificulta la identificación de cada población de moluscos a la que pueden ir dirigidos los programas de vigilancia;
- Las poblaciones de moluscos salvajes son muy importantes para el estado de un país respecto a una enfermedad, pero en momentos concretos es posible que no se disponga de ellas para muestrearlas.

1.4. Especificaciones relativas al estado clínico

En el caso de infecciones clínicas, además de tomarse muestras de los órganos y tejidos diana, también deben tomarse otras del manto, palpos, etc. que presenten anomalías macroscópicas o lesiones. Para las pruebas de detección de agentes patógenos, deben tomarse muestras de diez moluscos enfermos o moribundos. También deben obtenerse muestras paralelas ($n > 10$) de animales aparentemente normales de la misma zona de producción.

2. Procesado general de las muestras

Todas las muestras deben enviarse vivas al laboratorio de diagnóstico autorizado. El laboratorio debe estar informado de la hora estimada de llegada de la muestra, de modo que pueda prepararse el material necesario para procesar los moluscos antes de que estos lleguen.

Las muestras de moluscos deben empaquetarse de modo que se mantengan vivos y de acuerdo con las normas actuales. Si el lugar muestreado está muy alejado del laboratorio, puede ocurrir que los animales lleguen moribundos u oliendo mal, y serán poco útiles para el análisis. Las muestras requeridas deben enviarse cuanto antes tras ser extraídas del agua, con el fin de reducir la retención de aire y la posible mortalidad durante el transporte, sobre todo en el caso de moluscos enfermos moribundos. A no ser que se especifique lo contrario, los animales moribundos deben enviarse sobre hielo (aunque no congelados) para reducir la descomposición de la muestra.

En el caso de muestras que no se puedan enviar vivas al laboratorio de diagnóstico, debido a un estado avanzado de la enfermedad, a largas distancias o a medios de transporte lentos, etc. deben fijarse en el lugar de obtención como se recomienda en los siguientes apartados de este capítulo o en los capítulos de este *Manual Acuático* sobre cada enfermedad. Aunque esto es adecuado para, por ejemplo, el posterior examen mediante histología o microscopía electrónica de transmisión, otras técnicas, como los frotis frescos, las improntas de tejidos, la bacteriológica sistemática, la micología o el cultivo de *Perkinsus* spp. en medio de tioglicolato líquido de Ray no

pueden llevarse a cabo. Antes de obtener las muestras deben aclararse las necesidades de diagnóstico y los requisitos de la muestra con el laboratorio de diagnóstico.

Las muestras deben ir acompañadas de información básica, como el motivo por el que se envía la muestra (vigilancia, mortalidad anómala, crecimiento anómalo, etc.), las observaciones macroscópicas y los parámetros ambientales asociados, la prevalencia aproximada y patrones de mortalidad, el origen y tipo de moluscos (especie, edad, si las muestras proceden de poblaciones locales de moluscos o de poblaciones transferidas procedentes de otro lugar, la fecha de la transferencia y el lugar de procedencia, etc.). Esta información debe indicar posibles cambios de manipulación o de las condiciones ambientales que pudieran influir en la mortalidad, tal vez junto con la presencia de agentes infecciosos.

2.1. Examen macroscópico

La observación macroscópica de los moluscos debe tener por objetivo, siempre que sea posible, el comportamiento del animal, la superficie de la concha, la parte interna de la concha y los tejidos blandos.

A menudo es difícil observar el comportamiento de los moluscos en aguas abiertas. No obstante, la observación de moluscos en determinadas instalaciones de cría, como las de reproductores en tanques y las de larvas en viveros, puede aportar indicaciones útiles de alteraciones del comportamiento relacionadas con la enfermedad. Si se detectan signos (por ejemplo, pre-depósito de larvas en el fondo, acumulación de alimento en los tanques, signos de debilitamiento, etc.), puede comprobarse si las muestras presentan signos macroscópicos, buscando mediante un microscopio de disección posibles anomalías y deformidades, organismos que huelan mal, y fijándolos para un posterior procesamiento como se recomienda abajo. En el caso de los adultos y los juveniles, los signos de debilitamiento pueden consistir en una posición entreabierta de la concha, acumulación de arena, barro y detritos en el manto y sobre las branquias, retracción del manto, que se alejará del borde de la concha, disminución de la actividad (vieiras que nadan menos, almejas que se entierran u orejas de mar que pastan), etc. El reflejo de erguido de las orejas de mar tras ser invertidas no tiene lugar en los animales debilitados, lo cual es un buen indicador de debilidad. Debe llevarse a cabo un seguimiento de la mortalidad en aguas abiertas para comprobar posibles patrones de pérdidas, y deben obtenerse muestras para posteriores análisis. También deben documentarse los factores ambientales, así como las mortalidades previa y posterior.

Incluso en condiciones de cultivo, las conchas de moluscos pueden no estar limpias, y es habitual encontrar organismos malolientes colonizando las superficies de las mismas. Organismos como percebes, lapas, esponjas, gusanos poliquetos, larvas de bivalvos, tunicados, briozoarios, etc. no suelen amenazar la salud de los moluscos. Los sistemas de cultivo, como los cultivos de agua en suspensión y poco profunda, pueden incluso aumentar la exposición a organismos malolientes, y las conchas pueden quedar cubiertas por otros animales y plantas. Esto puede afectar a la salud de forma directa, impidiendo que la concha se abra y cierre, o indirectamente por competición por el alimento. Los signos de debilitamiento asociados a un intenso mal olor son los que deben preocupar, y no el mal olor en sí. Las lesiones en la concha por microorganismos perforantes, como esponjas y gusanos poliquetos, suelen ser benignos, pero en ciertas condiciones pueden alcanzar proporciones que hagan que la concha se agriete o se quiebre o que el agujero llegue a los tejidos blandos. Este grado de lesión en la concha puede debilitar el molusco y hacerlo susceptible a infecciones por agentes patógenos. Deben registrarse las deformidades (forma, agujeros en la superficie), fragilidad, rotura o reparación observadas, pero pueden no ser indicativas de enfermedad preocupante. Los barrenadores epibiontes pueden causar deformidades y debilitar la concha(s). Un color y olor anómalos pueden indicar una posible infección de los tejidos blandos que tal vez tenga que examinarse en un laboratorio.

Los moluscos deben abrirse con cuidado para no dañar los tejidos blandos, sobre todo el manto, las branquias, el corazón y la glándula digestiva. La presencia de organismos malolientes sobre la cara interna de la concha es un indicio claro de debilidad. La superficie interna de la concha normalmente está lisa y limpia por la acción del manto y las branquias. Puede producirse una perforación de la superficie interna, pero esta se puede obturar con el depósito de conchiolina y nácar adicionales. Esto puede dar lugar a la formación de ampollas que se llenan de barro o agua. También se pueden formar ampollas sobre agentes irritantes superficiales, como cuerpos extraños. El grado de perforación de la concha puede determinarse sosteniendo la concha hacia arriba encarada a una fuente de luz intensa. Cuando las anomalías dentro de la matriz de la concha justifican una mayor investigación, pueden llevarse muestras acabadas de obtener al laboratorio, o bien intactas o bien fijadas para la posterior descalcificación, según sea necesario. El aspecto de los tejidos blandos a menudo es indicador del estado fisiológico del animal. Debe comprobarse si en los tejidos blandos hay abscesos, pústulas, cambio de color, perlas, edema, transparencia o acuosidad generales, deformidades de las branquias, etc., y, en el caso de que se observen en animales débiles o moribundos, estas anomalías deben hacer sospechar de un problema.

Deben buscarse y registrarse posibles anomalías y lesiones de los tejidos, así como toda posible deformidad de la concha, organismos que perforen la concha y habitantes llamativos del manto. Deben registrarse los niveles de lesión tisular y deben obtenerse muestras de animales afectados y no afectados para que sean examinados en el laboratorio cuanto antes.

2.2. Examen de poblaciones con mortalidades anómalas

Una mortalidad anómala de moluscos normalmente se detecta por una mortalidad medible súbita que tiene lugar en un corto periodo de tiempo entre dos observaciones o inspecciones de las poblaciones (por ejemplo, de unos 15 días en el caso de instalaciones ubicadas en una zona inter-mareal). En un vivero, una mortalidad anómala da lugar a la falta de producción de larvas procedentes de reproductores distintos. Dada la gran variedad de especies, ambientes y condiciones de cultivo, estas definiciones deben adaptarse cuando y como sea necesario.

Siempre que tenga lugar una mortalidad anómala en poblaciones de moluscos, debe llevarse a cabo una investigación urgente para determinar las causas de la enfermedad.

Las muestras deben obtenerse, conservarse o fijarse y guardarse según los procedimientos descritos en este *Manual Acuático*.

Cuando se disponga de moluscos no afectados o control, también deben fijarse para la comparación histológica con tejidos anómalos. Sea cual sea el fijador, es fundamental que la concha sea eliminada para que el fijador entre fácilmente. En los gasterópodos bivalva y operculados puede mantenerse la concha cerrada bajo el fijador hasta que empiece el autólisis.

2.3. Métodos de diagnóstico

Las técnicas para la detección de agentes patógenos de los moluscos se limitan a la detección directa del agente causal. Los métodos serológicos clásicos no pueden utilizarse a efectos del diagnóstico porque los moluscos no producen anticuerpos. Para la detección de los agentes patógenos de la lista de la OIE, además de la histología y la citología, pueden utilizarse inmunoanálisis con anticuerpos monoclonales o sondas de ácido nucleico. Desde este punto de vista, el desarrollo de técnicas de diagnóstico basadas en el ADN para la detección de agentes patógenos de los moluscos ha sido de lejos el avance más importante de los últimos años. Dado el desarrollo y potencial de aplicación de estas técnicas de diagnóstico y los problemas inherentes actualmente asociados a su uso, la validación es de vital importancia.

En los siguientes apartados se proponen tres niveles de procedimientos de examen. La histología se recomienda como método de detección sistemática estándar porque aporta una gran cantidad de información, lo cual es especialmente importante porque en el examen macroscópico no se suelen hallar signos patognomónicos ni información indicativa sólida. Además, la mortalidad puede estar causada por varios agentes patógenos o problemas fisiológicos, como un empeoramiento del estado tras el desove, y esto solo se puede determinar mediante histología. La vigilancia también se lleva a cabo de forma sistemática mediante histología. No obstante, para cada situación epidemiológica, y cuando esté justificado, la vigilancia dirigida puede basarse en otras técnicas.

Cuando se producen brotes de mortalidad anómala, también se recomienda la histología. Pueden utilizarse distintos métodos de diagnóstico provisional además de la histología, como improntas de tejidos, cultivo en medio de tioglicolato líquido de Ray (RFTM) o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como se recomienda en cada capítulo específico. Estos métodos pueden aportar ventajas de rapidez y/o coste ante una sospecha de infección por un agente patógeno dado.

Cuando se encuentra un agente patógeno durante un proceso de detección sistemática o durante brotes de mortalidad, para la identificación específica cada vez se utilizan más los métodos moleculares, además de la microscopía electrónica. Algunas de las enfermedades de los moluscos de la lista de la OIE están causadas por agentes patógenos que pertenecen a géneros que engloban especies estrechamente relacionadas. En los siguientes capítulos se recomiendan protocolos específicos diseñados para detectar ciertos agentes de la lista, que pueden utilizarse para confirmar los resultados del examen histológico y/o dar un diagnóstico específico de especie.

2.4. Técnicas histológicas

Dado que en los procedimientos de diagnóstico de las enfermedades de los moluscos la histología se utiliza de forma genérica, en este capítulo se aporta una orientación técnica detallada.

La histología es una técnica que se utiliza para estudiar la estructura de las células y los tejidos al microscopio óptico. La preparación del tejido consiste en distintos pasos, que son la fijación, la deshidratación, la impregnación y la inclusión de las muestras, así como la preparación de cortes y la tinción y montaje de los portas.

Los animales vivos moribundos o que acaben de morir (apenas unos minutos antes) proporcionan las condiciones óptimas en las que obtener tejidos. Las muestras congeladas deben evitarse por la lisis tisular que tiene lugar durante el ciclo de congelación-descongelación. En el caso de que tenga lugar un desfase entre la muerte del animal y la obtención de la muestra, se recomienda guardar los animales sobre hielo o en una nevera. Debe tomarse un corte estándar de la glándula digestiva, que incluya las branquias, el manto y los palpos en la medida de lo posible. Como alternativa, en el caso de muestras grandes, deben obtenerse varios cortes que incluyan todos los tejidos importantes.

2.4.1. Fijación de tejidos

La función del fijador es mantener la morfología de los tejidos tan similar a la morfología *in-vivo* como sea posible e impedir la necrosis que en condiciones naturales tendría lugar tras obtener la muestra. En el caso de muestras grandes, los fijadores recomendados para el estudio de moluscos marinos son la solución de Davidson y la solución de Carson. En el caso de muestras más pequeñas, pueden utilizarse fijadores a base de glutaraldehído, que son compatibles con el uso del microscopio electrónico. La proporción de volumen de fijador respecto a volumen de tejido debe ser de al menos 10:1 para garantizar una buena fijación. Pueden utilizarse conservantes que no contengan formaldehído, siguiendo las instrucciones del fabricante. Estos deben utilizarse con cuidado hasta que el usuario quede satisfecho con los resultados. Debe ser el investigador quien valore si el sustituto del formaldehído puede utilizarse de la misma forma que el formaldehído.

Solución de Davidson:

Agua marina	1200 ml
Alcohol al 95%	1200 ml
Formaldehído al 35–40% ¹	800 ml
Glicerol	400 ml
Ácido acético glacial	10% (se añade extemporáneamente)

Solución de Carson:

NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	23,8 g
NaOH	5,2 g
Agua destilada	900 ml
Formaldehído 1 al 40%	100 ml
Se ajusta el pH a 7,2–7,4	

**Solución madre 1G4F (puede guardarse a 4°C durante un máximo de 3 meses):*

Solución de formalina tamponada al 37–40% **	120 ml
Glutaraldehído al 50%	20 ml
Agua de grifo	360 ml

*** Solución de formalina tamponada:*

Formaldehído al 37–40%	1 litro
Fosfato de disodio (Na ₂ HPO ₄)	15 g
Hidróxido de sodio (NaOH)	0,06 g
Rojo fenol (indicador de pH)	0,03 g

Solución de trabajo (debe prepararse justo antes de ser utilizada):

Agua marina ambiental filtrada	500 ml
Solución madre 1G4Fn*	500 ml

No existe ningún fijador universal, de modo que la elección debe basarse en el último uso de material fijado así como en aspectos prácticos del uso de fijadores (como el precio, la disponibilidad de los componentes, etc.). La solución de Davidson es una excelente elección para conservar la estructura de los tejidos. Además, los cortes de tejido fijados con solución de Davidson pueden teñirse después mediante distintos métodos histoquímicos, así como por hibridación *in-situ* con sondas de ADN. Si va a utilizarse esta última prueba, debe evitarse una excesiva fijación (de más de 24-48 horas). La solución

1 Una solución acuosa saturada al 37-39% de gas formaldehído.

de Carson puede no ser tan buena como la solución de Davidson para el análisis histológico. No obstante, permite una buena conservación de la ultraestructura y puede utilizarse para conservar muestras para el posterior estudio por microscopía electrónica. 1G4F también aporta la flexibilidad de conservar tejidos tanto para la histología como para la microscopía electrónica, pero el espesor óptimo de los tejidos es de 2-3 mm. 1G4F produce preparaciones histológicas de gran calidad y buenas micrografías electrónicas. Dado que la microscopía electrónica puede ser una útil ayuda en el diagnóstico o confirmación de infecciones de los moluscos, puede plantearse la fijación de algunas muestras (sobre todo muestras más pequeñas) utilizando glutaraldehído, como se ha descrito en el apartado 2.5.1 de este capítulo, ya que proporcionará las micrografías electrónicas de máxima calidad.

Por otra parte, el material fijado en solución de Carson, en el que se hayan observado niveles suficientes de los agentes patógenos buscados o de anomalías, puede volver a fijarse en glutaraldehído. Se recomienda que parte del molusco se fije en solución de Davidson y parte en solución de Carson o en 1G4F para estudios posteriores. Esto debe llevarse a cabo para asegurar la fijación de todos los tejidos/órganos en ambos fijadores. Si no se dispone de ninguno, es suficiente con formalina al 10% tamponada con agua de mar filtrada. Dentro de cada país, la industria del cultivo de moluscos debe ponerse de acuerdo respecto a la forma más eficaz de garantizar una fijación suficiente.

2.4.2. Deshidratación, impregnación e inclusión de las muestras

La inclusión de las muestras en parafina requiere varios pasos, durante los cuales el agua que contienen los tejidos se vaya sustituyendo progresivamente, primero por alcohol, y a continuación por xileno o una solución de aclarado equivalente menos tóxica, y finalmente por parafina.

Una vez fijadas las muestras en solución de Davidson, Carson o 1G4F, se transfieren a alcoholes de graduaciones progresivas (70-95% [v/v]) antes de la deshidratación final en etanol absoluto. El alcohol que contienen los tejidos a continuación se elimina sumergiéndolo en xileno. Después, los tejidos se impregnan con parafina, que es soluble en xileno, a 60°C. Todos estos pasos se pueden llevar a cabo automáticamente utilizando una máquina de procesamiento de tejidos. En el caso de que el procesamiento se retrase, los tejidos conservados pueden guardarse en etanol al 70%.

Se producen bloques dejando los tejidos refrigerados en moldes llenos de parafina sobre una mesa de refrigeración; la refrigeración y humectación son fundamentales para la realización de cortes.

2.4.3. Preparación de los cortes

Una vez los bloques se han enfriado sobre una placa fría, que permite que la parafina se solidifique, se realizan cortes de unos 2-5 µm mediante un microtomo. Los cortes se extienden sobre portas de histología, se drenan y se secan durante un máximo de 1 hora a 40-42°C, o durante toda la noche a temperatura ambiente. El secado de las muestras permite eliminar el exceso de humedad y, por tanto, que los cortes se adhieran a los portas.

2.4.4. Tinción y montaje de los portas

Antes de pasar a la tinción, debe eliminarse la parafina de los cortes sumergiéndolos en xileno o una solución de aclarado equivalente menos tóxica durante 10-20 minutos. Esto se repite una vez y a continuación se elimina el disolvente por inmersión en dos baños sucesivos de etanol absoluto durante periodos de 10 minutos cada uno, y a continuación se rehidratan en una serie de baños de alcohol de graduaciones descendientes (por ejemplo, al 95%, 70%, 50%, 30%, 10 minutos en cada uno) con una inmersión final en un baño de agua de grifo durante 10 minutos. Pueden llevarse a cabo distintas técnicas de tinción topográficas o histoquímicas.

Cuando se utiliza la tinción de la hematoxilina-eosina (H/E) (hematoxilina o equivalente), las estructuras nucleares y basófilas se tiñen de un color azul a púrpura oscuro, el retículo endoplásmico se tiñe de azul, y el citoplasma adquiere un color gris. El colorante ácido eosina tiñe las otras estructuras de rosa. Esta técnica de tinción es sencilla y reproducible, y, aunque permite poca diferenciación de estructuras celulares, sí permite detectar cualquier anomalía en la estructura tisular y celular. Pueden aplicarse otras técnicas para demostrar estructuras o características concretas, según sea necesario (por ejemplo, tricolor en el caso del tejido conjuntivo y de los gránulos citoplásmicos).

2.5. Métodos de microscopía electrónica de transmisión

Dado que la microscopía electrónica de transmisión se utiliza con mucha frecuencia para la identificación confirmativa de agentes patógenos en procedimientos de diagnóstico de enfermedades de los moluscos, en este capítulo se aporta una orientación técnica detallada.

La fijación para el posterior examen mediante microscopía electrónica debe llevarse a cabo de inmediato tras la muerte del animal, antes de la fijación para la histología. Solo las muestras que se obtienen rápidamente de animales vivos tendrán alguna utilidad. La preparación de muestras para microscopía electrónica conlleva los siguientes pasos: fijación de tejidos, descalcificación de las muestras (cuando sea necesario), deshidratación, impregnación e inclusión de las muestras, preparación de los cortes y aplicación de tinción de contraste a los mismos.

2.5.1. Fijación de tejidos

En el caso de los tejidos que tienen que examinarse mediante microscopía electrónica, es importante que la fijación se realice correctamente, con el fin de causar los menores daños posibles a la ultraestructura. Las muestras se cortan de tal modo que sus dimensiones no superen los 1-2 mm. Este pequeño tamaño permite a las distintas soluciones penetrar rápidamente hacia el interior de la muestra.

La fijación de las muestras se lleva a cabo directamente en glutaraldehído al 3% durante 1-4 horas. Las muestras se lavan en tampón tres veces, a continuación se fijan en ácido ósmico al 1% (OsO_4 acuoso) y se lavan dos veces más en tampón. Distintas formulaciones de fijador de glutaraldehído y tapones funcionan igual de bien.

Para causar los menores daños posibles a la ultraestructura, las muestras se tratan con soluciones que tengan una osmolaridad cercana a la de los tejidos. Así, los tejidos de molusco se tratan con soluciones con una osmolaridad de aproximadamente 1000 mOsm. La osmolaridad de las soluciones se ajusta con sales de mar artificiales o NaCl. Dado que los tejidos de los moluscos son casi iso-osmóticos respecto al agua de mar, es posible preparar la solución de glutaraldehído con agua de mar filtrada por un tamaño de poro de 0,22 μm , y utilizar el agua de mar filtrada para posteriores lavados.

Cacodilato de sodio	0.4 M: 8,6 g en 100 ml de agua destilada
---------------------	--

Cloruro de sodio	al 10% en agua destilada
------------------	--------------------------

Tampón cacodilato, pH 7,4:

1000 mOsm

Cacodilato de sodio	50 ml de una solución madre 0,4 M
---------------------	-----------------------------------

NaCl	20 ml de una solución madre al 10%
------	------------------------------------

Agua destilada	30 ml
----------------	-------

Se ajusta el pH a 7,4

Glutaraldehído al 3%:

1000 mOsm

Glutaraldehído al 25%	2,5 ml
-----------------------	--------

Cacodilato de sodio 0,4 M	5 ml
---------------------------	------

NaCl al 10%	3,5 ml
-------------	--------

Agua destilada	9 ml
----------------	------

Ácido ósmico al 1%:

1000 mOsm

Ácido ósmico al 4%	1 volumen
--------------------	-----------

Cacodilato de sodio 0,4 M	1 volumen
---------------------------	-----------

NaCl	1 volumen de solución madre al 10%
------	------------------------------------

Agua destilada	1 volumen
----------------	-----------

EDTA al 5%:

EDTA de disodio	5 g
-----------------	-----

Tampón cacodilato	100 ml
-------------------	--------

El EDTA se disuelve cuando el pH es superior a 8. Cuando la solución se vuelve transparente se ajusta el pH a 7,4 añadiendo HCl concentrado.

Si las muestras se han fijado previamente y guardado en solución de Carson, deben lavarse varias veces en un baño de tampón antes de la fijación con glutaraldehído al 3%. Los tejidos conservados en 1G4F pueden post-fijarse directamente en solución de ácido ósmico al 1%.

2.5.2. Deshidratación, impregnación e inclusión de las muestras

Las muestras se deshidratan en sucesivos baños de etanol: una vez en etanol al 70%, dos veces en etanol al 95% y tres veces en etanol absoluto. La deshidratación termina con dos baños de óxido de propileno, que permite la posterior impregnación con Epon u otra resina.

Las muestras se impregnan progresivamente. Tras un primer baño en una mezcla de óxido de polipropileno-Epon (50/50), las muestras se colocan en un baño de Epon. Cuando más dure la incubación, mejor se impregnarán los tejidos.

La inclusión se lleva a cabo colocando las muestras en moldes llenos de resina Epon. En cada bloque debe haber una etiqueta identificativa de la muestra, y a continuación los bloques deben ponerse a 60°C (la temperatura a la cual polimeriza la resina Epon) durante 48 horas.

2.5.3. Preparación de los cortes y aplicación de la tinción de contraste

Se cortan los bloques en trozos del tamaño adecuado con una hoja de afeitar y a continuación se realizan los cortes mediante un ultramicrotomo. Se realizan cortes semi-finos (0,5-1 µm) y se colocan sobre portas de vidrio. Estos se utilizarán para controlar la calidad de las muestras mediante microscopía óptica y para hallar las zonas de interés en el corte.

Los cortes semi-finos se tiñen a 90-100°C con una solución de azul de toluidina al 1%. Tras secarlos, los cortes se montan bajo cubreobjetos con una gota de resina sintética y se observan al microscopio óptico.

Se colocan cortes ultrafinos de 80-100 nm de espesor sobre rejillas de malla de cobre para el análisis mediante microscopía electrónica. Se utiliza acetato de uranilo y citrato de plomo para aplicar la tinción de contraste de los cortes ultrafinos.

2.6. Métodos moleculares

Las técnicas moleculares normalmente ofrecen una ventaja en cuanto a sensibilidad que a menudo es contrarrestada por problemas técnicos. La PCR es especialmente sensible a las condiciones en las que se ejecuta, y puede dar falsos positivos y falsos negativos. Siempre que se utilicen técnicas moleculares, deben llevarse a cabo con cautela y con especial atención a la inclusión de controles positivos y negativos adecuados, con el fin de superar la posible falta de robustez, así como para mantener una suficiente exactitud. Es importante reconocer que la PCR y las pruebas basadas en la secuencia solo detectan ácido nucleico patógeno y no indican la presencia de un parásito vivo ni de infección o enfermedad. No obstante, el uso de una prueba de PCR basada en el ARN puede indicar la presencia de un parásito vivo, pero aun así no confirmará la presencia de infección o enfermedad.

La PCR, la PCR-RFLP (análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción), la secuenciación, la hibridación *in situ* y la inmunohistoquímica cada vez se utilizan más en la identificación confirmativa de agentes patógenos. Para estas técnicas, deben prepararse las muestras de tal modo que se conserve el ADN del agente patógeno. De igual forma, las muestras destinadas al análisis con métodos basados en anticuerpos deben conservarse para que retengan los puntos antigénicos reactivos con los que vayan a reaccionar los anticuerpos utilizados.

2.6.1. Preparación de la muestra

Las muestras escogidas para las pruebas diagnósticas basadas en el ADN o en anticuerpos deben manipularse y empaquetarse con el máximo cuidado para minimizar la posibilidad de contaminación cruzada entre las muestras o la degradación antes de que se lleve a cabo la prueba. Para prevenir la contaminación, deben utilizarse recipientes nuevos (bolsas o frascos de plástico para muestras). Cada recipiente o paquete que contenga un conjunto de muestras debe incluir una etiqueta impermeable con los datos correspondientes. Debe evitarse el uso de los clásicos rotuladores permanentes (como los Sharies), puesto que su tinta se disuelve en etanol, un disolvente que se utiliza en los métodos moleculares y puede dar lugar a una pérdida de la etiqueta. Solo puede utilizarse lápiz o bolígrafo para etiquetar viales o botes.

Algunos métodos adecuados para la conservación y transporte de muestras tomadas para las pruebas moleculares o basadas en anticuerpos son los siguientes:

- *Ejemplares vivos helados o refrigerados:* en el caso de ejemplares que puedan ser transportados rápidamente al laboratorio para ser analizados en un plazo de 24 horas, se empaquetan las muestras en bolsas para muestra envueltas de una cantidad suficiente de hielo húmedo alrededor de las muestras embolsadas, en una caja aislada, y se envían al laboratorio.

- *Ejemplares enteros congelados*: se escogen ejemplares vivos según el objetivo del estudio, se congelan rápidamente en el campo utilizando hielo seco triturado, o se congelan en un laboratorio de campo mediante un congelador mecánico a -20°C o a temperaturas inferiores. Se prepara e introduce la etiqueta en el recipiente con las muestras, se empaquetan las muestras con una cantidad suficiente de hielo seco en una caja aislada, y se envían al laboratorio.
- *Muestras conservadas en alcohol*: en zonas donde el almacenaje y envío de muestras congeladas es problemático, puede utilizarse etanol no desnaturalizado al 90-100% (es decir, etanol libre de metanol) para conservar, guardar y transportar ciertos tipos de muestras. Se empaquetan para ser enviadas según los métodos descritos arriba.
- *Tejidos fijados para la hibridación in situ y la inmunohistoquímica*: para este fin, serán suficientes los métodos clásicos de conservación de tejidos. La solución de Davidson suele ser una buena elección para el posterior uso de sondas moleculares. Para el ADN, en concreto, debe evitarse una fijación excesiva (de más de 24-48 horas).

2.6.2. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN, se añade proteinasa K (100 µgml⁻¹) a tejidos homogeneizados en unos 9 volúmenes de tampón de extracción (NaCl [100 mM], ácido etilendiaminotetraacético [EDTA, 25 mM], pH 8, dodecilsulfato de sodio [SDS, al 0,5%]). Tras una incubación durante toda la noche a 50°C, se extrae el ADN utilizando un protocolo estándar de fenol/cloroformo, y se precipita con etanol.

Teniendo en cuenta las presiones de tiempo y los riesgos para el personal de laboratorio, los kits comerciales puede constituir alternativas técnicas satisfactorias. Antes de ser utilizados sistemáticamente en laboratorios de diagnóstico, los kits comerciales deben validarse por comparación con un protocolo estándar de fenol/cloroformo.

Para la extracción de ARN, se utiliza 1 mm de reactivo Tri (Trizol) por cada 50 mg de tejido, 5–10 × 10⁶ células o 10 cm² de placa de cultivo. Se homogeneizan las muestras y a continuación se dejan reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos para permitir la disociación de complejos de nucleoproteínas. Se añaden 200 µl de cloroformo, se agitan enérgicamente y se dejan reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugan a 12.000 *g* durante 15 minutos a 4°C. Se transfiere la fase acuosa a un tubo limpio y se precipita el ARN de la fase acuosa mediante mezclado suave con 0,5 ml de isopropanol por cada mililitro de reactivo Tri. Se guardan las muestras a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugan a 12.000 *g* durante 8 minutos a 4°C. Se retira el sobrenadante y se lava el sedimento de ARN con etanol al 75% y una posterior centrifugación a 7.500 *g* durante 5 minutos a 4°C. El ARN se puede solubilizar en agua u otra solución adecuada.

2.6.3. Preparación de portas para la hibridación *in-situ*

Para la hibridación *in situ*, se fijan moluscos en fijador de Davidson durante unas 24 horas y a continuación se incluyen en parafina, según los métodos descritos arriba para la histología. Se realizan cortes de 5 µm de espesor y se colocan sobre portas recubiertos de aminoalquilsilano, que a continuación se secan durante toda la noche a temperatura ambiente o en un horno a 40°C. Se desparafinan los cortes mediante inmersión en xileno durante 10 minutos. Este paso se repite una vez y a continuación el disolvente se elimina por inmersión en dos baños sucesivos de metanol absoluto durante 10 minutos cada uno. Después, se rehidratan los cortes por inmersión en una serie de etanol de graduación descendiente. El protocolo puede requerir un paso de permeabilización de membrana que permita el acceso al ADN diana. Para este fin, se tratan los cortes con proteinasa K (100 µgml⁻¹) en tampón TE (Tris [50 mM], EDTA [10 mM]), a 37°C durante 10–30 minutos.

BIBLIOGRAFÍA CLAVE PARA LECTURA ADICIONAL

ALMEIDA M., BERTHE F., THEBAULT A. & DINIS M.T. (1999). Whole clam culture as a quantitative diagnostic procedure of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsa) in clams *Ruditapes decussatus*. *Aquaculture*, **177**, 325–332.

ANDERSON T.J., MCCAUL T.F., BOULO V., ROBLEDO J.A.F. & LESTER R.J.G. (1994). Light and electron immunohistochemical assays on paramyxean parasites. *Aquatic Living Resources*, **7**, 47–52.

ANDREE K.B., FRIEDMAN C.S., MOORE J.D. & HEDRICK R.P. (2000). A polymerase chain reaction for detection of genomic DNA of a Rickettsiales-like prokaryote associated with Withering Syndrome in Black Abalone (*Haliotis cracherodii*). *J. Shellfish Res.*, **19**, 213–218.

AZEVEDO C., CORRAL L. & CACHOLA R. (1990). Fine structure of zoosporulation in *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa: Perkinsea). *Parasitology*, **100**, 351–358.

BALSEIRO P., ARANGUREN R., GESTAL C., NOVOA B. & FIGUERAS A. (2006). *Candidatus Xenohaliotis californiensis* and *Haplosporidium montforti* associated with mortalities of abalone *Haliotis tuberculata* cultured in Europe. *Aquaculture*, **258**, 63–72.

BERTHE F.C.J., BURRESON E. & HINE M. (1999). Use of molecular tools for mollusc disease diagnosis. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **19**(6), 277–278.

BERTHE F.C.J., LE ROUX F., ADLARD R.D. & FIGUERAS A.J. (2004). Marteiliosis of molluscs: a review. *Aquatic Living Resources*, **17**(4), 433–448.

BONDAD-REANTASO M.G., MCGLADDERY S.E., EAST I. & SUBASINGHE R.P. (2001). Asian Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases. *FAO Fisheries Technical Paper*, No. 402, supplement 2. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy, 240 pp.

BOULO V., MIALHE E., ROGIER H., PAOLUCCI F. & GRIZEL H. (1989). Immunodiagnosis of *Bonamia ostreae* (Ascomycota) infection of *Ostrea edulis* L. and subcellular identification of epitopes by monoclonal antibodies. *J. Fish Dis.*, **12**, 257–262.

BOWER S.M., MCGLADDERY S.E. & PRICE I.M. (1994). Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. *Ann. Rev. Fish Dis.*, **4**, 1–199.

BURRESON E.M. & FORD S.E. (2004). A review of recent information on the Haplosporidia, with special reference to *Haplosporidium nelsoni* (MSX disease). *Aquatic Living Resources*, **17**(4), 499–517.

BUSHEK D., FORD S.E. & ALLEN SK (1994). Evaluation of methods using Ray's fluid thioglycollate medium for diagnosis of *Perkinsus marinus* infections in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Ann. Rev. Fish. Dis.*, **4**, 201–217.

CARNEGIE R.B., BARBER B.J., CULLOTY S.C., FIGUERAS A.J. & DISTEL D.L. (2000). Development of a PCR assay for detection of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* and support for its inclusion in the Haplosporidia. *Dis. Aquat. Org.*, **42**, 199–206.

CARNEGIE R.B. & COCHENNEC-LAUREAU N. (2004). Microcell parasites of oysters: recent insights and future trends. *Aquatic Living Resources*, **17**(4), 519–528.

CHANG P.H., KUO S.T., LAI S.H., YANG H.S., TING Y.Y., HSU C.L. & CHEN H.C. (2005). Herpes-like virus infection causing mortality of cultured abalone *Haliotis diversicolor supertexta* in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.*, **65**, 23–27.

COCHENNEC N., LE ROUX F., BERTHE F. & GERARD A. (2000). Detection of *Bonamia ostreae* based on small subunit ribosomal probe. *J. Invertebr. Pathol.*, **76**, 26–32.

CORBEIL S., COLLING A., WILLIAMS L.M., WONG F.Y.K., SAVIN K., WARNER S., MURDOCH B., COGAN N.O.I., SAWBRIDGE T.I., FEGAN M., MOHAMMAD I., SUNARTO A., HANDLINGER J., PYECROFT S., DOUGLAS M., CHANG P.H. & CRANE M.ST.J. (2010). Development and validation of a TaqMan® PCR assay for the Australian abalone herpes-like virus. *Dis. Aquat. Org.*, **92**, 1–10.

CRANFIELD H.J., DUNN A., DOONAN I.J. & MICHAEL K.P. (2005). *Bonamia exitiosa* epizootic in *Ostrea chilensis* from Foveaux Strait, southern New Zealand between 1986 and 1992. *ICES J. Mar. Sci.*, **62**(1), 3–13.

DAVISON A.J., TRUS B.L., CHENG N., STEVEN A.C., WATSON M.S., CUNNINGHAM C., LE DEUFF R.M. & RENAULT T. (2005). A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *J. Gen. Virol.*, **86**, 41–53.

DIGGLES B.K., COCHENNEC-LAUREAU N. & HINE P.M. (2003). Comparison of diagnostic techniques for *Bonamia exitiosa* from flat oysters *Ostrea chilensis* in New Zealand. *Aquaculture*, **220**, 145–156.

DINAMANI P., HINE P.M. & JONES J.B. (1987). Occurrence and characteristics of the haemocyte parasite *Bonamia* sp. in the New Zealand dredge oyster *Tiostrea lutaria*. *Dis. Aquat. Org.*, **3**, 37–44.

DOUGLAS M., CHANG P.H. & CRANE M.ST.J. (2010). Development and validation of a TaqMan® PCR assay for the Australian abalone herpes-like virus. *Dis. Aquat. Org.*, **92**, 1–10.

DUNGAN C.F. & ROBERSON B.S. (1993). Binding specificities of mono- and polyclonal antibodies to the protozoan oyster pathogen *Perkinsusmarinus*. *Dis. Aquat. Org.*, **15**, 9–22.

ELSTON R.A. (1999). Health Management, Development and Histology of Seed Oysters. World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana, USA, 110 pp.

FARLEY C.A., WOLF P.H. & ELSTON R.A. (1988). A long-term study of 'microcell' disease in oysters with a description of new genus *Mikrocytos* (g.n.), and two new species, *Mikrocytosmackini* (sp.n.) and *Mikrocytosroughleyi* (sp. n.). *Fish. Bull.*, **86**, 581–593.

FONG D., RODRIGUEZ R., KOO K., SUN J., SOGIN M.L., BUSHEK D., LITTLEWOOD D.T.J. & FORD S.E. (1993). Small subunit ribosomal RNA gene sequence of the oyster parasite *Perkinsusmarinus*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, **2**, 346–350.

FORD S.E. (1992). Avoiding the transmission of disease in commercial culture of molluscs, with special reference to *Perkinsusmarinus* (Dermo) and *Haplosporidiumnelsoni* (MSX). *J. Shellfish Res.*, **11**, 539–546.

FRIEDMAN C.S., ANDREE K.B., BEAUCHAMP K.A., MOORE J.D., ROBBINS T.T., SHIELDS J.D. & HEDRICK R.P. (2000). "*CandidatusXenohaliothscaliforniensis*" a newly described pathogen of abalone, *Haliotis* spp., along the west coast of North America. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**, 847–855.

FRIEDMAN C.S., BIGGS W., SHIELDS J.D. & HEDRICK R.P. (2002). Transmission of withering syndrome in black abalone, *Haliotis cracherodii* Leach. *J. Shellfish Res.*, **21** (2), 817–824.

GALTSOFF P.S. (1964). The American oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. *Fishery Bull.*, **64**, 480 pp.

GRIZEL H., COMPS M., BONAMI J.-R., COUSSERANS F., DUTHOIT J.L. & LE PENNEC M.A. (1974). Recherche sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* Linné. Science et Pêche. Bull. Inst. Pêches marit., **240**, 7–30.

GRIZEL H., MIALHE E., CHAGOT D., BOULO V. & BACHERE E. (1988). Bonamiasis: a model study of diseases in marine molluscs. In: Disease Processes in Marine Bivalve Molluscs, Fisher W.S., ed. American Fisheries Society Special Publication **18**, 1–4.

HERVIO D., BOWER S.M. & MEYER G.R. (1996). Detection, isolation, and experimental transmission of *Mikrocytosmackini*, a microcell parasite of Pacific oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg). *J. Invertebr. Pathol.*, **67**, 72–79.

HINE P.M., BOWER S.M., MEYER G.R., COCHENNEC-LAUREAU N. & BERTHE F.C.J. (2001). The ultrastructure of *Mikrocytosmackini*, the cause of Denman Island disease in oysters *Crassostrea* spp. and *Ostrea* spp. in British Columbia, Canada. *Dis. Aquat. Org.*, **45**, 215–227.

HINE P.M. & THORNE T. (2000). A survey of some parasites and diseases of several species of bivalve mollusc in northern Western Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **40**, 67–78.

HOOPER C., HARDY-SMITH P. & HANDLINGER J. (2007). Ganglioneuritis causing high mortalities in farmed Australian abalone (*Haliotis laevis* and *Haliotis rubra*). *Aus. Vet. J.*, **85**, 188–193.

HOWARD D.W., LEWIS E.J., KELLER J. & SMITH C.S. (2004). Histological techniques for marine bivalve molluscs and crustaceans. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 5, 218 pp.

KLEEMAN S.N., LE ROUX F., BERTHE F. & ADLARD R.D. (2002). Specificity of PCR and *in situ* hybridization assays designed for detection of *Marteiliasydneyi* and *M. refringens*. *Parasitology*, **125**, 131–141.

KOTOB S., MCLAUGHLIN S.M., VAN BERKUM P. & FAISAL M. (1999). Discrimination between two *Perkinsus* spp. isolated from the softshell clam, *Mya arenaria*, by sequence analysis of two internal transcribed spacer regions and the 5.8S ribosomal RNA gene. *Parasitology*, **119**, 363–368.

LE DEUFF R.-M. & RENAULT T. (1999). Purification and partial genome characterization of a herpes-like virus infecting the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Gen. Virol.*, **80**, 1317–1322.

LE ROUX F., AUDEMARD C., BARNAUD A. & BERTHE F. (1999). DNA probes as potential tools for the detection of *Marteiliarefringens*. *Mar. Biotechnol.*, **1**, 588–597.

- LE ROUX F., LORENZO G., PEYRET P., AUDEMARD C., FIGUERAS A., VIVARES C., GOUY M. & BERTHE F. (2001). Molecular evidence for the existence of two species of *Marteilia* in Europe. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **48**, 449–454.
- LESTER R.J.G. & DAVIS G.H.G. (1981). A new *Perkinsus* species (Apicomplexa, Perkinsea) from the abalone *Haliotis ruber*. *J. Invertebr. Pathol.*, **37**, 181–187.
- LONGSHAW M., FEIST S.W., MATTHEWS R.A. & FIGUERAS A. (2001). Ultrastructural characterization of *Marteilia* species (Paramyxea) from *Ostrea edulis*, *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis* in Europe. *Dis. Aquat. Org.*, **44**, 137–142.
- MCDOWELL E. & TRUMP B.F. (1976). Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **100**, 405–414.
- MIALHE E., BACHERE E., BOULO V., CADORET J.P., ROUSSEAU C., CEDENO V., SARAIVA E., CARRERA L., CALDERON J. & COLWELL R.R. (1995). Future of biotechnology-based control of disease in marine invertebrates. *Molec. Mar. Biol. Biotechnol.*, **4**, 275–283.
- MURRELL A., KLEEMAN S.N., BARKER S.C. & LESTER R.J.G. (2002). Synonymy of *Perkinsus solseni* Lester & Davis, 1981 and *P. atlanticus* Azevedo, 1989 and an update on the phylogenetic position of the genus *Perkinsus*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **22**, 258–265.
- OSSIANDER F.J. & WEDEMEYER G. (1973). Computer program for sample size required to determine disease incidence in fish populations. *J. Fish. Res. Board Can.*, **30**, 1383–1384.
- PÉPIN J. F., RIOU A. & RENAULT T. (2008). Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR. *J. Virol. Methods*, **149**, 269–276.
- RAY S.M. (1966). A review of the culture method for detecting *Dermocystidium marinum* with suggested modifications. *Proc. Natl Shellfish Assoc.*, **54**, 55–69.
- REECE K., SIDDALL M.E., BURRESON E.M. & GRAVES J.E. (1997). Phylogenetic analysis of *Perkinsus* based on actin gene sequences. *J. Parasitol.*, **83**, 417–423.
- RENAULT T., LE DEUFF R.-M., COCHENNEC N. & MAFFART P. (1994). Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France – comparative study. *Revue de Médecine Vétérinaire*, **145**, 735–742.
- RENAULT T., LE DEUFF R.-M., LIPART C. & DELSERT C. (2000). Development of a PCR procedure for the detection of a herpes-like virus infecting oysters in France. *J. Virol. Methods*, **88**, 41–50.
- RODRIGUEZ F. & NAVAS J.L. (1995). A comparison of gill and haemolymph assays for the thioglycollate diagnosis of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) in clams, *Ruditapes decussatus* (L.) and *Ruditapes philippinarum* (Adam & Reeve). *Aquaculture*, **132**, 145–152.
- SAVINK W., COCKS B.G., WONG F., SAWBRIDGE T., COGAN N., SAVAGE D. & WARNER S. (2010). A neurotropic herpesvirus infecting the gastropod, abalone, shares ancestry with oyster herpesvirus and a herpesvirus associated with the amphioxus genome. *Viol. J.*, **7**, 308. <http://www.virologyj.com/content/7/1/308>.
- SEGARRA A., PEPIN J.F., ARZUL I., MORGÀ B., FAURY N. & RENAULT T. (2010). Detection and description of a particular *Ostreid herpesvirus 1* genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Res.*, **153**, 92–99.
- STOKES N.A. & BURRESON E.M. (1995). A sensitive and specific DNA probe for the oyster pathogen *Haplosporidium nelsoni*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **42**, 350–357.
- TAN J., LANCASTER M., HYATT A., VAN DRIEL R., WONG F. & WARNER S. (2008). Purification of a herpes-like virus from abalone (*Haliotis* spp.) with ganglioneuritis and detection by transmission electron microscopy. *J. Virol. Methods*, **149**, 338–341.
- THOESON J.C. (1994). Suggested Procedures for the Detection and Identification of Certain Finfish and Shellfish Pathogens, Fifth Edition. *Bluebook*, American Fisheries Society, Bethesda, USA.
- VILLALBA A., REECE K.S., ORDÁS M.C., CASAS S.M. & FIGUERAS A. J. (2004). Perkinsosis in molluscs. *Aquatic Living Resources*, **17**(4), 411–432.

WALKER P. & SUBASINGHE R.P. (2000). DNA-based Molecular Diagnostic Techniques. Research needs for standardization and validation of the detection of aquatic animal pathogens and diseases. *FAO Fisheries Technical Paper*, n°395, 93 pp.

YARNALL H.A., REECE K.S., STOKES N.A. & BURRESON E.M. (2000). A quantitative competitive polymerase chain reaction assay for the oyster pathogen *Perkinsus marinus*. *J. Parasitol.*, **86**, 827–837.

*

* *

HERPESVIROSIS DEL ABALÓN

1. Ámbito de aplicación

A efectos de este capítulo, la ganglioneuritis viral del abulón (GVA) se considera una infección por el herpesvirus del abulón (HVAb).

2. Información sobre la enfermedad

2.1. Factores del agente

El herpesvirus del abulón (HVAb) es el agente etiológico de la ganglioneuritis viral del abulón (GVA), una enfermedad contagiosa de especies de abulón de Australia (Ellard *et al.*, 2009; Hooper *et al.*, 2007) y posiblemente de especies de otros países (Chang *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2004). La comparación entre las secuencias de nucleótidos del HVAb VIC y del Herpesvirus de los ostreidos tipo 1 (Davidson *et al.*, 2009; Le Deuff & Renault, 1999) pertenecientes a regiones codificantes comunes ha identificado similitudes que oscilan entre el 19% y el 53%, lo cual indica que estos virus presentan un alto grado de similitud de la secuencia (Savin *et al.*, 2010), y se ha asignado provisionalmente a los Malacoherpesviridae como segundo miembro.

Al microscopio electrónico de transmisión, se observa que las partículas del HVAb purificadas (Tan *et al.*, 2008) presentan envoltura y son icosaédricas, con centros electrónicos densos y 100-110 nm de diámetro. La localización intranuclear de las partículas de HVAb, su tamaño y su ultraestructura son característicos de los miembros de la familia Herpesviridae. Mediante centrifugación por gradiente isopícnico (en gradientes de densidad de tartarato de potasio y cloruro de cesio) se observó una densidad de flotación de la partícula vírica de 1,17–1,18 g ml⁻¹ (Tan *et al.*, 2008).

2.1.1. El agente patógeno, cepas del agente

Se han notificado herpesvirus asociados a enfermedad en los abulones en Taipei chino y en Australia. La comparación de las secuencias de nucleótidos del HVAb VIC y del HVAb de Taiwán a nivel de tres regiones comunes permitió identificar similitudes del 92,4%, 96,4% y 96,6%, lo cual indica que estos virus presentan un alto grado de similitud de la secuencia. Recientes análisis de la secuencia del genoma han indicado que en Australia se encuentran distintas variantes genotípicas (Cowley *et al.*, 2011). Todavía no se ha determinado si estos genotipos del HVAb presentan o no variaciones en cuanto a fenotipo y virulencia.

2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

En investigación.

2.1.3. Estabilidad del agente

En investigación.

2.1.4. Ciclo de vida

No es aplicable.

2.2. Factores del hospedador

Actualmente, las especies de Australia que se sabe que son susceptibles al GVA son el abulón de labios verdes (*Haliotis laevis*), el abulón de labios negros (*H. rubra*) e híbridos de estas dos especies. No se han documentado signos clínicos compatibles con la GVA en otras especies de moluscos de zonas donde se sospecha que la GVA es enzoótica. En Taipei chino, se ha notificado una ganglioneuritis asociada a una infección viral por un virus afín al herpes y altas mortalidades en la especie de abulón *H. diversicolor supertexta*. Esta enfermedad se notificó solo para *H. diversicolor supertexta*, mientras que ejemplares de abulón japonés (*H. discus*) cohabitantes permanecieron normales (Chang *et al.*, 2005).

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Abulón de labios verdes– *Haliotis laevis*

Abulón de labios negros– *H. rubra*

Híbrido (labios verdes × labios negros) – *H. laevis* × *H. rubra*

Abulón diversicolor o abulón de Taiwán - *H. diversicolor*

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

Todas las edades.

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

No se dispone de datos.

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

La principal lesión histopatológica identificada en abulones afectados por la GVA es una ganglioneuritis: inflamación confinada al tejido neural. Pueden estar afectados los ganglios cerebroideo, pleuropodal y bucal, así como la comisura cerebroidea y nervios periféricos asociados (Hooper *et al.*, 2007).

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

No se dispone de datos.

2.2.6. Vectores

No se dispone de datos.

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

No se dispone de datos.

2.3. Patrón de la enfermedad

Los brotes de GVA en poblaciones australianas de abulón tanto de piscifactoría como salvajes se asocian a la rápida aparición de altas mortalidades (de hasta el 90%) en todas las edades (Corbeil *et al.*, 2010). De forma similar, en Taipei chino, durante la epizootia en abulón de piscifactoría (la temperatura del agua era de entre 16°C y 19°C), tanto abulones adultos como juveniles sufrieron la enfermedad, con mortalidades acumuladas del 70-80%. Se observó que en un estanque podían morir todos los abulones en un plazo de 3 días tras el inicio de los signos clínicos (Chang *et al.*, 2005). Se observó un patrón de enfermedad similar en infecciones experimentales (Chang *et al.*, 2005; Crane *et al.*, 2009).

2.3.1. Mecanismos de transmisión

Se ha demostrado la transmisión horizontal experimentalmente (Chang *et al.*, 2005; Crane *et al.*, 2009) mediante:

1. exposición de abulones sanos a agua que contenía abulones enfermos en el mismo tanque de agua sin contacto directo entre abulones enfermos y sanos;
2. introducción de abulones sanos en agua que previamente había contenido abulones enfermos; e
3. inyección intramuscular de abulones sanos con un homogenado de tejido filtrado procedente de abulones enfermos.

En todos los casos, se observó un 100% de mortalidad con un periodo pre-clínico de 1-2 días tras la exposición, y después empezó la mortalidad hasta alcanzar el 100% en un plazo de 2-5 días tras la infección.

2.3.2. Prevalencia

En Australia, y de forma similar en Taipei chino, se asoció un brote de GVA a un rápido aumento de la mortalidad (de hasta el 90% o más). Los abulones afectados que presentan signos clínicos (por ejemplo, rizado del pie) probablemente mueran en un plazo de 1 día tras la aparición de los mismos. Se observa ganglioneuritis en cortes de tejido neural mediante microscopía óptica y se confirma la presencia del HVAb mediante la reacción en cadena de la polimerasa (qPCR) y/o la hibridación *in situ* (Crane *et al.*,

2009). Utilizando estos métodos ha habido muy pocos falsos positivos ni falsos negativos. La prevalencia exacta de la GVA en abalón salvaje de aguas australianas se desconoce.

2.3.3. Distribución geográfica

Australia (Victoria y Tasmania), y Taipei chino.

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

En epizootias de piscifactorías de Australia la mortalidad acumulada en todos los grupos de edad puede llegar a ser superior al 90%. En pruebas experimentales, puede tener lugar un 100% de mortalidad en un plazo de 5 días tras la exposición. La mayoría de abulones que presentan signos macroscópicos probablemente mueran en un plazo de 1-2 días.

2.3.5. Factores ambientales

En Australia, el primer brote de GVA tuvo lugar en una piscifactoría durante el verano de 2005/2006 y posteriormente pareció propagarse a poblaciones salvajes, que experimentaron mortalidad a lo largo de todo el año siguiente, es decir, durante todas las estaciones. Todas las infecciones experimentales llevadas a cabo hasta hoy se han realizado en el intervalo de temperaturas de entre los 15°C y los 18°C. En Taipei chino, durante la epizootia notificada, la temperatura del agua fue de 16-19°C, y se realizaron infecciones experimentales a 17-20°C. Todavía no se sabe cómo afecta la temperatura a la replicación del virus y a la aparición de la enfermedad. Los posibles efectos de los cambios en otros factores ambientales, como la salinidad o el oxígeno disuelto, se desconocen.

2.4. Control y prevención

En ausencia de tratamientos antivíricos eficaces, se recomienda implementar altos niveles de bioseguridad en el interior de las piscifactorías y en cualquier instalación donde se mantengan animales vivos, así como restricciones a los desplazamientos regionales. Tras un brote en una piscifactoría, la destrucción de la población afectada, la desinfección del agua y el equipo y la aplicación de procedimientos de descanso de la instalación parecen ser eficaces para prevenir la reinfección. Pueden utilizarse abulones centinela para comprobar el estado de las instalaciones previamente infectadas antes de volver a poblarlas.

2.4.1. Vacunación

No se dispone de vacunas.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

No se dispone de datos.

2.4.3. Inmunoestimulación

No se dispone de datos.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

No se dispone de datos.

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

No se dispone de datos.

2.4.6. Agentes bloqueantes

No se dispone de datos.

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

No se dispone de datos.

2.4.8. Prácticas generales de manejo

Hasta ahora, los datos experimentales indican que el HVAb es muy virulento. No se han identificado las prácticas que podrían implementarse para reducir la gravedad de la enfermedad. Por otra parte, es interesante destacar que, contrariamente a lo que ocurre en Victoria, no se ha notificado enfermedad

clínica en poblaciones de abulones salvajes de Tasmania. Los brotes de enfermedad en plantas de procesamiento de Tasmania sugieren que los factores estresantes pueden influir en la expresión de la infección subclínica.

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

En el momento en que se observan los primeros signos de aumento del número de abulones que parecen estar débiles o que se comportan de forma anómala, o cuando se observan apariciones repentinas de mortalidades inexplicadas, deben obtenerse muestras de individuos vivos moribundos. Si no se dispone de abulones moribundos ni que acaben de morir, deben obtenerse muestras de abulones totalmente normales de todas las partes de la piscifactoría, y que representen todos los grupos de edad.

3.2. Conservación de las muestras para su envío

Deben obtenerse muestras para el examen mediante: i) histología, que deberán fijarse en formalina al 10% en agua de mar filtrada; ii) microscopía electrónica (fijadas en glutaraldehído al 2,5% en agua de mar filtrada); iii) PCR (fijadas en conservante para PCR, como etanol al 95%). Si no se dispone de fijadores, las muestras deben mantenerse refrigeradas (sobre hielo) y transportarse al laboratorio en un plazo de 24 horas. Como alternativa, las muestras pueden enviarse congeladas. En cuanto a las muestras congeladas, no son adecuadas para la histología ni la microscopía electrónica pero pueden analizarse mediante PCR.

3.3. Combinación de varias muestras

Deben obtenerse tejidos de abulones moribundos o que acaben de morir, según el grupo de edad y el estanque/piscifactoría/zona geográfica en la que se encuentren. Para poder comparar entre varias pruebas, no se debe trabajar con muestras combinadas.

3.4. Órganos y tejidos de elección

El tejido neural que incluya los ganglios cerebroideo, pleuropodal y bucal.

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

Hasta ahora, no se han detectado lesiones de forma constante en tejidos no neurales.

4. Métodos de diagnóstico

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

En Australia, los brotes de GVA tanto en abalón de piscifactoría como salvaje se han asociado a altas mortalidades (de hasta el 90% en piscifactoría). Clínicamente, el abalón puede presentar uno o más de los siguientes signos: elevación cóncava periférica irregular del pie; hinchazón y protusión de las partes bucales; eversión de la rádula; movimiento muy escaso del músculo del pie; excesiva producción de moco; ausencia de la destacada extensión del pie observada en el reflejo de erguido cuando se invierten abulones sanos dejándolos apoyados sobre el dorso; y reducción de la adherencia podal al sustrato. En Tasmania, abulones afectados por la GVA en plantas de procesamiento presentaron un “pie duro” o tetania, excesiva producción de moco, desovado anómalo e “hinchazón” (Ellard *et al.*, 2009). Estas instalaciones también experimentaron morbilidades y mortalidades muy inferiores a las observadas en piscifactorías o abulones salvajes de Victoria. Se han observado signos similares en una epizootia de enfermedad en abulones de Taipei chino (Chang *et al.*, 2005).

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

La GVA normalmente es una enfermedad aguda, por la cual los abulones mueren en un plazo de 1-2 días tras la aparición de los signos macroscópicos de la misma. Abulones salvajes mantenidos vivos en cautividad en instalaciones de Tasmania han presentado un inicio más lento de los signos clínicos y de la mortalidad. Abulones salvajes capturados en Tasmania han dado positivo a la GVA mediante la qPCR sin presentar signos clínicos manifiestos ni histológicos.

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

Los abulones que se adhieren de forma laxa al sustrato debido a debilidad o a anomalías en el músculo del pie deben escogerse como muestra. Si esta anatomopatología macroscópica está causada por la GVA, es probable que estos animales mueran en un plazo de 1-2 días.

4.2.2. Bioquímica clínica

No se dispone de datos.

4.2.3. Anatomopatología microscópica

Los abulones afectados por GVA presentan inflamación (aumento de la infiltración por hemocitos) y una necrosis que se confina al tejido neural (ganglios cerebroideo, pleuropodal y bucal, ramas del nervio podal y nervios periféricos), según se observa en cortes histológicos de tejido neural teñidos con hematoxilina y eosina y examinados mediante microscopía óptica (Ellard *et al.*, 2009; Hooper *et al.*, 2007).

4.2.4. Preparaciones húmedas

No aplicables.

4.2.5. Frotis

No aplicables.

4.2.6. Cortes fijados

La hibridación *in situ* localiza células infectadas por el HVAb dentro del tejido neural que, en el examen histológico, presenta ganglioneuritis caracterizada por una alteración inflamatoria con aumento de la celularidad, involucrando principalmente hemocitos y células gliales, y necrosis celular en los nervios afectados (Mohammad *et al.*, 2011).

4.2.7. Microscopía electrónica/citopatología

Puede utilizarse microscopía electrónica de transmisión para confirmar la presencia de partículas víricas en ganglios infectados. Las partículas del HVAb son icosaédricas y tienen centros electrónicos densos y un diámetro de 100-110 nm. La ubicación intranuclear de las partículas y su ultraestructura son características de los miembros de la familia Herpesviridae (Tan *et al.*, 2008).

4.3. Métodos de detección e identificación del agente

4.3.1. Métodos directos de detección

Los métodos directos de detección desarrollados hasta ahora para la detección e identificación del HVAb son los microscópicos (examen de cortes de tejido para las lesiones típicas, y microscopía electrónica para la detección de partículas de herpesvirus), la PCR convencional y en tiempo real, y la hibridación *in situ* (ISH).

4.3.1.1. Métodos microscópicos

El tejido neural (ganglios cerebroideo, pleuropodal y bucal, ramas del nervio podal y nervios periféricos), es la diana principal y deben tomarse muestras del mismo y fijarse (empleando formalina al 10%), procesarse con los procedimientos estándar, y teñirse con hematoxilina y eosina para el examen histológico.

Las muestras de tejido (que contengan ganglio pleuropodal) para el examen mediante microscopía electrónica deben fijarse utilizando glutaraldehído al 2,5% (v/v) y paraformaldehído al 2-4% (v/v) en tampón cacodilato 0,1 M y post-fijarse en tetróxido de osmio al 1% (p/v), lavarse en agua de ósmosis inversa (3 x 5 minutos), deshidratarse en una serie de graduación progresiva de etanol de grado analítico (al 70%, durante toda la noche a 4°C; al 95%, 20 minutos; al 100%, 3 x 20 minutos), infiltrarse en resina de Spurr al 100% (durante toda la noche) y a continuación incluirse en resina de Spurr.

4.3.1.1.1. *Preparaciones húmedas*

No es aplicable.

4.3.1.1.2. *Frotis*

No es aplicable.

4.3.1.1.3. *Cortes fijados*

El tejido neural (ganglios cerebroideo, pleuropodal y bucal, ramas del nervio podal y nervios periféricos), es la diana principal y el examen de cortes histológicos pone de manifiesto una ganglioneuritis – aumento de la celularidad involucrando principalmente hemocitos y células gliales, y necrosis celular.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

El HVAb se identifica empleando métodos que detectan específicamente el ácido nucleico del HVAb (PCR, secuenciación, qPCR e hibridación *in situ*).

4.3.1.2.1. *Cultivo celular/medios artificiales*

Hasta ahora, los intentos de cultivar el virus en líneas celulares, tanto de vertebrados como de invertebrados, no han funcionado.

4.3.1.2.2. *Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos*

No es aplicable.

4.3.1.2.3. *Técnicas moleculares*

Deben fijarse muestras de tejido neural para PCR, tanto convencional como en tiempo real, en conservante (etanol de grado reactivo al 80%; glicerol al 19,75%; β -mercaptoetanol al 0,25%) o, como alternativa, en etanol al 95%.

El ganglio pleuropodal y/o las cuerdas nerviosas del pie se separan del tejido fijado y se introducen en tubos de 2,0 ml para la extracción del ADN. Se extrae ácido nucleico de tejidos de abalón infectado por el HVAb y de tejidos de abalón no infectado (unos 20 mg de músculo y tejido neural) empleando un kit comercial, como por ejemplo el mini kit QIAamp DNA (QIAGEN) u otro equivalente, siguiendo las instrucciones del fabricante. El ácido nucleico, fijado a minicolumnas, se eluye y se resuspende en un volumen final de tampón de 100 μ l (~ 100 ng μ l⁻¹), que viene con el kit. En el caso de grandes cantidades de muestras, una opción alternativa es la de digerir los tejidos según el protocolo correspondiente del mini kit QIAamp® DNA (QIAGEN) y extraer el ácido nucleico empleando el kit de aislamiento de ARN MagMAX-96 Viral RNA Isolation Kit (que extrae el total del ácido nucleico de las muestras) y un AB MagMAX Express-96 Magnetic Particle Processor (Applied Biosystems)¹.

qPCR (TaqMan)

Tras la validación de la qPCR dirigida al ORF49 (Corbeil *et al.*, 2010), el descubrimiento de variantes genotípicas en Australia no reconocidas por esta prueba precisó de otras qPCR para el desarrollo basado en regiones más conservadas del genoma vírico. Se han utilizado mucho la qPCR dirigida al ORF66 y la dirigida al ORF77 (véase la Tabla 4.1) en estudios de enfermedades y, aunque no se ha llevado a cabo una validación formal, se han detectado de forma sensible y genérica todas las variantes del HVAb identificadas hasta ahora, incluida la cepa de Taipei chino.

1 La mención de productos comerciales concretos como ejemplos no implica su aprobación por parte de la OIE. Esto es aplicable a todos los productos comerciales mencionados en este *Manual Acuático*.

Tabla 4.1. Secuencias de ácido nucleico de los cebadores y sondas empleados en las qPCR de detección del HVAb

Cebadores ORF66 (300 nM)	Secuencia
HVAb ORF66F1	5'-TCC-CGG-ACA-CCA-GTA-AGA-AC-3'
HVAb ORF66R1	5'-CAA-GGC-TGC-TAT-GCG-TAT-GA-3'
Sonda ORF66 (100 nM)	
HVAb 66Prb1	5'- 6FAM -TGG-CCG-TCG-AGA-TGT-CCA-TG- TAMRA -3'
Cebadores ORF77 (300 nM)	
HVAb ORF77F1	5'-CAA-CCA-CTT-GTT-CGG-GTT-CT-3'
HVAb ORF77R1	5'-CAG-GGT-GAT-TAA-TGC-GGA-GT-3'
Sonda ORF77 (100 nM)	
HVAb 77Prb1	5'- 6FAM -TCC-GTA-CGC-GGG-ATC-TTC-GT- TAMRA -3'
Cebadores del gen del ARNr de 18S (100nM)	
18SF1	5'-CGG-CTA-CCA-CAT-CCA-AGG-AA-3'
18SR1	5'- GCT-GGA-ATT-ACC-GCG-GCT-3'
Sonda del gen del ARNr de 18S (100nM)	5'- 6VIC -TGC-TGG-CAC-CAG-ACT-TGC-CCT-C- TAMRA -3'

En los análisis mediante qPCR de ADN extraído, las reacciones contienen 12,5 µl de mezcla madre TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2×) y 2 µl (~100 ng µl⁻¹) de muestra de ADN extraído, y la mezcla de reacción se completa hasta los 25 µl empleando agua desionizada tras haber añadido cebadores y sondas a las concentraciones correspondientes (véase la Tabla 4.1). Se utilizan las siguientes condiciones de ciclado: 95°C durante 59 segundos seguidos de 45 ciclos de 95°C durante 3 segundos y 60°C durante 30 segundos.

Las qPCR ejecutadas con los cebadores ORF66 y/o ORF77 se multiplexan con qPCR en la que se emplean cebadores y sondas específicos del gen del ARN ribosómico de la subunidad 18S (Applied Biosystems) y se utilizan para validar el procedimiento de extracción del ácido nucleico y la ausencia de inhibidores de la PCR (véase la Tabla 4.1).

Todas las muestras (incluidos controles positivos y negativos) se analizan por duplicado o triplicado. Los resultados de una qPCR TaqMan se expresan en forma de curvas de amplificación características generadas por software. Las curvas de amplificación de los controles positivo y negativo (sin molde) deben compararse con la muestra problema. Se considerará que una muestra se encuentra por encima del nivel analítico de fondo cuando el cambio en la señal de fluorescencia (ΔR_n) en los colorantes FAM o VIC, respecto a la de ROX (tinción de referencia interna) supere el valor umbral que está fijado en el extremo superior del intervalo lineal de los puntos de amplificación (normalmente 0,1, pero puede depender de distintos factores, como el equipamiento, los reactivos o la especie hospedadora). Los resultados de una prueba TaqMan también pueden expresarse, como a menudo ocurre, en forma de valores ciclo umbral (C_T). El ciclo umbral (C_T) se define como el número de ciclo al cual se detecta un aumento de la fluorescencia por encima del valor de fondo estadísticamente significativo.

En el momento en que acaba la qPCR TaqMan, la presencia de ADN del HVAb se pone de manifiesto por la presencia de amplicones específicos, identificados por curvas de amplificación características generadas por software y valores de ciclo umbral (C_T). Los controles sin molde no deben presentar indicios de amplicones específicos.

Si la prueba se considera válida, los resultados de los pocillos de la muestra problema pueden interpretarse aplicando los siguientes criterios:

- Los resultados positivos se definen como la presencia de amplicones específicos expresados como amplificación característica.

- Los resultados negativos se definen como la ausencia de amplicones específicos expresados por una curva de amplificación característica.

Además de un control sin molde, los controles negativos deben incluir ácido nucleico extraído de abulones que se sepa que no están infectados, con el fin de determinar que estos no dan ningún valor de C_T .

Los controles positivos pueden incluir ácido nucleico extraído de abulones que se sepa que están infectados y/o ADN de un plásmido estándar (Corbeil *et al.*, 2010).

PCR convencional

Para la detección de HVAb en muestras de tejido también puede utilizarse la PCR convencional. Se extrae ácido nucleico como se ha descrito arriba. Se ha observado que la PCR de detección del HVAb1617 genera amplicones de distintas longitudes (522 pb a 588 pb) en función de la cepa de HVAb. Así, puede ser útil para estudios epidemiológicos y para confirmar resultados positivos en la qPCR. Las secuencias de cebadores se detallan a continuación.

Cebador	Secuencia
HVAb-16	5'-GGC-TCG-TTC-GGT-CGT-AGA-ATG-3'
HVAb-17	5'-TCA-GCG-TGT-ACA-GAT-CCA-TGT-C-3'

Las condiciones de ciclado son las siguientes: un ciclo de 95°C durante 15 minutos, 40 ciclos de 94°C durante 30 segundos/52°C durante 30 segundos/74°C durante 45 segundos, seguidos de un ciclo a 72°C durante 7 minutos, y a continuación mantenimiento a 4°C.

Hibridación in-situ

La hibridación *in situ* (ISH) aquí descrita emplea una sonda de ADN marcado con digoxigenina (DIG) para detectar HVAb en cortes de tejido fijados en formalina e incluidos en parafina (FFPE).

Reactivos

Citrato salino estándar (SSC) 20× pH7 (se guarda a temperatura ambiente)

175,32 g litro⁻¹

NaCl

88,23 g litro⁻¹

Citrato de sodio

Solución de Denhardt 100× (se guarda a -20°C)

2 g (100 ml)⁻¹

Albúmina de suero bovino (Fracción V)

2 g (100 ml)⁻¹

Ficoll 400

2 g (100 ml)⁻¹

Polivinilpirrolidona

Tampón de hibridación (se guarda a -20°C)

25 ml

Formamida

10 ml

SSC 20×

2,5 ml

Solución de Denhardt 100×

10 ml

Sulfato de dextrano al 50% en agua destilada

500 µl

ADN de esperma de arenque a 10 mg ml⁻¹

Se preparan hasta 50 ml con agua MilliQ

Solución salina tamponada con Tris (TBS) 10× (se guarda a temperatura ambiente)

23,6 g litro⁻¹

Tris base

127 g litro⁻¹

Tris/HCl

87,66 g litro⁻¹

NaCl

Preparación de sondas marcadas con DIG

Se lleva a cabo una PCR con ADN purificado de HVAb o una muestra que se sepa que contiene HVAb empleando un kit PCR DIG Probe Synthesis (Roche Cat. No. 11 636 090 910) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cebadores a utilizar son los siguientes:

Denominación del cebador	Secuencia del cebador	Tamaño del amplicón (sonda)
AbHV_ORF66f1	5'-TCC-CGG-ACA-CCA-GTA-AGA-AC-3'	
AbHV_ORF66r2	5'-GCC-GGT-CTT-TGA-AGG-ATC-TA-3'	848bp

Se aplica el siguiente perfil de termociclado: 95°C durante 5 minutos seguido de 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 57°C durante 30 segundos, 72°C durante 60 segundos. Se termina la PCR con una elongación final a 72°C durante 10 minutos

Preparación de los cortes

- i) Se realizan cortes de un espesor de 3 µm de tejido incluido en parafina, se colocan sobre portas Superfrost plus (Menzel Catalogue No. SF41296SP) y se dejan secar.
- ii) Se calientan los cortes a 65°C durante 30 minutos y se desparafinan en dos fases de xileno.
- iii) Se rehidratan poniendo los portas en etanol absoluto durante 2 minutos y después en etanol al 90% durante 2 minutos, en etanol al 70% durante 2 minutos y a continuación en agua destilada.
- iv) Se ponen los portas en HCl 0,2 N durante 20 minutos y se enjuagan en agua destilada durante 5-10 minutos.
- v) Se aplican 50–100 µl de proteinasa K a una concentración de 100 µg ml⁻¹ en solución salina tamponada con Tris (TBS; Tris 0,1 M; NaCl 0,15 M; pH 7.5) y se incuban a 37°C durante 30 minutos.
- vi) Se enjuagan con glicina al 0,2% durante 2 minutos.
- vii) Se lavan en agua corriente durante 10 minutos.
- viii) Se deshidrata la muestra en etanol al 70% durante 2 minutos y a continuación en etanol al 90% durante 2 minutos y en etanol al 100% durante 2 minutos.
- x) Se dejan secar los portas al aire.

Procedimiento de la hibridación

- i) Se preparan 100 µl de solución de hibridación por cada corte de tejido (SSC 4x, solución de Denhardt 5x, ADN de esperma de arenque a 10 mg ml⁻¹, sulfato de dextrano al 10%, formamida al 50%, sonda a unos 5 ng µl⁻¹).
- ii) Se calienta la solución de hibridación a 95-100°C durante 5 minutos para desnaturalizar la sonda y se deposita sobre hielo hasta que esté lista para su uso.
- iii) Se aplica suficiente solución de hibridación como para cubrir el corte (unos 50 µl) y se cubre con un cubreobjetos.
- iv) Se calientan los portas a 95°C durante 5 minutos para desnaturalizar el ácido nucleico de la muestra. Para calentar los portas a 95°C, puede utilizarse un calentador para PCR o bien un bloque de hibridación diseñado para este fin, como el hibridizador Invitrogen SpoT.
- v) Se introducen los portas en una cámara húmeda que se haya precalentado a 37°C y se incuban a 37°C durante toda la noche (12-16 horas).

Procedimientos post-hibridación

- i) Se retiran los cubreobjetos sumergiendo los portas en SSC 2x a temperatura ambiente.
- ii) Se depositan los portas en una rejilla y se sumergen en SSC 2x a temperatura ambiente.
- iii) Se lavan, con una suave inclinación/agitación, en SSC 0,5 × (precalentado a 37°C) a 37°C durante 15 minutos.
- iv) Se lavan los portas brevemente en tampón TBS a temperatura ambiente.
- v) Se incuban los portas en solución de bloqueo (solución de leche desnatada en polvo al 0,5% en TBS) durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- vi) Se cubren los cortes con 100-200 µl de carnero anti-DIG conjugado a fosfatasa alcalina (Roche Cat. No. 1093274) diluido a 1/100 en solución de bloqueo y se incuban a temperatura ambiente durante 1 hora.
- vii) Se lavan en tampón TBS tres veces durante 3 minutos cada vez.
- viii) Se equilibran en solución II (Tris 0,1 M, pH 8, NaCl 0,5 M, MgCl₂ 0,1 M, pH 9 o Tris 0,1 M, pH 8, MgSO₄ 0,05 M, 7H₂O, pH 9,5) durante 3 minutos a temperatura ambiente.

Aparición de color

- i) Se incuban los portas en la oscuridad en NBT/BCIP diluido en solución II (25 µl/ml).
- ii) Se cubren los cortes con la solución de tinción y se deposita un cubreobjetos sobre ellos. Se incuban en la oscuridad durante 3-4 horas en una cámara humidificada, asegurándose de que los portas no se sequen.
- iii) Se realiza un seguimiento de la aparición de color con comprobaciones periódicas de los portas al microscopio óptico.
- iv) Si es necesario, los portas pueden incubarse, en la oscuridad y a temperatura ambiente, durante toda la noche.
- v) Se detiene la reacción y se retira el cubreobjetos sumergiendo los portas en agua destilada.
- vi) Se lavan los portas en agua corriente durante 5 minutos.
- vii) Se puede aplicar una tinción de contraste a los portas durante 1 minuto con marrón Bismarck al 0,5 % o equivalente.
- viii) Se montan los portas con medio de montaje (DAKO Cat. No. S3023) y un cubreobjetos.

Interpretación de los resultados

Una tinción intracelular específica de color azul oscuro-negro es indicativa de la presencia de ADN vírico.

4.3.1.2.4. Purificación del agente

No se dispone de datos.

4.3.2. Métodos serológicos

No es aplicable.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

Los métodos actualmente disponibles para la vigilancia dirigida y el diagnóstico de la GVA se indican en la Tabla 5.1. Las designaciones utilizadas en la Tabla indican lo siguiente: a = el método es el método recomendado por razones de disponibilidad, utilidad y especificidad y sensibilidad diagnósticas; b = el método es un método estándar con una buena sensibilidad y especificidad diagnósticas; c = el método tiene aplicación en algunas situaciones, pero el coste, la exactitud u otros factores limitan gravemente su aplicación; y d = el método no se recomienda en la actualidad para este fin. Estas designaciones son algo subjetivas ya que la idoneidad implica cuestiones de fiabilidad, sensibilidad, especificidad y utilidad. Aunque no todas las pruebas indicadas como de categoría a o b han sido objeto de una estandarización y validación formales, su carácter de uso habitual y el hecho de que se hayan utilizado ampliamente sin resultados dudosos las hacen aceptables.

Tabla 5.1. Métodos para la vigilancia dirigida y el diagnóstico

Método	Vigilancia dirigida				Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
	Larvas	PL	Juveniles	Adultos		
Signos macroscópicos	d	d	c	c	c	d
Bioanálisis	d	d	d	d	d	c
MO directa	d	d	d	d	d	d
Histopatología	d	d	b	b	a	a*
ME de transmisión	d	d	d	d	d	c
Pruebas basadas en anticuerpos	d	d	d	d	d	d

Método	Vigilancia dirigida				Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
	d	d	c	c	d	a*
Sondas de ADN – <i>in situ</i>	d	d	c	c	d	a*
PCR	d	d	a	a	a	a
PCR y Secuenciación	d	d	d	d	d	a

PL = postlarvas; MO = microscopía óptica; ME = microscopía electrónica; PCR = reacción en cadena de la polimerasa; *La histopatología se puede confirmar empleando hibridación *in-situ* (ISH).

6. Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de infección por el herpesvirus del abalón

La prueba que se recomienda para la vigilancia dirigida es la qPCR con ácidos nucleicos extraídos de tejido neural de abalón.

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

La presencia de HVAb debe sospecharse si se cumple al menos uno de los siguientes criterios:

- i) Presencia de altas mortalidades (de hasta el 90%) asociadas a signos clínicos de GVA como se describe en este capítulo.
- ii) Histopatología (ganglioneuritis) observada en cortes de tejido neural de una sola muestra de abalón.
- iii) Un resultado positivo mediante la qPCR o la PCR convencional en al menos una muestra de abalón.

7.2. Definición de caso confirmado

La presencia de HVAb se considera confirmada si, además de los criterios del apartado 7.1, se cumple uno o más de los siguientes:

- i) Un resultado positivo mediante la qPCR en uno o más abalones cuando también se haya observado una histopatología positiva (7.1.i) y/o una alta mortalidad con signos clínicos compatibles con la GVA (7.1.ii).
- ii) Un resultado positivo mediante la hibridación *in situ* en cortes de tejido neural.
- iii) Un resultado positivo mediante la PCR convencional en cortes de tejido neural seguido de un análisis de la secuencia del amplicón para confirmar la secuencia del ácido nucleico del HVAb.

8. Bibliografía

CHANG P.H., KUO S.T., LAI S.H., YANG H.S., TING Y.Y., HSU C.L. & CHEN H.C. (2005). Herpes-like virus infection causing mortality of cultured abalone *Halitotis diversicolor supertexta* in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.*, **65**, 23–27.

CORBEIL S., COLLING A., WILLIAMS L.M., WONG F.Y.K., SAVIN K., WARNER S., MURDOCH B., COGAN N.O.I., SAWBRIDGE T.I., FEGAN M., MOHAMMAD I., SUNARTO A., HANDLINGER J., PYECROFT S., DOUGLAS M., CHANG P.H. & CRANE M.ST.J. (2010). Development and validation of a TaqMan® PCR assay for the Australian abalone herpes-like virus. *Dis. Aquat. Org.*, **92**, 1–10.

COWLEY J.A., CORBEIL S., CHEN H., WONG F., MOODY N.J., ELLARD K., FEGAN M., SAVIN K., WARNER S. & CRANE M.ST.J. (2011). Sequence variations amongst abalone herpes-like virus (HVAb) strains provide insights into its origins in Victoria and Tasmania. Proceedings of the First FRDC Australasian Scientific Conference on Aquatic Animal Health, Cairns, Australia, 5–8 July 2011.

CRANE M.STJ., CORBEIL S., FEGAN M. & WARNER S. (2009). Aquatic Animal Health Subprogram: Development of molecular diagnostic procedures for the detection and identification of herpes-like virus of abalone (*Haliotis* spp.). ISBN 978 0 643 09835 0. 79 pp.

DAVISON A.J., EBERLE R., EHLERS B., HAYWARD G.S., MCGEOCH D.J., MINSON A.C., PELLETT P.E., ROIZMAN B., STUDDERT M.J. & THIRY E. (2009). The order Herpesvirales. *Arch. Virol.*, **154**, 171–177.

ELLARD K., PYECROFT S., HANDLINGER J. & ANDREWARTHA R. (2009). Findings of disease investigations following the recent detection of GVA in Tasmania. Proceedings of the Fourth National FRDC Aquatic Animal Health Scientific Conference, Cairns, Australia, 22–24 July 2009.

HOOPER C., HARDY-SMITH P. & HANDLINGER J. (2007). Ganglioneuritis causing high mortalities in farmed Australian abalone (*Haliotis laevis* and *Haliotis rubra*). *Aus. Vet. J.*, **85**, 188–193.

LE DEUFF R.M. & RENAULT T. (1999). Purification and partial genome characterization of a herpes-like virus infecting the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *J. Gen. Virol.*, **80**, 1317–1322.

MOHAMMAD I.M., WARNER S., KVALHEIM N., CRANE M.STJ. & FEGAN M. (2011) Development of an *in situ* hybridisation assay for the detection and identification of the abalone herpes-like virus. Proceedings of the First FRDC Australasian Scientific Conference on Aquatic Animal Health, Cairns, Australia, 5–8 July 2011.

SAVIN K.W., COCKS B.G., WONG F., SAWBRIDGE T., COGAN N., SAVAGE D. & WARNER S. (2010). A neurotropic herpesvirus infecting the gastropod, abalone, shares ancestry with oyster herpesvirus and a herpesvirus associated with the amphioxus genome. *Virol. J.*, **7**, 308. <http://www.virologyj.com/content/7/1/308>.

TAN J., LANCASTER M., HYATT A., VAN DRIEL R., WONG F. & WARNER S. (2008). Purification of a herpes-like virus from abalone (*Haliotis* spp.) with ganglioneuritis and detection by transmission electron microscopy. *J. Virol. Methods*, **149**, 338–341.

WANG J., GUO Z., FENG J., LIU G., XU L., CHEN B. & PAN J. (2004). Virus infection in cultured abalone, *Haliotis diversicolor* Reeve in Guangdong Province, China. *J. Shellfish Res.*, **23**, 1163–1168.

*
* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la Infección por el herpesvirus del abalón (puede consultarse la lista actualizada en la Tabla del final de este *Manual Acuático* o en la página web de la OIE: www.oie.int).

INFECCIÓN POR *BONAMIA EXITIOSA*

1. Ámbito de aplicación

Bonamia exitiosa es un parásito protozoario del filum *Haplosporidia* (Carnegie y Cochenne-Laureau, 2004) que infecta los hemocitos de varias especies de ostras e induce trastornos de la fisiología y finalmente la muerte del animal (Cranfield *et al.*, 2005; Dinamani *et al.*, 1987). A efectos de este capítulo, la infección por *Bonamia exitiosa* se considera una infección por *B. exitiosa*, anteriormente denominado *B. exitiosus* (Berthe y Hine, 2003; Hine *et al.*, 2001). Esta definición excluye infecciones por *B. ostreae* (Pichot *et al.*, 1979), *B. roughleyi* (Cochennec *et al.*, 2003; Farley *et al.*, 1988) y *B. perspora* (Carnegie *et al.*, 2006). Los casos de *Bonamia* spp. que no se hayan identificado hasta el nivel de especie (Burreson *et al.*, 2004; Campalans *et al.*, 2000; Kroeck y Montes, 2005) deben trasladarse al Laboratorio de Referencia de la OIE correspondiente.

2. Información sobre la enfermedad

2.1. Factores del agente

2.1.1. El agente patógeno, cepas del agente

Bonamia exitiosa (Berthe y Hine, 2003; Hine *et al.*, 2001); no se ha identificado ninguna cepa.

2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

Actualmente no se tiene constancia.

2.1.3. Estabilidad del agente patógeno (métodos eficaces de inactivación)

Actualmente no se conoce ninguno.

2.1.4. Ciclo de vida

Es posible que tenga lugar una transmisión del parásito directamente entre hospedadores, y se sospecha de una transmisión por la vehiculación pasiva en las corrientes de estadios infectivos entre lechos de ostras (Cranfield *et al.*, 2005; Hine, 1996).

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Son susceptibles las especies de ostras *Ostrea chilensis* (= *Tiostrea chilensis* = *T. lutaria*) (Dinamani *et al.*, 1987), *O. angasi* (Corbeil *et al.*, 2006b; Hine, 1996; Hine y Jones, 1994), *O. edulis* (Abollo *et al.*, 2008; Narcisi *et al.*, 2010) y *O. stentina* (Hill *et al.*, 2010).

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

En el caso de *O. chilensis*, se sabe que son susceptibles las ostras en tamaño de reclutamiento (ostras de 58 mm de longitud o mayores) (Dinamani *et al.*, 1987). En el caso de *O. edulis*, el parásito se ha detectado en ostras de tamaño comercial (>60 mm) (Abollo *et al.*, 2008). No se dispone de datos respecto a ningún otro estadio de las ostras, incluidas las larvas.

Recientemente se ha detectado ADN de *B. exitiosa* en larvas de ostra europea (*Ostrea edulis*) (Arzul *et al.*, 2010).

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

Ostrea chilensis y *O. angasi* (Dinamani *et al.*, 1987; Hine y Jones, 1994) de 58 mm de longitud o mayores. En *O. chilensis*, la intensidad media de infección por *Bonamia* fue significativamente mayor en hembras y en ostras desovadas que en machos y en ostras hermafroditas (Hine *et al.*, 2002).

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

Bonamia exitiosa es un protozoo intrahemocítico, pero puede observarse extracelularmente (Dinamani *et al.*, 1987). Este protozoo intrahemocítico se convierte rápidamente en sistémico y puede hallarse en distintos órganos, sobre todo en los tejidos conjuntivos de las branquias y del manto (Hine, 1991a). En *Ostrea angasi*, el parásito es epiteliotrópico, e infecciones aparentemente muy leves pueden causar una infiltración masiva local de hemocitos con focos necróticos. En *O. edulis*, el parásito se asocia a infiltración hemocítica intensa y aparece en el tejido conjuntivo de distintos órganos, principalmente dentro de los hemocitos, pero a veces también fuera de las células hospedadoras (Abollo *et al.*, 2008). En *O. stentina*, no se observó hemocitosis en animales que estaban infectados por el parásito (Hill *et al.*, 2010).

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

La infección a menudo es mortal, en función del hospedador y de las condiciones ambientales.

2.2.6. Vectores

Ninguno identificado.

La detección de ADN de *B. exitiosa* en *Crassostrea gigas* sugiere que esta especie podría actuar como portadora o reservorio de *B. exitiosa* (Lynch *et al.*, 2010).

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

Bonamia exitiosa suele infectar a poblaciones salvajes de especies susceptibles (véase el apartado 2.2.1).

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mecanismos de transmisión

En *O. chilensis* es posible la transmisión del parásito directamente entre hospedadores. Las ostras ingieren partículas infectivas liberadas y entran en la hemolinfa procedentes del intestino (Hine, 1991a; 1991b). Las partículas infectivas son fagocitadas por hemocitos agranulares, pero pueden resistir a la lisis dentro del hemocito (Hine y Wesney, 1994).

Se detectó ADN del parásito en larvas incubadas en la cavidad paleal de ostras adultas, lo cual sugiere una posible transmisión entre estos dos grupos de edad. Así, las larvas podrían contribuir a la propagación del parásito durante su vida planctónica (Arzul *et al.*, 2010).

2.3.2. Prevalencia

La prevalencia en *O. chilensis* es variable (de entre el 0% y casi el 80%) (Cranfield *et al.*, 2005; Diggles *et al.*, 2002). En el hemisferio sur, la infección por *B. exitiosa* presenta la máxima prevalencia entre enero y abril, y el parásito es prácticamente indetectable en septiembre y octubre (Hine, 1991a). Factores estresantes, como la exposición a temperaturas (inferiores a los 7º o superiores a los 26ºC) y salinidades (40%) extremas, el ayuno (permanencia en agua marina filtrada durante largos periodos de tiempo), la manipulación (un agitación enérgica cuatro veces al día) o una infección intensa por parásitos del filum Apicomplexa (Hine, 2002), pueden afectar a la dinámica de la enfermedad causada por *B. exitiosa* en *O. chilensis* (Hine *et al.*, 2002). En Galicia (España), la máxima prevalencia notificada de *B. exitiosa* en *O. edulis* fue del 34% en un lote recogido en octubre (Abollo *et al.*, 2008). A pesar de ciertas diferencias de prevalencia observadas entre distintas fechas de muestreo, actualmente no se puede determinar cuál es el patrón de infección anual de la ostra europea por *B. exitiosa* en Europa.

En *O. edulis* la prevalencia es variable, en cuyo molusco se ha observado coinfección con *B. ostreae* (Abollo *et al.*, 2008).

2.3.3. Distribución geográfica

En *O. chilensis* se ha hallado infección por *B. exitiosa* en el estrecho de Foveaux y en otros lugares de la isla Sur de Nueva Zelanda (Dinamani *et al.*, 1987; Doonan *et al.*, 1994); en *O. angasi*, en Australia (Bahía Port Philip, Victoria; Bahía Georges, Tasmania; y Albany, Australia occidental) (Corbeil *et al.*, 2006b; Hine, 1996; Hine y Jones, 1994); en *O. edulis*, en Galicia (Spain) (Abollo *et al.*, 2008), en Italia (Mar Adriático) (Narcisi *et al.* 2010), en Francia (Mar Mediterráneo) y en el Reino Unido (Cornwall); y en *O. stentina*, en Túnez (Hill *et al.*, 2010).

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

La infección suele ser mortal. En *O. chilensis*, la muerte suele tener lugar de forma simultánea a la máxima intensidad de infección, en concreto asociada a infecciones muy intensas por parásitos del filum Apicomplexa (Hine, 2002; Hine y Wesney, 1994). La enfermedad parece matar más del 80% de las ostras porque la ola de la infección pasa por un lecho de ostras a lo largo de un periodo de 2-3 años (Cranfield *et al.*, 2005). Todavía no se ha evaluado el impacto de *B. exitiosa* en *O. edulis* ni en *O. stentina*.

2.3.5. Factores ambientales

La prevalencia fue más alta en ostras mantenidas durante un corto periodo de tiempo (14 días) en agua tibia (25-26°C) durante 1 hora al día o en agua hipersalina (39–40%) que en agua fría (7°C durante 1 hora al día) y en agua hiposalina (15%) (Hine *et al.*, 2002). Sin embargo, en este estudio se utilizó la variación de temperatura y de salinidad como factor estresante.

En *O. chilensis*, la prevalencia sigue un patrón anual con dos picos, uno en abril (principios de otoño) y uno en agosto (invierno) (Hine, 1991a). Todavía no se ha estudiado la evolución de *B. exitiosa* en *O. edulis* ni en *O. stentina* en función de la estación del año.

2.4. Control y prevención

2.4.1. Vacunación

Ninguna.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

Ninguno.

2.4.3. Inmunoestimulación

Ninguna.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

Ninguna.

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

Ninguna.

2.4.6. Agentes bloqueantes

Ninguno.

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

No se dispone de datos.

2.4.8. Prácticas generales de manejo

El desarrollo de dragas más ligeras y de estrategias de pesca menos agresivas debería reducir la probabilidad de que surgieran brotes de la enfermedad, porque se reduciría la perturbación de los moluscos (Cranfield *et al.*, 2005). Evitar factores estresantes como la exposición a temperaturas (inferiores a los 7°C o superiores a los 26°C) y a salinidades (40%) extremas, el ayuno, la manipulación o infecciones intensas por otros parásitos, así como disminuir la densidad, debería ayudar a reducir el impacto de la enfermedad (Cranfield *et al.*, 2005; Hine *et al.*, 2002).

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

Prioritariamente deben escogerse ejemplares moribundos o que acaben de morir (de 2 o más años), para aumentar la probabilidad de encontrar ostras infectadas. Para la histología, solo deben escogerse ostras vivas (pueden incluirse moribundas).

Debe organizarse la obtención de ostras de modo que se lleve a cabo una vez al año, cuando se sepa que la prevalencia es máxima. Cuando no se disponga de este dato en un ecosistema determinado, en el hemisferio sur la obtención de muestras debe llevarse a cabo preferiblemente entre enero y abril (Hine, 1991a).

3.2. Conservación de muestras para su envío

Para la histología, el mejor conservante es el AFA de Davidson, pero también es aceptable la formalina tamponada al 10% u otros fijadores estándar para histología. Para las pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), las muestras deben conservarse en etanol al 95-100% y en alcohol no desnaturalizado.

3.3. Combinación de varias muestras

La combinación de varias muestras podría ser aplicable, pero no se ha evaluado cómo influye en el rendimiento de las pruebas diagnósticas.

3.4. Órganos y tejidos de elección

Para el diagnóstico de *B. exitiosa* por histología se utiliza un corte de tejido de 3-5 mm de espesor de branquias, manto, gónadas o glándula digestiva. Para ciertas pruebas, como las improntas o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son preferibles las branquias y/o el corazón.

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

Los tejidos distintos de las branquias, el corazón y el manto son menos adecuados.

4. Métodos de diagnóstico

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

Los signos clínicos son la presencia de ostras muertas o moribundas, pero no es patognomónica de la infección por *B. exitiosa* y podría indicar otras infecciones.

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Presencia de ostras moribundas.

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

La mayoría de ostras vivas infectadas tiene un aspecto normal, pero a veces las branquias pueden estar erosionadas (Dinamani *et al.*, 1987).

4.2.2. Bioquímica clínica

Ninguna.

4.2.3. Anatomopatología microscópica

En *O. chilensis*, aparecen lesiones en el tejido conjuntivo de las branquias y del manto, y en los senos vasculares situados alrededor del estómago y del intestino. La capa subepitelial del tejido conjuntivo del manto, que está infiltrada por grupos de hemocitos granulares parasitados, presenta un aspecto disociado (Dinamani *et al.*, 1987). En infecciones aparentemente leves de los epitelios de las branquias y de los divertículos digestivos de *O. angasi*, la presencia intracelular de *B. exitiosa*, que apenas adquiere un tono basófilo claro en la tinción, da lugar a una hiperplasia epitelial masiva. En *O. edulis*, el parásito se detectó en el tejido conjuntivo de distintos órganos asociado a una intensa infiltración de hemocitos (Abollo *et al.*, 2008).

4.2.4. Preparaciones húmedas

Ninguna.

4.2.5. Improntas

Pueden observarse microorganismos esféricos u ovoides (de 2-5 µm de ancho) dentro de los hemocitos en improntas de corazón o de branquias.

4.2.6. Microscopía electrónica/citopatología

En infecciones avanzadas, puede observarse el parásito dentro de los hemocitos.

4.3. Métodos de detección e identificación del agente

4.3.1. Métodos directos de detección

4.3.1.1. Métodos microscópicos

4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

Ninguna.

4.3.1.1.2. Improntas

Muestras a obtener: ostras desovadas o ventrículo cardíaco o branquias de hospedadores vivos de 2 años de edad o más.

Procedimiento técnico: tras secar los tejidos sobre papel absorbente, se llevan a cabo varias improntas sobre un porta de vidrio. Los portas se secan al aire, se fijan en metanol o en etanol absoluto y se tiñen utilizando un kit comercial de tinción de sangre, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Tras enjuagarlos en agua de grifo y secarlos, los portas se montan con un cubreobjetos utilizando una resina sintética adecuada. Los portas se observan primero a 200 aumentos y a continuación con aceite de inmersión a 1.000 aumentos.

Controles positivos: son recomendables y se adquieren en el Laboratorio de Referencia de la OIE.

Niveles de validación:

- *Especificidad y sensibilidad:* la especificidad es baja, pero la sensibilidad es mejor que la del examen histológico (Diggles *et al.*, 2003). En comparación con la PCR y la hibridación *in-situ* (ISH) combinadas, en *O. chilensis* las improntas de corazón tienen una sensibilidad del 59,3% y una especificidad del 100% (Diggles *et al.*, 2003).
- *Método de referencia:* la sensibilidad de las improntas de tejidos es más alta que la de la histología, que es el método de referencia, aunque no es específica de la especie del parásito.

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo es la presencia de pequeños microorganismos esféricos u ovoides (de 2–5 µm de ancho) dentro de los hemocitos. Sin embargo, también es posible observar el parásito extracelularmente. Estos microorganismos tienen un citoplasma basófilo y un núcleo eosinófilo (los colores pueden variar en función de la tinción utilizada) y, dado que se esparcen sobre el porta, pueden parecer más grandes en improntas que en preparaciones histológicas.
- En especies susceptibles de la zona en la que se sabe que existe infección por *B. exitiosa*, un resultado positivo en *O. chilensis* o en *O. angasi* indica infección por *B. exitiosa*, pero en *O. edulis* puede indicar infección tanto por *B. exitiosa* como por *B. ostreae*.
- En otras especies o fuera de la zona geográfica en la que se sabe que existe infección por *B. exitiosa*, un resultado positivo indica infección por una especie del género *Bonamia* que tendrá que confirmarse en el Laboratorio de Referencia de la OIE.

Disponibilidad de pruebas comerciales: se comercializan kits de tinción rápida (como por ejemplo, Hemacolor®).

4.3.1.1.3. Cortes fijados

4.3.1.1.3.1. Histología

Muestras a obtener: Ostras vivas o que acaben de morir.

Procedimiento técnico: deben fijarse durante 24 h en fijador de Davidson o en otros fijadores estándar para histología, como formalina tamponada al 10%, cortes de tejido que incluyan branquias, glándula

digestiva, manto y gónadas. A continuación, se aplica el proceso normal de inclusión en parafina y tinción, por ejemplo, con hematoxilina y eosina. Las observaciones se realizan a aumentos crecientes, hasta llegar a los x1000.

Controles positivos: son recomendables y se adquieren en el Laboratorio de Referencia de la OIE.

Niveles de validación:

- **Especificidad y sensibilidad:** en *O. chilensis*, la especificidad es baja, pero la sensibilidad es buena en infecciones de intensidad moderada a alta, y baja en infecciones de baja intensidad. En comparación con la PCR combinada con ISH, la histología tiene una sensibilidad del 44% (inferior a la de las improntas de corazón) y una especificidad del 100% (Diggle *et al.*, 2003).
- **Método de referencia:** la histología es el método de referencia y es el método de vigilancia recomendado en zonas solo infectadas por *B. exitiosa*. Sin embargo, en zonas donde coexisten *B. exitiosa* y *B. ostreae*, un resultado positivo en la histología tendrá que confirmarse mediante caracterización molecular.

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo es la presencia, en *O. chilensis*, de parásitos en forma de células muy pequeñas, de 2-5 µm de ancho, dentro de los hemocitos o libres en el tejido conjuntivo o en el epitelio de los senos de las branquias, del intestino y del manto. A menudo se asocian a una intensa infiltración diseminada de hemocitos en *O. chilensis*, mientras que en *O. angasi* se asocian a una intensa infiltración focal de hemocitos. Para evitar posibles dudas, solo se diagnosticará la enfermedad si se observa el parásito dentro de los hemocitos. Esta técnica no es específica de especie.
- En especies susceptibles de la zona en la que se sabe que existe infección por *B. exitiosa*, un resultado positivo en *O. chilensis* o en *O. angasi* indica infección por *B. exitiosa*, pero en *O. edulis* puede indicar infección tanto por *B. exitiosa* como por *B. ostreae*.
- En otras especies o fuera de la zona geográfica en la que se sabe que existe infección por *B. exitiosa*, un resultado positivo indica infección por una especie del género *Bonamia* que tendrá que confirmarse en el Laboratorio de Referencia de la OIE.

Disponibilidad de pruebas comerciales: no existen pruebas comerciales.

4.3.1.1.3.2. Microscopía electrónica de transmisión

Muestras a obtener: Ostras vivas o que acaben de morir.

Procedimiento técnico: debe fijarse un trozo pequeño (1-2 mm) de tejido en glutaraldehído al 3% (en agua de mar filtrada por un tamaño de poro de 0,22 µm [FSW]) durante 1 hora, lavarse tres veces en FSW, fijarse en ácido ósmico al 1% y lavarse dos veces más de FSW. Tras la deshidratación en baños sucesivos de etanol, y dos baños de óxido de propileno, las muestras deben impregnarse progresivamente e incluirse en Epon. Tras la polimerización a 60°C, deben realizarse cortes de los bloques de 0,5-1 µm de espesor para el control de calidad, y después de 80-100 nm para el examen al microscopio electrónico. Se depositan cortes ultrafinos en rejillas de malla de cobre y se les aplica una tinción de contraste utilizando acetato de uranilo y citrato de plomo.

Controles positivos: ninguno.

Niveles de validación:

- **Especificidad y sensibilidad:** la especificidad es mejor que la de las improntas o la histología. La microscopía electrónica de transmisión (MET) permite diferenciar *B. exitiosa* de otras microcélulas estrechamente relacionadas, como *B. ostreae*.

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo es la presencia de parásitos dentro de los hemocitos. En *O. chilensis*, se han descrito cuatro fases de desarrollo del parásito en ostras infectadas, que corresponden a las formas densas (Estado 1), las formas intermedias (Estado 2), las formas plasmodiales (Estado 3) y las formas vacuoladas (Estado 4) (Hine, 1991b; Hine *et al.*, 2001). Las estructuras intracelulares son mitocondrias, haplosporosomas, aparato de Golgi y microtúbulos intranucleares persistentes.
- A diferencia de otros haplosporidios, como *B. ostreae*, en *B. exitiosa* se ha observado una fase que contiene una gran vacuola derivada del aumento de tamaño de una o más mitocondrias (Hine, 1991b; Hine *et al.*, 2001). Las formas densas de *B. exitiosa* son ligeramente más grandes.

(diámetro medio de 61 parásitos = $3 \pm 0,3 \mu\text{m}$) que las de *B. ostreae*, (diámetro medio de 64 parásitos = $2,4 \pm 0,5 \mu\text{m}$) y tienen más haplosporosomas, perfiles mitocondriales y cuerpos lipoides por área de ultraestructura, así como mitocondrias tubulo-vesiculares más pequeñas. Además, las formas densas, aunque no las claras, de *B. ostreae* carecen de complejos de aparato de Golgi/copa nuclear unidos a la membrana nuclear, y de fase vacuolada (Hine *et al.*, 2001).

Disponibilidad de pruebas comerciales: no existen pruebas comerciales.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

No se dispone de ninguno.

4.3.1.2.2. Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos

Actualmente no existe ninguno, pero uno de los dos anticuerpos monoclonales generados contra la membrana celular de *B. ostreae* reaccionó con *B. exitiosa* (Mialhe *et al.*, 1988).

4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

4.3.1.2.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Muestras a obtener: ostras vivas o que acaben de morir.

Procedimiento técnico: se introducen muestras de tejido en etanol al 95-100% o se congelan hasta que se extraiga el ADN. La extracción del ADN se lleva a cabo mediante digestión con proteinasa K durante toda la noche a 50°C, y extracción con fenol-cloroformo con precipitación mediante etanol (Cochennec *et al.*, 2000).

Se ha observado que un protocolo de PCR desarrollado para la detección de *B. ostreae* permite la detección de *B. exitiosa* (Carnegie y Cochennec-Laureau, 2004; Diggles *et al.*, 2003; Hine *et al.*, 2001). El par de cebadores Bo-Boas (5'-CAT-TTA-ATT-GGT-CGG-GCC-GC-3' y 5'-CTG-ATC-GTC-TTC-GAT-CCC-CC-3', respectivamente) amplifica un producto de 304 pb del ADNr de la región de la subunidad pequeña (SSU) (Cochennec *et al.*, 2000). Las mezclas para la PCR contienen tampón (KCl 500 mM, Tris/HCl 100 mM [pH 9,0 a 25°C] y Triton[®] X-100 al 1%), MgCl₂ 2,5 mM, mezcla de dNTP a una concentración de 0,2 mM, cebadores directo e inverso 1 μM , 0,02 unidades/ μl de ADN polimerasa Taq, y 0,2 ng/ μl del ADN molde en un volumen total de 50 μl . Las muestras se desnaturalizan en un termociclador durante 5 minutos a 94°C antes de ser sometidas a 30 ciclos (94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto), seguidos de una extensión final de 10 minutos a 72°C.

Un segundo par de cebadores, C_F y C_R (5'-CGG-GGG-CAT-AAT-TCA-GGA-AC-3' y 5'-CCA-TCT-GCT-GGA-GAC-ACA-G-3', respectivamente), también diseñado para amplificar un producto de 760 pb de ADNr de la SSU de *B. ostreae*, debería amplificar *B. exitiosa* (Carnegie y Cochennec-Laureau, 2004).

Para la detección de *Bonamia* spp. también puede utilizarse una prueba de PCR TaqMan utilizando cebadores y sonda que accedan a la región del ITS1 (espaciador transcrito interno) (Corbeil *et al.*, 2006a). Tiene buena sensibilidad; esta prueba no amplifica *Haplosporidium nelsoni*, *H. costale* ni *Mikrocytos mackini*, pero todavía no está del todo validada.

Controles positivo/negativo: son obligatorios. Los controles positivos son: 1) PCR con cebadores específicos del ADN genómico de hospedadores muy infectados o ADN de parásitos purificados; 2) productos de una amplificación inespecífica (actina, SSU, etc.). Los controles negativos son: 3) reacciones de ADN no diana; 4) PCR con cebadores específicos de ADN genómico de hospedadores no infectados. Los controles positivos pueden adquirirse previa petición en el Laboratorio de Referencia de la OIE.

Niveles de validación:

- *Especificidad y sensibilidad:* debido a la similitud con la secuencia de ADN diana, el par de cebadores Bo-Boas debe amplificar todos los haplosporidios microcelulares (Carnegie y Cochennec-Laureau, 2004). La sensibilidad de la prueba es mejor que la de la histología, pero peor que la de la hibridación *in-situ* (Diggles *et al.*, 2003).

- **Método de referencia:** en comparación con la combinación de histología e improntas de corazón, y considerando que estas técnicas tienen un 100% de sensibilidad y de especificidad, la PCR tiene una sensibilidad del 88,2% (inferior a la de la ISH) y una especificidad del 36,4% (Diggle *et al.*, 2003).

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo es un amplicón del tamaño adecuado, cuando todos los controles negativos dan un resultado negativo y todos los controles positivos, un resultado positivo.
- La PCR no es específica de especie. La secuencia de ADN del gen de la SSU de *Bonamia exitiosa* presenta polimorfismo con la de *B. ostreae* y *B. roughleyi* en el análisis de los polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) tras una digestión con *Bgl* I y *Hae* II de los productos obtenidos en la PCR realizada con los cebadores Bo-Boas. *Bonamia ostreae* y *B. exitiosa* presentan el mismo perfil (dos productos de 115 y de 189 pb) cuando se digieren con *Hae* II, mientras que el producto de la PCR de *B. roughleyi* no se digiere. El perfil de *B. ostreae* consiste en dos bandas de 120 y de 180 pb cuando se digiere con *Bgl* I, mientras que los productos de la PCR de *B. exitiosa* y *B. roughleyi* no se digieren (Carnegie y Cochenne-Laureau, 2004; Hine *et al.*, 2001). Sin embargo, según el análisis de la secuencia, la PCR-RFLP no distingue *B. exitiosa*, y otras cepas relacionadas, de *B. perspora*.
- En *O. chilensis* y *O. angasi* de Nueva Zelanda y de Australia, respectivamente, un resultado de PCR-RFLP esperado, asociado a un resultado positivo por histología o improntas, confirma la infección por *B. exitiosa*;
- En otras especies, o fuera de la zona geográfica en la que se sabe que hay infección por *B. exitiosa*, un resultado de PCR-RFLP esperado, asociado a un resultado positivo por histología o improntas, es muy indicativo de una infección por *B. exitiosa*, pero para confirmar el diagnóstico es necesaria una secuenciación del producto de la PCR y, si es posible, una observación mediante MET.

Disponibilidad de pruebas comerciales: no existen pruebas comerciales.

4.3.1.2.3.2. Hibridación in-situ (ISH)

Muestras a obtener: ostras vivas o que acaben de morir.

Procedimiento técnico: se ha observado que un protocolo de ISH desarrollado para detectar *B. ostreae* permite detectar *B. exitiosa* (Cochenne *et al.*, 2000; Diggle *et al.*, 2003). En esta prueba se utiliza una sonda de 300 pb marcada con digoxigenina que accede al ADN del gen de la SSU. Se introducen muestras de tejido en fijador de Davidson durante 24 horas y a continuación se incluyen en parafina. Se realizan cortes de 5 µm de espesor, se depositan sobre portas recubiertos de silano y después se dejan durante toda la noche en un horno a 60°C. Tras desparafinarlos, los portas se tratan con proteinasa K (100 µgml⁻¹) en tampón TE (Tris 50 mM, EDTA [ácido etilendiaminotetraacético] 10 mM) a 37°C durante 30 minutos. Los portas se deshidratan por inmersión en diluciones seriadas de etanol y se secan al aire. A continuación, se cubren con tampón de hibridación (SSC [citrito salino estándar; NaCl 60 mM, NaCl 600 mM, pH 7] 4x, formamida al 50%, solución de Denhardt 1x, 250 µgml⁻¹ de ARNt de levadura, sulfato de dextrano al 10%) que contenga 20 ng de la sonda marcada con digoxigenina. Tras la desnaturalización durante 5 minutos a 95°C, se lleva a cabo la hibridación incubando los portas en una cámara húmeda durante toda la noche a 42°C. La sonda se produce mediante PCR utilizando el par de cebadores Bo-Boas anteriormente descrito con incorporación de digoxigenina. La PCR se lleva a cabo como se ha descrito en el apartado sobre la PCR excepto por el hecho de que se añade DIG dUTP 25 mM a la mezcla de reacción. Los pasos de la detección se realizan según las instrucciones del fabricante.

En otro protocolo de ISH se utiliza un cóctel de tres sondas 5' marcadas con digoxigenina específicas de miembros estrechamente relacionados del grupo de *B. exitiosa*–*B. roughleyi* (Hill *et al.*, 2010). No obstante, esta prueba no está del todo validada.

Controles positivos/negativos: son obligatorios. Los controles positivos son: 1) ISH en el hospedador infectado; 2) ISH inespecífico (ADN del gen de la SSU) en las muestras. Los controles negativos son: 3) reacciones de ISH sin sonda; 4) ISH en hospedadores no infectados. Los controles positivos pueden adquirirse solicitándolos al Laboratorio de Referencia de la OIE.

Niveles de validación:

- **Especificidad y sensibilidad:** la especificidad es más alta que la de los métodos histocitológicos. No obstante, la sonda Bo-boas también permite detectar *Haplosporidium nelsoni* en *Crassostrea*

virginica, y *B. ostreae* en *O. edulis*, aunque no *Mikrocytos mackini* en *C. gigas* (Carnegie y Cochenne-Laureau, 2004; Cochenne *et al.*, 2000).

- **Método de referencia:** en comparación con la combinación de histología e improntas, y teniendo en cuenta que estas técnicas ofrecen un 100% de sensibilidad y de especificidad, la ISH tiene una sensibilidad del 100% (superior a la de la PCR) y una especificidad del 27,3% (Diggles *et al.*, 2003).

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo corresponde a parásitos marcados de color oscuro dentro de los hemocitos, cuando todos los controles negativos dan un resultado negativo y todos los positivos, un resultado positivo.
- En especies susceptibles de la zona en la que se sabe que existe infección por *B. exitiosa*, un resultado positivo en *O. chilensis* o en *O. angasi* indica infección por *B. exitiosa*, pero en *O. edulis* puede indicar infección tanto por *B. exitiosa* como por *B. ostreae*.
- En otras especies o fuera de la zona geográfica en la que se sabe que existe infección por *B. exitiosa*, un resultado positivo indica infección por una especie del género *Bonamia* que tendrá que confirmarse en el Laboratorio de Referencia de la OIE.

Disponibilidad de pruebas comerciales: kit de detección de ácidos nucleicos con DIG (Boehringer Mannheim).

4.3.1.2.3.3. Secuenciación

La secuenciación se recomienda como uno de los pasos finales para la confirmación del diagnóstico. Las regiones de acceso son el ADNr de la SSU y el ITS1. Aunque en las genotecas públicas se dispone de las secuencias, se recomienda pasar estos casos al Laboratorio de Referencia de la OIE correspondiente.

4.3.1.2.4. Purificación del agente

Ninguna.

4.3.2. Métodos serológicos

Ninguno aplicable.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

A modo de ejemplo, los métodos actualmente disponibles para la vigilancia dirigida y el diagnóstico de la infección por *B. exitiosa* se detallan en la Tabla 5.1. Las denominaciones utilizadas en la Tabla indican: a = el método es el recomendado por razones de disponibilidad, utilidad y especificidad y sensibilidad de diagnóstico; b = el método es estándar, con buena sensibilidad y especificidad de diagnóstico; c = el método tiene aplicación en algunas situaciones, pero el coste, la precisión u otros factores limitan seriamente su aplicación; y d = el método no se recomienda actualmente para este fin. Esta clasificación es de alguna forma subjetiva ya que la idoneidad implica cuestiones de fiabilidad, sensibilidad, especificidad y utilidad. Aunque no todas las pruebas incluidas en las categorías a o b se han sometido a estandarización y validación formales, su naturaleza sistemática y el hecho de que se hayan usado generalmente sin resultados dudosos las hace aceptables.

Tabla 5.1. Métodos de vigilancia dirigida y diagnóstico

Método	Vigilancia dirigida				Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
	Larvas	PL	Juveniles	Adultos		
Signos macroscópicos	d	d	c	c	c	d
Improntas de tejidos	d	d	a	a	a	c
Histopatología	d	d	a	a	a	c
Me de transmisión	d	d	d	d	d	b
Sondas de ADN – <i>in situ</i>	d	d	d	d	d	b

Método	Vigilancia dirigida				Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
	a	a	a	a	a	c
PCR y PCR TaqMan	a	a	a	a	a	c
PCR-RFLP	d	d	d	d	d	b
Secuenciación	d	d	d	d	d	a

PL = postlarvas; ME = microscopía electrónica; PCR = reacción en cadena de la polimerasa; RFLP = análisis de polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción.

6. Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de infección por *Bonamia exitiosa*

Los métodos prescritos para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de infección, como se indica en el *Código Acuático*, son: improntas de tejidos (corazón o branquias), histología o PCR en zonas solo infectadas por *B. exitiosa*. Sin embargo, en zonas donde coexisten *B. exitiosa* y *B. ostreae*, un resultado positivo en la histología tiene que confirmarse mediante caracterización molecular.

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

Todos los casos que den un resultado positivo obtenido por cualquier técnica de diagnóstico deben considerarse sospechosos.

7.2. Definición de caso confirmado

En especies susceptibles de la zona geográfica donde se sabe que existe infección por *B. exitiosa*, un caso confirmado de *B. exitiosa* es el que da un resultado positivo en improntas de tejidos, histología o hibridación *in-situ* junto con un resultado positivo en la PCR-RFLP y en la secuenciación.

En otras especies hospedadores o fuera de la zona donde se sabe que existe infección por *B. exitiosa*, se recomienda una confirmación por MET. No obstante, esta técnica solo es adecuada para las muestras intensamente infectadas.

8. Bibliografía

ABOLLO E., RAMILO A., CASAS S.M., COMESAÑA P., CAO A., CARBALLAL M.J. & VILLALBA A. (2008). First detection of the protozoan parasite *Bonamia exitiosa* (Haplosporidia) infecting flat oyster *Ostrea edulis* grown in European waters. *Aquaculture*, **274**, 201–207.

ARZUL I., LANGLADE A., CHOLLET B., ROBERT M., FERRAND S., OMNES E., LEROND S., COURALEAU Y., JOLY J.-P., FRANÇOIS C. & GARCIA C. (2010). Can the protozoan parasite *Bonamia ostreae* infect larvae of flat oysters *Ostrea edulis*? *Vet. Parasitol.*, doi:10.1016/j.vetpar.2011.01.060

BERTHE F.C.J. & HINE P.M. (2003). *Bonamia exitiosa* Hine et al., 2001 is proposed instead of *B. exitiosus* as the valid name of *Bonamia* sp. infecting flat oysters *Ostrea chilensis* in New Zealand. *Dis. Aquat. Org.*, **57**, 181.

BURRESON E.M., STOKES N.A., CARNEGIE R.B. & BISHOP M.J. (2004). *Bonamia* sp. (Haplosporidia) found in nonnative oysters *Crassostrea ariakensis* in Bogue Sound, North Carolina. *J. Aquat. Anim. Health*, **16**, 1–9.

CAMPALANS M., ROJAS P. & GONZALEZ M. (2000). Haemocytic parasitosis in the farmed oyster *Tiostrea chilensis*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **20**, 31–33.

CARNEGIE R.B., BURRESON E.M., HINE P.M., STOKES N.A., AUDEMARD C., BISHOP M.J. & PETERSON C.H. (2006). *Bonamia perspora* n. sp. (Haplosporidia), a parasite of the oyster *Ostreaola equestris*, is the first *Bonamia* species known to produce spores. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **53**, 232–245.

CARNEGIE R.B. & COCHENNEC-LAUREAU N. (2004). Microcell parasites of oysters: Recent insights and future trends. *Aquat. Living Res.*, **17**, 519–528.

- COCHENNEC N., LE ROUX F., BERTHE F. & GERARD A. (2000). Detection of *Bonamiaostreae* based on small subunit ribosomal probe. *J. Invertebr. Pathol.*, **76**, 26–32.
- COCHENNEC N., REECE K.S., BERTHE F.C.J. & HINE P.M. (2003). Revisiting *Mikrocytos roughleyi* taxonomic affiliation points to the genus *Bonamia* (Haplosporidia). *Dis. Aquat. Org.*, **54**, 209–217.
- CORBEIL S., ARZUL I., DIGGLES B., HEASMAN M., CHOLLET B., BERTHE F.C. & CRANE M.S. (2006a). Development of a TaqMan PCR assay for the detection of *Bonamia* species. *Dis. Aquat. Org.*, **71**, 75–80.
- CORBEIL S., ARZUL I., ROBERT M., BERTHE F.C.J., BESNARD-COCHENNEC N. & CRANE M.S.J. (2006b). Molecular characterization of an Australian isolate of *Bonamia exitiosa*. *Dis. Aquat. Org.*, **71**, 81–85.
- CRANFIELD H.J., DUNN A., DOONAN I.J. & MICHAEL K.P. (2005). *Bonamia exitiosa* epizootic in *Ostrea chilensis* from Foveaux Strait, southern New Zealand between 1986 and 1992. *ICES J. Mar. Sci.*, **62**, 3–13.
- DIGGLES B.K., COCHENNECLAUREAU N. & HINE P.M. (2003). Comparison of diagnostic techniques for *Bonamia exitiosus* from flat oysters *Ostrea chilensis* in New Zealand. *Aquaculture*, **220**, 145–156.
- DIGGLES B.K. & HINE P.M. (2002). *Bonamia exitiosus* epidemiology in Foveaux Strait oysters. Final research report, OYS1999/01, Ministry of Fisheries, New Zealand. 51 pp. (unpublished report held in NIWA library, Wellington).
- DINAMANI P., HINE P.M. & JONES J.B. (1987). Occurrence and characteristics of the haemocyte parasite *Bonamia* sp. in the New Zealand dredge oyster *Tiostrea lutaria*. *Dis. Aquat. Org.*, **3**, 37–44.
- DOONAN I.J., CRANFIELD H.J. & MICHAEL K.P. (1994). Catastrophic reduction of the oyster, *Tiostrea chilensis* (Bivalvia: Ostreidae), in Foveaux strait, New Zealand, due to infestation by the protistan *Bonamia* sp. *NZ J. Mar. Freshwater Res.*, **28**, 335–344.
- FARLEY C.A., WOLF P.H. & ELSTON R.A. (1988). A long-term study of 'microcell' disease with a description of a new genus, *Mikrocytos* (g. n.), and two new species, *Mikrocytos mackini* (sp. n.) and *Mikrocytos roughleyi* (sp. n.). *Fishery Bull.*, **86**, 581–593.
- HILL K.M., CARNEGIE R.B., ALOUI-BEJAOU N., EL GHARSALLI R., WHITE D.M., STOKES N.A. & BURRESON G.M. (2010). Observation of a *Bonamia* sp. infecting the oyster *Ostrea stentina* in Tunisia, and a consideration of its phylogenetic affinities. *J. Invertebr. Pathol.*, **103**, 179–185.
- HINE P.M. (1991a). The annual pattern of infection by *Bonamia* sp. in New Zealand flat oysters, *Tiostrea chilensis*. *Aquaculture*, **93**, 241–251.
- HINE P.M. (1991b). Ultrastructural observations on the annual infection pattern of *Bonamia* sp. in flat oysters *Tiostrea chilensis*. *Dis. Aquat. Org.*, **11**, 163–171.
- HINE P. M. (1996). The ecology of *Bonamia* and decline of bivalve molluscs. *NZ J. Ecol.*, **20**(1), 109–116.
- HINE P.M. (2002). Severe apicomplexan infection in the oyster *Ostrea chilensis*: a predisposing factor in bonamiosis. *Dis. Aquat. Org.*, **51**, 49–60.
- HINE P.M., COCHENNEC-LAUREAU N. & BERTHE F.C.J. (2001). *Bonamia exitiosus* n. sp. (Haplosporidia) infecting flat oysters *Ostrea chilensis* (Philippi) in New Zealand. *Dis. Aquat. Org.*, **47**, 63–72.
- HINE P.M., DIGGLES B.K., PARSONS M.J.D., PRINGLE A. & BULL B. (2002). The effects of stressors on the dynamics of *Bonamia exitiosus* Hine, Cochennec-Laureau and Berthe, infections in flat oysters *Ostrea chilensis* (Philippi). *J. Fish Dis.*, **25**, 545–554.
- HINE P.M. & JONES J.B. (1994). *Bonamia* and other aquatic parasites of importance to New Zealand. *NZ J. Zool.*, **21**, 49–56.
- HINE P.M. & WESNEY B. (1994). Interaction of phagocytosed *Bonamia* sp. (Haplosporidia) with haemocytes of oysters *Tiostrea chilensis*. *Dis. Aquat. Org.*, **20**, 219–229.
- KROECK M.A. & MONTES J. (2005). Occurrence of the haemocyte parasite *Bonamia* sp in flat oysters *Ostrea puelchana* farmed in San Antonio Bay (Argentina). *Dis. Aquat. Org.*, **63**, 231–235.

LYNCH S.A., ABOLLO E., RAMILLO A., CAO A., CULLOTY S.C. & VILLALBA A. (2010). Observations raise the question if the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, can act as either a carrier or a reservoir for *Bonamia ostreae* or *Bonamia exitiosa*. *Parasitology*, **137**, 1515–1526.

MIALHE E., BOULO V., ELSTON R., HILL B., HINE M., MONTES J., VAN BANNING P. & GRIZEL H. (1988). Serological analysis *Bonamia* in *Ostrea edulis* and *Tiostrea lutaria* using polyclonal and monoclonal antibodies. *Aquat. Living Res.*, **1**, 67–69.

NARCISI V., ARZUL I., CARGINI D., MOSCA F., CALZETTA A., TRAVERSA D., ROBERT M., JOLY J.P., CHOLLET B., RENAULT T. & TISCAR P.G. (2010). Detection of *Bonamia ostreae* and *Bonamia exitiosa* (*Haplosporidia*) in *Ostrea edulis* from the Adriatic Sea (Italy). *Dis. Aquat. Org.*, **89**, 79–85.

PICHOT Y., COMPS M., TIGE G., GRIZEL H. & RABOUIN M.A. (1979). Recherches sur *Bonamia ostreae* gen. n., sp. n., parasite nouveau de l'huitre plate *Ostrea edulis* L. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.*, **43**, 131–140.

*
* *

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la Infección por *Bonamia exitiosa* (puede consultarse en la Tabla del final de este *Manual Acuático* o en la página web de la OIE: www.oie.int).

INFECCIÓN POR *BONAMIA OSTREAE*

1. Ámbito de aplicación

Bonamia ostreae es un parásito protozoario del filo Haplosporidia (Carnegie & Cochenne-Laureau, 2004; Lopez-Flores *et al.*, 2007) que infecta hemocitos de la ostra europea, *Ostrea edulis*, e induce trastornos de la fisiología y finalmente la muerte del animal (Grizel, 1985). A efectos de este capítulo, la infección por *Bonamia ostreae* se considera una infección por *B. ostreae*. Esta definición excluye infecciones por *B. exitiosa* (Hine *et al.*, 2001), *B. roughleyi* (Cochennec *et al.*, 2003) y *B. perspora* (Carnegie *et al.*, 2006). Los casos de *Bonamia* spp. que no estén identificados a nivel de especie deben remitirse al Laboratorio de Referencia de la OIE correspondiente.

2. Información sobre la enfermedad

2.1. Factores del agente

2.1.1. El agente patógeno, cepas del agente

Bonamia ostreae (Pichot *et al.*, 1979), no se ha identificado ninguna cepa.

2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

Hasta un 58% de los parásitos purificados de ostras intensamente infectadas parece sobrevivir tras 1 semana en agua de lechos marinos a 15°C (Arzul *et al.*, 2009).

2.1.3. Estabilidad del agente (métodos eficaces de inactivación)

Se ha observado que un baño en ácido peracético (al 0,001% y al 0,005%) reduce la contaminación de las ostras por *B. ostreae* (Grizel, 1985).

2.1.4. Ciclo de vida

El ciclo de vida fuera del hospedador no se conoce, pero es posible que se produzca una transmisión del parásito directamente de hospedador a hospedador por cohabitación o por inoculación de parásitos purificados (Hervio *et al.*, 1995), lo cual sugiere que no se precisa hospedador intermediario.

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Hospedador natural: Ostra europea, *Ostrea edulis*.

Especies de ostra infectadas cuando se trasladan a zonas endémicas de *B. ostreae*: *Ostrea puelchana*, *O. angasi*, *O. chilensis* (= *Tiostrea chilensis*, *T. lutaria*) (Carnegie & Cochenne-Laureau, 2004). No obstante, en estos hospedadores el parásito no se ha identificado hasta nivel de especie.

Pruebas experimentales han indicado una baja infectividad por *B. ostreae* en *Crassostrea ariakensis* (Audemard *et al.*, 2005).

Se ha establecido la hipótesis de que *Ostrea conchaphila* (= *O. lurida*) y *Crassostrea angulata* pueden resultar infectadas por *B. ostreae* (Carnegie & Cochenne-Laureau, 2004), pero no se ha logrado un diagnóstico.

En trabajos experimentales se ha observado que las siguientes especies no son susceptibles a *B. ostreae*: *C. gigas*, *Ruditapes decussatus*, *R. philippinarum*, *Mytilus edulis* y *M. galloprovincialis* (Culloty *et al.*, 1999).

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

O. edulis tanto de 0+ como de 1+ año de edad es susceptible al parásito y puede desarrollar una alta prevalencia e intensidad de infección, e incluso mortalidades a lo largo de un periodo de 6 meses (Lynch *et al.*, 2005). No obstante, los ejemplares de más de 2 años parecen ser más susceptibles a la enfermedad (Culloty & Mulcahy, 1996; Grizel, 1985; Engelsma *et al.*, 2010). Los ejemplares para siembra procedentes de poblaciones salvajes parecen estar significativamente más parasitados que las ostras procedentes de viveros (Conchas *et al.*, 2003).

Recientemente se ha observado que las larvas pueden resultar infectadas por *B. ostreae* (Arzul *et al.*, 2010).

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

Ostrea edulis es la única especie conocida susceptible en condiciones naturales, cuya intensidad de infección aumenta al mismo tiempo que la mortalidad con la edad y/o tamaño de las ostras (Culloty & Mulcahy, 1996; Grizel, 1985).

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

Bonamia ostreae es un protozoo intrahemocítico (Comps *et al.*, 1980; Pichot *et al.*, 1979) pero puede observarse extracelularmente entre células epiteliales o intersticiales en las branquias y el estómago, así como en zonas de tejido conjuntivo necrótico. También se ha observado una localización intraepitelial en branquias (Montes *et al.*, 1994) y en tejido ovárico (Van Banning, 1990). Las infecciones avanzadas se convierten en sistémicas. En las larvas, el parásito se ha detectado en el epitelio que circunda la cavidad visceral (Arzul *et al.*, 2010).

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

La infección a menudo es mortal, en función del hospedador y de las condiciones ambientales.

2.2.6. Vectores

Se ha estudiado el posible papel de los macroinvertebrados bentónicos y del zooplancton en el ciclo de vida de *B. ostreae*. La ofiura de espinas finas, *Ophiothrix fragilis*, se ha identificado como posible vector del parásito (Lynch *et al.*, 2006).

El resultado positivo en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) observado en *Crassostrea gigas* sugiere que esta especie podría actuar como portador o reservorio de *B. ostreae* (Lynch *et al.*, 2010).

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

También existen poblaciones salvajes de ostra europea, *Ostrea edulis*, infectadas por *B. ostreae*.

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mecanismos de transmisión

Es posible que se produzca una transmisión directa entre hospedadores. La forma infectiva y las vías de entrada y de salida siguen sin conocerse. El parásito se ha observado en larvas incubadas en la cavidad paleal de ostras adultas, lo cual sugiere una posible transmisión entre estos dos grupos de edad. Así pues, las larvas podrían contribuir a la diseminación del parásito durante su vida planctónica (Arzul *et al.*, 2010). En general, tiene lugar un lapso de tiempo de al menos 3 meses antes de poder detectar el parásito en lotes que estaban libres de la enfermedad y que han sido trasladados a zonas infectadas.

2.3.2. Prevalencia

La prevalencia es variable (de entre el 0% y el 80%), y más alta en individuos de más de 2 años. La enfermedad tiene lugar y puede transmitirse a lo largo de todo el año, pero existe una variación estacional en la infección por *B. ostreae*, de modo que la prevalencia de la infección aumenta a partir de otoño y alcanza un pico a finales de invierno/principios de primavera (Arzul *et al.*, 2006; Culloty & Mulcahy, 1996; Grizel, 1985; Engelsma *et al.*, 2010).

2.3.3. Distribución geográfica

Se ha observado infección por *B. ostreae* en Europa (Francia, Irlanda, Italia, Países Bajos, Portugal, España y el Reino Unido), Canadá (Columbia Británica) y Estado Unidos (los estados de California, Maine y Washington) (Carnegie & Cochenec-Laureau, 2004).

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

La infección de ostra europea, tanto salvaje como cultivada, suele ser letal, y suelen morir en el momento de máxima intensidad de la infección.

2.3.5. Factores ambientales

La supervivencia de los parásitos purificados y mantenidos en agua de mar es inferior a los 25°C que a los 4°C o 15°C (Arzul *et al.*, 2009). Las salinidades altas (35, 40 y 45 ups) parecen favorecer la supervivencia del parásito (Arzul *et al.*, 2009). La prevalencia muestra un patrón anual que puede diferir en función de la zona, de modo que aumenta a partir de otoño y presenta un pico a finales de invierno/principios de primavera. En general se observan dos picos, que tienen lugar en invierno/primavera y en otoño (Arzul *et al.*, 2006; Culloty & Mulcahy, 1996). Las temperaturas más bajas y las salinidades más altas del verano inducen una mayor prevalencia en el siguiente invierno (Arzul *et al.*, 2006). *Ostrea edulis* parece ser más susceptible a *B. ostreae* tras los periodos de menor disponibilidad de alimento y menores salinidades (Engelsma *et al.*, 2010).

2.4. Control y prevención

2.4.1. Vacunación

Ninguna.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

Ninguno.

2.4.3. Inmunoestimulación

Ninguna.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

Se ha observado que la selección genética a favor de la resistencia es eficaz para reducir la susceptibilidad a *B. ostreae* y la mortalidad que causa (Naciri-Graven *et al.*, 1998).

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

Las especies resistentes de *Ostrea edulis* desarrolladas mediante una cría selectiva podría constituir una alternativa en las zonas infectadas.

2.4.6. Agentes bloqueantes

Ninguno.

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

No se dispone de datos.

2.4.8. Prácticas generales de manejo

Las mortalidades causadas por la bonamiosis pueden reducirse utilizando cultivos en suspensión, menores densidades de población o bien cultivando *Ostrea edulis* con *Crassostrea gigas*, que no es susceptible de forma natural a la infección (Carnegie & Cochenec-Laureau, 2004). Los ejemplares de ostras para siembra procedentes de viveros son preferibles a los procedentes de poblaciones naturales, puesto que estos últimos parecen estar considerablemente más parasitados (Conchas *et al.*, 2003).

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

Como muestra deben escogerse prioritariamente individuos moribundos o que acaben de morir (2 o más años de edad) con el fin de aumentar la probabilidad de hallar ostras infectadas. Para la histología, solo deben escogerse ostras vivas (pueden incluirse moribundas).

La obtención de muestras debe organizarse de modo que se lleve a cabo una vez al año, en el momento de máxima prevalencia. Cuando no se disponga de esta información en un ecosistema determinado, la obtención de muestras deberá llevarse a cabo preferiblemente a finales de invierno-principios de primavera o en otoño (Arzul *et al.*, 2006; Culloty & Mulcahy, 1996; Engelsma *et al.*, 2010).

3.2. Conservación de las muestras para su envío

Para la histología, el mejor conservante es el AFA del Davidson, pero la formalina tamponada al 10% u otros fijadores estándar para histología también son aceptables. Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), las muestras deben conservarse en etanol al 95-100% y en alcohol no desnaturalizado.

3.3. Combinación de varias muestras

La combinación de muestras podría ser interesante, pero no se ha evaluado su posible impacto en el rendimiento de las pruebas de diagnóstico.

3.4. Órganos y tejidos de elección

Para el diagnóstico de *B. ostreae* mediante histología se utilizan cortes de 3-5 µm de grosor que incluyan las branquias, el manto, la gónada y la glándula digestiva. Para ciertas pruebas, como las improntas o la PCR, lo mejor es utilizar tejido de las branquias y/o del corazón.

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

Cualquier tejido distinto de las branquias, el corazón y el manto es menos adecuado.

4. Métodos de diagnóstico

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

Los signos clínicos son ostras muertas o moribundas, pero estos signos clínicos no son patognomónicos de la infección por *B. ostreae*, de modo que podrían indicar otras infecciones.

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Incapacidad de cerrar la concha cuando se les saca del agua.

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

La anatomopatología macroscópica incluye en ocasiones una coloración amarilla, así como extensas lesiones que incluyen úlceras perforadas en los tejidos conjuntivos de las branquias, el manto y la glándula digestiva (Comps *et al.*, 1980). Los signos macroscópicos no son patognomónicos de la infección por *B. ostreae* y la mayoría de ostras infectadas tiene un aspecto normal.

4.2.2. Bioquímica clínica

Ninguna.

4.2.3. Anatomopatología microscópica

Infiltraciones densas de hemocitos, algunas de las cuales contienen parásitos, en el tejido conjuntivo de la branquia y el manto, y en los senos vasculares que envuelven el estómago y el intestino, que pueden observarse en cortes fijados (Comps *et al.*, 1980).

4.2.4. Preparaciones húmedas

Ninguna.

4.2.5. Improntas

Pueden observarse microorganismos esféricos u ovoides (de 2-5 μm de ancho) dentro de los hemocitos en improntas de corazón o de branquias.

4.2.6. Microscopía electrónica/citopatología

En la infección avanzada, se puede observar el parásito dentro de los hemocitos.

4.3. Métodos de detección e identificación del agente

4.3.1. Métodos directos de detección

4.3.1.1. Métodos microscópicos

4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

No es aplicable.

4.3.1.1.2. Improntas

Muestras a obtener: tejidos blandos de ostra europea, y ventrículo cardíaco o branquias de hospedadores vivos de 2 años de edad o más.

Procedimiento técnico: tras secar los tejidos sobre papel absorbente, se realizan varias improntas sobre un porta de vidrio. Los portas se secan al aire, se fijan en metanol o en etanol absoluto y se tiñen empleando un kit comercial de tinción de sangre, siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras enjuagarlos en agua de grifo y secarlos, los portas se montan con un cubreobjetos empleando una resina sintética adecuada. Los portas se observan primero a 200 aumentos y a continuación en aceite de inmersión a 1.000 aumentos.

Controles positivos: son recomendables y pueden adquirirse en el Laboratorio de Referencia de la OIE.

Niveles de validación:

- *Especificidad y sensibilidad:* la especificidad es baja, pero la sensibilidad es mejor que el examen histológico (Da Silva & Villalba, 2004). No obstante, parece ser que la técnica de la impronta de corazón no es fiable para detectar infecciones latentes.
- *Método de referencia:* la sensibilidad de las improntas de tejido es mayor que la de la histología, que es el método de referencia, aunque no aquellas no son específicas de la especie de parásito.

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo es la presencia de pequeños microorganismos esféricos u ovoides (de 2-5 μm de ancho) dentro de hemocitos. No obstante, el parásito también podría observarse extracelularmente. Estos microorganismos presentan un citoplasma basófilo y un núcleo eosinófilo (los colores pueden variar en función de la tinción utilizada) y, dado que se esparcen sobre el porta, en las improntas pueden parecer más anchos que en las preparaciones histológicas. Se han observado células multinucleadas. Esta técnica no es específica de la especie de parásito.
- En especies susceptibles que se encuentren en la zona geográfica en la que se sabe que hay infección por *B. ostreae*, un resultado positivo es muy indicativo de infección por *B. ostreae* o *B. exitiosa*.

- En otras especies de fuera de la zona geográfica en la que se sabe que hay infección por *B. ostreae*, un resultado positivo indica infección por una especie de *Bonamia* que tendrá que confirmarse en el Laboratorio de Referencia de la OIE.

Disponibilidad de pruebas comerciales: se comercializan kits de tinción rápida (por ejemplo, Hemacolor®).

4.3.1.1.3. Cortes fijados

4.3.1.1.3.1. Histología

Muestras a obtener: ostras vivas o que acaben de morir.

Procedimiento técnico: los cortes de tejido que incluyan branquias, glándula digestiva, manto y gónada deben fijarse durante 24 horas en fijador de Davidson o en otros fijadores estándar para histología, como formalina tamponada al 10%, y a continuación debe aplicarse un procedimiento normal para la inclusión en parafina y la tinción, por ejemplo, con hematoxilina y eosina. Las observaciones se llevan a cabo con aumentos cada vez mayores hasta llegar a los 1.000.

Controles positivos: son recomendables y pueden adquirirse en el Laboratorio de Referencia de la OIE.

Niveles de validación:

- *Especificidad y sensibilidad:* la especificidad es menor, pero la sensibilidad es buena para la detección en infecciones de intensidad moderada a alta, y baja en el caso de infecciones de baja intensidad.
- *Método de referencia:* la histología es el método de referencia y el que se recomienda para la vigilancia en zonas solo infectadas por *B. ostreae*. Sin embargo, en zonas donde cohabitan *B. exitiosa* y *B. ostreae*, un resultado positivo en la histología tendrá que confirmarse por caracterización molecular.

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo es la presencia de parásitos en forma de células muy pequeñas, de 2-5 µm de ancho, dentro de los hemocitos o libres en el tejido conjuntivo o el epitelio de los senos de las branquias, del intestino y del manto, que a menudo se asocian a una intensa reacción inflamatoria. Para evitar posibles dudas, un resultado solo se considerará positivo si se observan parásitos dentro de hemocitos. Esta técnica no es específica de especie.
- En especies susceptibles de la zona geográfica en la que se sabe que hay infección por *B. ostreae*, un resultado positivo es muy indicativo de infección por *B. ostreae* o *B. exitiosa*.
- En otras especies o fuera de la zona geográfica en la que se sabe que hay infección por *B. ostreae*, un resultado positivo indica infección por una especie de *Bonamia* que tendrá que confirmarse en el Laboratorio de Referencia de la OIE.

Disponibilidad de pruebas comerciales: no se dispone de ninguna.

4.3.1.1.3.2. Microscopía electrónica de transmisión

Muestras a obtener: ostras vivas o que acaben de morir.

Procedimiento técnico: debe fijarse un pequeño trozo de tejido (1-2 mm) en glutaraldehído al 3% (en agua de mar filtrada por un tamaño de poro de 0,22 µm [FSW]) durante 1 hora, lavarse tres veces en FSW, fijarse en ácido ósmico al 1% y lavarse dos veces más con FSW. Tras la deshidratación en baños sucesivos de etanol, y dos baños de óxido de propileno, las muestras deben impregnarse progresivamente e incluirse en Epon. Tras la polimerización a 60°C, deben realizarse cortes de los bloques de 0,5-1 µm de espesor para el control de calidad, y después de 80-100 nm para el examen al microscopio electrónico. Se depositan cortes ultrafinos en rejillas de malla de cobre y se les aplica una tinción de contraste utilizando acetato de uranilo y citrato de plomo.

Controles positivos: ninguno.

Niveles de validación:

- *Especificidad y sensibilidad:* la especificidad es mejor que la de las improntas o la histología. La microscopía electrónica de transmisión (MET) puede ayudar a diferenciar *B. ostreae* de otras microcélulas estrechamente relacionadas, como *B. exitiosa*.

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo es la presencia de parásitos dentro de los hemocitos. Se han observado varias fases, como los uninucleados, los diplocarióticos y los plasmodiales (Montes *et al.*, 1994; Pichot *et al.*, 1979). Las estructuras intracelulares son las mitocondrias, los haplosporosomas, el aparato de Golgi y microtúbulos intranucleares persistentes.
- Las formas densas de *B. ostreae* son más densas y ligeramente más pequeñas (diámetro medio de 64 parásitos = $2,4 \pm 0,5 \mu\text{m}$) que *B. exitiosa* (diámetro medio de 61 parásitos = $3 \pm 0,3 \mu\text{m}$) y tienen menos haplosporosomas, perfiles mitocondriales y cuerpos lipídicos por corte de ultraestructura, así como unas mitocondrias tubulovesiculares más grandes que *B. exitiosa*. Además, las formas densas de *B. ostreae* carecen de complejos de aparato de Golgi/copa nuclear unidos a la membrana nuclear, y de fase vacuolada (Hine *et al.*, 2001).

Disponibilidad de pruebas comerciales: no se dispone de ninguna.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente*4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales*

Ninguno disponible.

4.3.1.2.2. Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos

Se ha desarrollado una técnica de inmunofluorescencia basada en anticuerpos monoclonales y se ha observado que tiene una sensibilidad similar a la de las improntas de tejido. No obstante, esta técnica ha dado resultados poco claros cuando se ha aplicado de forma extensa a ostras de Maine, EE.UU. (Carnegie & Cochenne-Laureau, 2004). Aunque en su momento se desarrolló un inmunoanálisis directo en sándwich con anticuerpos monoclonales para la detección de *B. ostreae* en muestras de hemolinfa de *O. edulis* (Cochennec *et al.*, 1992) y se comercializó durante unos pocos años a mediados de los 90, ya no se comercializa. La especificidad y sensibilidad de esta última técnica en comparación con la histología son del 76,7% y del 106%, respectivamente (Cochennec *et al.*, 1992).

*4.3.1.2.3. Técnicas moleculares**4.3.1.2.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*

Muestras a obtener: ostras vivas o que acaben de morir.

Procedimiento técnico: las muestras de tejido se introducen en etanol al 95-100% o se congelan hasta que se extrae el ADN. La extracción del ADN se lleva a cabo mediante digestión con proteinasa K durante toda la noche a 50-55°C, y extracción con fenol-cloroformo con precipitación mediante etanol (Carnegie *et al.*, 2000; Cochenne *et al.*, 2000) o la metodología de la columna de centrifugación empleando kits comerciales (como el de QIAGEN) (Carnegie *et al.*, 2000).

Se han desarrollado tres protocolos de PCR convencional para *Bonamia ostreae* con tres pares de cebadores distintos que acceden al ADN de la subunidad pequeña (SSU):

El primer par de cebadores es 5'-CAT-TTA-ATT-GGT-CGG-GCC-GC-3' y 5'-CTG-ATC-GTC-TTC-GAT-CCC-CC-3', denominados Bo y Boas, respectivamente, y amplifica un producto de 300 pb (Cochennec *et al.*, 2000). Las mezclas para PCR contienen tampón (KCl 500 mM, Tris/HCl 100 mM [pH 9,0 a 25°C] y Triton[®] X-100 al 1%), MgCl₂ 2,5 mM, mezcla de las distintas dNTP, cada una a una concentración 0,2 mM, los cebadores directo e inverso a una concentración 1 μM , 0,02 unidades μl^{-1} de ADN polimerasa Taq, y 0,2 ng μl^{-1} del ADN molde en un volumen total de 50 μl . Las muestras se desnaturalizan en un termociclador durante 5 minutos a 94°C antes de ser sometidas a 30 ciclos (94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto) seguidos de una extensión final de 10 minutos a 72°C.

El segundo par de cebadores es 5'-CGG-GGG-CAT-AAT-TCA-GGA-AC-3' y 5'-CCA-TCT-GCT-GGA-GAC-ACA-G-3', denominados C_F y C_R, respectivamente, y amplifica un producto de 760 pb (Carnegie *et al.*, 2000). La mezcla para la PCR contiene tampón (Tris/HCl 200 mM [pH 8,4], KCl

500 mM), $MgCl_2$ 1,5 mM, una mezcla de cada una de las dNTP, cada una a una concentración 0,2 mM, los cebadores directo e inverso, a una concentración 0,05 μM , 0,05 unidades μl^{-1} de ADN polimerasa Taq, y 1 ng μl^{-1} de ADN molde en un volumen total de 50 μl . Las muestras se someten a 35 ciclos (94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto) seguidos de una extensión final de 10 minutos a 72°C.

El tercer par de cebadores es 3'-CAA-TGG-TGC-GTT-CAA-CGA-T-5' y 3'-GGG-TTC-GCG-GTT-GAA-TTT-TA-5', denominados BoosF03 y BoosR03, respectivamente, y amplifica un producto de 352 pb (Engelsma *et al.*, 2010). La mezcla para la PCR contiene tampón (1×), $MgCl_2$ 2 mM, una mezcla de cada una de las dNTP, cada una a una concentración 0,2 mM, los cebadores directo e inverso, a una concentración 0,4 μM , 2 unidades de ADN polimerasa Taq en agua destilada con Nonidet P-40 al 0,005% (v/v) y 2 μl del ADN molde en un volumen total de 50 μl . Las muestras se desnaturalizan en un termociclador durante 2 minutos a 94°C antes de ser sometidas a 40 ciclos (94°C durante 30 segundos, 58°C durante 30 segundos, 72°C durante 45 segundos) seguidos de una extensión final de 7 minutos a 72°C.

Existen dos PCR TaqMan que también pueden emplearse:

Una PCR TaqMan en la que se emplean cebadores y sonda que acceden al ITS1 (espaciador transcrito interno) detecta *Bonamia* spp. (Corbeil *et al.*, 2006). La sensibilidad ha sido buena y esta prueba no amplifica *Haplosporidium nelsoni*, *H. costale* ni *Mikrocytos mackini*. No obstante, no está del todo validada.

Para la detección de *B. ostreae* también se ha desarrollado otra PCR TaqMan en la que se emplean cebadores y sonda que acceden a una pequeña región (de 67 pb) del ADNr de la subunidad pequeña (SSU) (Marty *et al.*, 2006). Los cebadores y la sonda se diseñaron para ser específicos de *Bonamia* spp. y no amplifican otros miembros del filo Haplosporidia. La sensibilidad y la especificidad son buenas y mejores que las de la histopatología.

Por último, se ha desarrollado una PCR en tiempo real SYBR® Green para detectar y cuantificar *B. ostreae* (Robert *et al.*, 2009). Esta prueba tiene por diana una región de 201 pb del gen de la actina 1 del parásito. Se ha observado que esta prueba solo tiene por diana *B. ostreae* y no parásitos estrechamente relacionados, como *B. exitiosa*. El límite inferior de detección es de 50 copias del gen y la prueba parece ser al menos diez veces más sensible que la PCR convencional. Se ha observado una buena correlación entre la semi-cuantificación del parásito mediante impronta de corazón y esta PCR en tiempo real.

Controles positivo/negativo: son obligatorios. Los controles positivos son: 1) PCR con cebadores específicos del ADN genómico de un hospedador intensamente infectado o ADN de parásitos purificados; 2) amplificación inespecífica (de actina, SSU, etc.). Los controles negativos son: 3) reacción de ADN distinto de las secuencias diana; 4) PCR con cebadores específicos del ADN genómico de hospedadores no infectados. Los controles positivos pueden adquirirse previa petición en el Laboratorio de Referencia de la OIE.

Niveles de validación:

- **Especificidad y sensibilidad:** teniendo en cuenta la similitud entre las secuencias de ADN diana de los haplosporidios microcelulares (Cochennec *et al.*, 2000), la primera PCR convencional debe amplificarlas todas, y la segunda (Carnegie *et al.*, 2000) debe amplificar al menos *B. ostreae* y *B. exitiosa* (Carnegie & Cochennec-Laureau, 2004); la tercera parece amplificar solo *B. ostreae* (Engelsma *et al.*, 2010). La sensibilidad de estas pruebas es mayor que la de los métodos histocitológicos. Las dos PCR TaqMan detectan *Bonamia* spp. pero no otros miembros del filo Haplosporidia. LA PCR en tiempo real SYBR® Green solo detecta *B. ostreae*.
- **Método de referencia:** se calculó la sensibilidad y la especificidad de la primera PCR convencional (Cochennec *et al.*, 2000) respecto a los métodos histocitológicos (histología e improntas de branquias) y se observó que eran del 92% y del 87%, respectivamente. Se calculó sensibilidad y la especificidad de los métodos histocitológicos (histología e improntas de branquias) respecto a la primera PCR convencional (Cochennec *et al.*, 2000) y se observó que eran del 66% y del 97%, respectivamente (Balseiro *et al.*, 2006). También se ha evaluado la sensibilidad y la especificidad de la segunda PCR TaqMan e inicialmente se ha estimado que son del 88% y del 99%, respectivamente.

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo es un amplicón del tamaño adecuado, cuando todos los controles negativos dan resultados negativos y todos los controles positivos dan resultados positivos.
- Ninguna prueba es específica de especie. La secuencia del ADN del gen de la SSU de *B. ostreae* presenta polimorfismo respecto al de *B. exitiosa*, *B. roughleyi* o *B. perspora* según se observa en el análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) tras digerir con *Hae* II y *Bgl* I el producto de la PCR ejecutada con los cebadores Bo-Boas. Los perfiles obtenidos varían en función de la especie de parásito. *Bonamia ostreae*, *B. perspora* y *B. exitiosa* presentan el mismo perfil (dos productos de 115 y 189 pb) cuando se digieren con *Hae* II, mientras que el producto de *B. roughleyi* no se digiere. El perfil de *B. ostreae* consiste en dos bandas de 120 y 180 pb cuando se digiere con *Bgl* I, mientras que *B. exitiosa*, *B. perspora* y *B. roughleyi* no se digieren (Cochennec *et al.*, 2003; Hine *et al.*, 2001).
- En especies susceptibles de la zona geográfica en la que se sabe que hay infección por *B. ostreae*, un resultado esperado en la PCR-RFLP, junto con un resultado positivo en la histología o las improntas, permite confirmar la infección por *B. ostreae*;
- En otras especies o fuera de la zona geográfica en la que se sabe que hay infección por *B. ostreae*, un resultado esperado en la PCR-RFLP, junto con un resultado positivo en la histología o las improntas, es muy indicativo de infección por *B. ostreae*, pero para confirmar el diagnóstico es necesario secuenciar el producto de la PCR y, si es posible, realizar una observación mediante MET.

Disponibilidad de pruebas comerciales: no se dispone de ninguna.

4.3.1.2.3.2. Hibridación in-situ (ISH)

Muestras a obtener: ostras vivas o que acaben de morir.

Procedimiento técnico: se han desarrollado dos protocolos de ISH. En el primero (Cochennec *et al.*, 2000) se emplea una sonda de 300 pb marcada con digoxigenina, y en el segundo (Carnegie *et al.*, 2003) se emplean tres sondas de oligonucleótidos marcadas con fluoresceína. Todas estas sondas acceden al ADN del gen de la SSU. Se introducen las muestras de tejido en fijador de Davidson durante 24 horas y a continuación se incluyen en parafina. Se realizan cortes de 5 µm de espesor, se depositan sobre portas recubiertos de silano y después se hornean durante toda la noche en un horno a 50-60°C. Tras desparafinarlos, los portas se tratan con proteinasa K (100 µg ml⁻¹) en tampón TE (Tris 50 mM, EDTA [ácido etilendiaminotetraacético] 10 mM) a 37°C durante 30 minutos en el primer protocolo o en tampón PBS (solución salina tamponada con fosfato) (NaCl 150 mM, Na₂HPO₄ 12,5 mM, KH₂PO₄ 3 mM, pH 7,2) durante 15 minutos a 37°C en el segundo protocolo.

- En el primer protocolo, los portas se deshidratan por inmersión en una serie de etanol y se secan al aire. A continuación, se recubren con tapón de hibridación (SSC 4x [citrito salino estándar; NaCl 60 mM, NaCl 600 mM, pH 7], formamida al 50%, solución de Denhardt 1x, 250 µg ml⁻¹ de ARNt de levadura, sulfato de dextrano al 10%) que contenga 20 ng de la sonda marcada con digoxigenina. Tras la desnaturalización durante 5 minutos a 95°C, se lleva a cabo la hibridación incubando los portas en una cámara húmeda durante toda la noche a 42°C. La sonda se produce por PCR empleando el par de cebadores Bo-Boas previamente descrito, con incorporación de digoxigenina. La PCR se lleva a cabo como se ha descrito en el apartado sobre PCR, excepto por el hecho de que se añade DIG dUTP 25 mM a la mezcla de reacción. Los pasos de detección se emprenden siguiendo las instrucciones del fabricante.
- En el segundo protocolo, tras el tratamiento con proteinasa K, los portas se lavan en varios baños incluyendo PBS más glicina al 0,2% durante 5 minutos, se acetilan empleando ácido acético anhidro al 5% en trietanolamina/HCl 0,1 M (pH 8), durante 10 minutos a temperatura ambiente, se lavan de nuevo en PBS durante 10 minutos y por último se equilibran en SET (NaCl 750 mM, EDTA 6,4 mM, Tris Base 100 mM) 5x durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después, los portas se cubren con 200 µl de tampón de prehibridación (SET 5x, albúmina de suero bovino al 0,02%, dodecilsulfato de sodio [SDS] al 0,025%) durante 30 minutos a 45°C. El tampón de prehibridación se sustituye por 10 a 12 µl del tampón de prehibridación que contenga 2-10 ng µl⁻¹ de los oligonucleótidos y los portas se incuban durante toda la noche en una cámara húmeda a 45°C. Después, los portas se lavan tres veces en SET 0,2x durante 5 minutos a 42°C, se secan al aire y se montan antes de proceder al examen mediante microscopio de epifluorescencia a 600-1.000 aumentos. Las sondas consisten en un cóctel de sondas marcadas con oligo-fluoresceína específicas de *B. ostreae*: UME-BO-1

(5'-CGA-GGC-AGG-GTT-TGT-3'); UME-BO-2 (5'-GGG-TCA-AAC-TCG-TTG-AAC-3') y UME-BO-3 (5'-CGC-TCT-TAT-CCA-CCT-AAT-3').

Controles positivo/negativo: son obligatorios. Los controles positivos son: 1) ISH en hospedador infectado; 2) ISH inespecífica (ADNr de SSU) en muestras. Los controles negativos son: 3) reacciones de ISH sin sonda; 4) ISH en hospedadores no infectados. Los controles positivos pueden adquirirse previa petición en el Laboratorio de Referencia de la OIE

Niveles de validación:

- **Especificidad y sensibilidad:** tanto la especificidad como la sensibilidad son más altas que en el examen histológico. No obstante, la sonda Bo-Boas puede detectar *Haplosporidium nelsoni* en *Crassostrea virginica* y *B. exitiosa* en *O. chilensis*, pero no *Mikrocytos mackini* en *C. gigas* (Cochennec *et al.*, 2000). Se ha comprobado y demostrado la especificidad del cóctel de oligosonda UME-BO-1, 2 y 3 para *H. nelsoni* (Carnegie *et al.*, 2003), pero es probable que esta prueba de ISH detecte otras microcélulas, incluida *B. exitiosa* (Carnegie & Cochennec-Laureau, 2004).
- **Método de referencia:** La ISH todavía no se ha validado respecto a la histopatología.

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo corresponde a parásitos marcados dentro de los hemocitos, siempre que todos los controles negativos den un resultado negativo, y que todos los controles positivos den un resultado positivo. En el primer protocolo descrito, aparecen en forma de manchas oscuras, mientras que en el segundo protocolo, corresponden a pequeños anillos verdes, que emiten fluorescencia verde alrededor de una región oscura excéntrica.
- En especies susceptibles de la zona geográfica en la que se sabe que hay infección por *B. ostreae*, un resultado positivo es muy indicativo de infección por *B. ostreae* o *B. exitiosa*.
- En otras especies o fuera de la zona geográfica en la que se sabe que hay infección por *B. ostreae*, un resultado positivo es indicativo de infección por una especie de *Bonamia* que tendrá que confirmarse en el Laboratorio de Referencia de la OIE.

Disponibilidad de pruebas comerciales: kit de detección del ácido nucleico con DIG (Boehringer Mannheim) para el primer protocolo.

4.3.1.2.3.3. Secuenciación

La secuenciación se recomienda como uno de los últimos pasos para la confirmación del diagnóstico. Las regiones diana son el ADNr de la SSU y el ITS1. Aunque las secuencias pueden consultarse en genotecas públicas, se recomienda remitir estos casos al Laboratorio de Referencia de la OIE correspondiente.

4.3.1.2.4. Purificación del agente

Bonamia ostreae puede purificarse a partir de ostras intensamente infectadas (Mialhe *et al.*, 1988). Se homogeneizan todos los órganos excepto el músculo aductor, y los parásitos se concentran mediante centrifugación diferencial en gradientes de sacarosa, y después se purifican mediante centrifugación isopícnica en un gradiente de Percoll.

4.3.2. Métodos serológicos

No son aplicables.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

A modo de ejemplo, los métodos actualmente disponibles para la vigilancia dirigida y el diagnóstico de la infección por *B. ostreae* se detallan en la Tabla 5.1. Las denominaciones utilizadas en la Tabla indican: a = el método es el recomendado por razones de disponibilidad, utilidad y especificidad y sensibilidad de diagnóstico; b = el método es estándar, con buena sensibilidad y especificidad de diagnóstico; c = el método tiene aplicación en algunas situaciones, pero el coste, la precisión u otros factores limitan seriamente su aplicación; y d = el método no se recomienda actualmente para este fin. Esta clasificación es de alguna forma subjetiva ya que la idoneidad implica cuestiones de fiabilidad, sensibilidad, especificidad y utilidad. Aunque no todas las pruebas incluidas en las categorías a o b se han sometido a estandarización y validación formales, su naturaleza sistemática y el hecho de que se hayan usado generalmente sin resultados dudosos las hace aceptables.

Tabla 5.1. Métodos de vigilancia dirigida y diagnóstico

Método	Vigilancia dirigida				Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
	Larvas	PL	Juveniles	Adultos		
Signos macroscópicos	d	d	c	c	c	d
Improntas de tejidos	d	d	a	a	a	c
Histopatología	d	d	a	a	b	c
ME de transmisión	d	d	d	d	d	a
Sondas de ADN – <i>in situ</i>	d	d	d	d	d	b
PCR y PCR TaqMan	a	a	a	a	a	c
PCR-RFLP	d	d	d	d	d	b
PCR en tiempo real SYBR® Green	a	a	a	a	a	a c
Secuenciación	d	d	d	d	d	a

PL = postlarvas; ME = microscopía electrónica; PCR = reacción en cadena de la polimerasa; RFLP = análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción.

6. Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de infección por *Bonamia ostreae*

Los métodos prescritos para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de infección, como se detalla en el *Código Acuático*, son los siguientes: improntas de tejido (corazón o branquias), histología o PCR en zonas infectadas solo por *B. ostreae*. No obstante, en zonas donde coexistan *B. exitiosa* y *B. ostreae*, un resultado positivo en la histología tendrá que confirmarse mediante caracterización molecular.

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

Todo resultado positivo, obtenido mediante cualquier técnica de diagnóstico, debe considerarse sospechoso.

7.2. Definición de caso confirmado

En especies susceptibles de la zona geográfica en la que se sabe que hay infección por *B. ostreae*, un caso confirmado de *B. ostreae* es un cualquier resultado positivo en improntas de tejido, histología o hibridación *in situ* junto con un resultado positivo en la PCR-RFLP con secuenciación o en la PCR en tiempo real SYBR® Green.

En otras especies hospedadoras o fuera de la zona geográfica en la que se sabe que hay infección por *B. ostreae*, se recomienda confirmar el caso mediante MET. No obstante, esta técnica solo es adecuada para muestras con altas intensidades de infección.

8. Bibliografía

ARZUL I., GAGNAIRE B., BOND C., CHOLLET B., MORGA B., FERRAND S., ROBERT M. & RENAULT T (2009). Effects of temperature and salinity on the survival of *Bonamia ostreae*, a parasite infecting flat oysters *Ostrea edulis*. *Dis. Aquat. Org.*, **85**, 67–75.

ARZUL I., LANGLADE A., CHOLLET B., ROBERT M., FERRAND S., OMNES E., LEROND S., COURALEAU Y., JOLY J.-P., FRANÇOIS C. & GARCIA C. (2010). Can the protozoan parasite *Bonamia ostreae* infect larvae of flat oysters *Ostrea edulis*? *Vet. Parasitol.*, doi:10.1016/j.vetpar.2011.01.060.

ARZUL I., MIOSEC L., BLANCHET E., GARCIA C., FRANÇOIS C. & JOLY J.-P. (2006). *Bonamia ostreae* and *Ostrea edulis*: a stable host-parasite system in France? Symposia proceedings, *ISVEE conference XI*, Cairns, Australia, 6–11 August 2006, 5 p.

AUDEMARD C., CARNEGIE R., STOKES N.A., BURRESON E. & BISHOP M. (2005). Salinity effects on the susceptibility to and persistence of *Bonamia ostreae* and *Bonamia* sp. in *Crassostrea ariakensis*. *J. Shellfish Res.*, **24**, 639.

BALSEIRO P., CONCHAS R.F., MONTES J., GOMEZ-LEON J., NOVOA B. & FIGUERAS A. (2006). Comparison of diagnosis techniques for the protozoan parasite *Bonamia ostreae* in flat oyster *Ostrea edulis*. *Aquaculture*, **261**, 1135–1143.

CARNEGIE R., BARBER B.J., CULLOTY S.C., FIGUERAS A.J. & DISTEL D.L. (2000). Development of a PCR assay for detection of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* and support for its inclusion in the *Haplosporidia*. *Dis. Aquat. Org.*, **42**, 199–206.

CARNEGIE R.B., BARBER B.J. & DISTEL D.L. (2003). Detection of the oyster parasite *Bonamia ostreae* by fluorescent *in situ* hybridization. *Dis. Aquat. Org.*, **55**, 247–252.

CARNEGIE R.B. & COCHENNEC-LAUREAU N. (2004). Microcell parasites of oysters: Recent insights and future trends. *Aquat. Living Resour.*, **17**, 519–528.

COCHENNEC N., HERVIO D., PANATIER B., BOULO V., MIALHE E., ROGIER H., GRIZEL H. & PAOLUCCI F. (1992). A direct monoclonal antibody sandwich immunoassay for detection of *Bonamia ostreae* (*Ascetosporea*) in hemolymph samples of the flat oyster *Ostrea edulis* (*Mollusca: Bivalvia*). *Dis. Aquat. Org.*, **12**, 129–134.

COCHENNEC N., LE ROUX F., BERTHE F. & GERARD A. (2000). Detection of *Bonamia ostreae* based on small subunit ribosomal probe. *J. Invertebr. Pathol.*, **76**, 26–32.

COCHENNEC N., REECE K.S., BERTHE F.C.J. & HINE P.M. (2003). Revisiting *Mikrocytos roughleyi* taxonomic affiliation points to the genus *Bonamia* (*Haplosporidia*). *Dis. Aquat. Org.*, **54**, 209–217.

COMPS M., TIGÉ G. & GRIZEL H. (1980). Etude ultrastructurale d'un protiste parasite de l'huître *Ostrea edulis* L. *L.C.R., Acad. Sc. Paris, Sér. D*, **290**, 383–385.

CONCHAS R.F., SANTAMARINA J., LAMA A., LONGA M.A. & MONTES J. (2003). Evolution of bonamiosis in Galicia (NW Spain). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **23**, 265–272.

CORBEIL S., ARZUL I., DIGGLES B., HEASMAN M., CHOLLET B., BERTHE F.C. & CRANE M.S. (2006). Development of a TaqMan PCR assay for the detection of *Bonamia* species. *Dis. Aquat. Org.*, **71**, 75–80.

CULLOTY S.C. & MULCAHY M.F. (1996). Season-, age-, and sex-related variation in the prevalence of bonamiosis in flat oysters (*Ostrea edulis* L.) on the south coast of Ireland. *Aquaculture*, **144**, 53–63.

CULLOTY S.C., NOVOA B., PERNAS M., LONGSHAW M., MULCAHY M.F., FEIST S.W. & FIGUERAS A. (1999). Susceptibility of a number of bivalve species to the protozoan parasite *Bonamia ostreae* and their ability to act as vectors for this parasite. *Dis. Aquat. Org.*, **37**, 73–80.

DA SILVA P.M. & VILLALBA A. (2004). Comparison of light microscopic techniques for the diagnosis of the infection of the European flat oyster *Ostrea edulis* by the protozoan *Bonamia ostreae*. *J. Invertebr. Pathol.*, **85**, 97–104.

ENGELSMA M.Y., KERKHOFF S., ROOZENBURG I., HAENEN O.L.M., VAN GOOL A., SISTERMANS W., WIJNHOFEN S. & HUMMEL H. (2010). Epidemiology of *Bonamia ostreae* infecting European flat oyster *Ostrea edulis* from Lake Grevelingen, The Netherlands. *Marine Ecology Progress Series*, **409**, 131–142.

GRIZEL H. (1985). Etudes des récentes épizooties de l'huître plate *Ostrea edulis* L. et de leur impact sur l'ostréiculture bretonne. Thèse de doctorat, Université des Sciences et Techniques de Languedoc, Montpellier, France.

HERVIO D., BACHERE E., BOULO V., COCHENNEC N., VUILLEMIN V., LE COGUIC Y., CAILLETAUX G., MAZURIE J. & MIALHE E. (1995). Establishment of an experimental infection protocol for the flat oyster *Ostrea edulis* with the intrahaemocytic

protozoan parasite *Bonamia ostreae*: application in the selection of parasite-resistant oyster. *Aquaculture*, **132**, 183–194.

HINE P.M., COCHENNEC-LAUREAU N. & BERTHE F.C.J. (2001). *Bonamia exitiosus* n. sp. (Haplosporidia) infecting flat oysters *Ostrea chilensis* (Philippi) in New Zealand. *Dis. Aquat. Org.*, **47**, 63–72.

LOPEZ-FLORES I., SUAREZ-SANTIAGO V.N., LONGET D., SAULNIER D., CHOLLET B. & ARZUL I. (2007). Characterization of actin genes in *Bonamia ostreae* and their application to phylogeny of the Haplosporidia. *Parasitology*, **134**, 1941–1948.

LYNCH S.A., ARMITAGE D.V., COUGHLAN J., MULCAHY M.F. & CULLOTY S.C. (2006). Investigating the possible role of benthic macroinvertebrates and zooplakton in the life cycle of the haplosporidian *Bonamia ostreae*. *Exp. Parasitol.* **115** (4), 359–368.

LYNCH S.A., ARMITAGE D.V., WYLDE S., MULCAHY M.F. & CULLOTY S.C. (2005). The susceptibility of young prespawning oysters, *Ostrea edulis*, to *Bonamia ostreae*. *J. Shellfish Res.*, **24**, 1019–1025.

LYNCH S.A., ABOLLO E., RAMILLO A., CAO A., CULLOTY S.C. & VILLALBA A. (2010). Observations raise the question if the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, can act as either a carrier or a reservoir for *Bonamia ostreae* or *Bonamia exitiosa*. *Parasitol.*, **137**, 1515–1526.

MARTY G., BOWER S., CLARKE K., MEYER G., LOWE G., OSBORN A., CHOW E., HANNAH H., BYRNE S., SOJONKY K. & ROBINSON J. (2006). Histopathology and a real-time PCR assay for detection of *Bonamia ostreae* in *Ostrea edulis* cultured in western Canada. *Aquaculture*, **261**, 33–42.

MIALHE E., BOULO V., ELSTON R., HILL B., HINE M., MONTES J., VAN BANNING P. & GRIZEL H. (1988). Serological analysis *Bonamia* in *Ostrea edulis* and *Tiostrea lutaria* using polyclonal and monoclonal antibodies. *Aquat. Living Resour.*, **1**, 67–69.

MONTES J., ANADON R. & AZEVEDO C. (1994). A possible life cycle for *Bonamia ostreae* on the basis of electron microscopy studies. *J. Invertebr. Pathol.*, **63**, 1–6.

NACIRI-GRAVEN Y., MARTIN A.G., BAUD J.P., RENAULT T. & GERARD A. (1998). Selecting the flat oyster *Ostrea edulis* (L.) for survival when infected with the parasite *Bonamia ostreae*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **224**, 91–107.

PICHOT Y., COMPS M., TIGE G., GRIZEL H. & RABOUIN M.A. (1979). Recherches sur *Bonamia ostreae* gen. n., sp. n., parasite nouveau de l'huitre plate *Ostrea edulis* L. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.*, **43**, 131–140.

ROBERT M., GARCIA C., CHOLLET B., LOPEZ-FLORES I., FERRAND S., FRANÇOIS C., JOLY J.-P. & ARZUL I. (2009). Molecular detection and quantification of the protozoan *Bonamia ostreae* in the flat oyster, *Ostrea edulis*. *Molecular Cellular Probes*, **23**, 264–271.

VAN BANNING P. (1990). The life cycle of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* with a presumptive phase in the ovarian tissue of the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Aquaculture*, **84**, 189–192.

*
* *

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la infección por *Bonamia ostreae* (puede consultarse en la Tabla del final de este *Manual Acuático* o en la página web de la OIE: www.oie.int).