CAPÍTULO 2.2.8.

ENFERMEDAD DE LA CABEZA AMARILLA

1. Ámbito de aplicación

A efectos de este capítulo, la enfermedad de la cabeza amarilla (ECA) se considera que es una infección causada por el virus de la enfermedad de la cabeza amarilla (VECA).

2. Información sobre la enfermedad

2.1. Factores del agente

2.1.1. El agente patógeno, cepas del agente

El virus de la enfermedad de la cabeza amarilla (genotipo 1) es uno de los seis genotipos conocidos del complejo de virus de la cabeza amarilla y es el único agente conocido de la ECA. Se designa como genotipo 2 al virus asociado a las branquias (VAB). El VAB y otros cuatro genotipos conocidos del complejo (los genotipos 3-6) se presentan generalmente en *Penaeus monodon* sanos del este de África, de Asia y de Australia, y casi nunca o nunca se asocian a enfermedad (Walker *et al.,* 2001, Wijegoonawardane *et al.,* 2008a). El VECA y otros genotipos del complejo de la cabeza amarilla son clasificados por la Comisión Internacional de Taxonomía de Virus como las únicas especies del género *Okavirus*, de la familia Roniviridae, del orden de los Nidovirales (Cowley *et al.*, 2012). Existen indicios de la existencia de recombinación genética entre los genotipos (Wijegoonawardane *et al.*, 2009).

Los viriones del VECA son partículas baciliformes con envoltura (40–60 nm × 150–200 nm). Las envolturas están repletas de prominentes espículas que sobresalen unos 11 nm de la superficie. Las nucleocápsidas tienen una simetría helicoidal (y un diámetro de 20-30 nm), con una periodicidad de 5-7 nm. Los viriones están formados por tres proteínas estructurales (nucleoproteína p24 y glucoproteínas de envoltura gp64 y gp116) y un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo de unas 26 kb.

2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

El VECA permanece viable en agua de mar aireada hasta 72 horas (Flegel *et al.*, 1995b).

2.1.3. Estabilidad del agente (métodos eficaces de inactivación)

El VECA puede inactivarse aplicando 60°C durante 15 minutos (Flegel *et al.*, 1995b). El VECA se inactiva calentándolo a 60°C durante 15 minutos (Flegel *et al.*, 1995b). Se dispone de poca información sobre otros métodos de inactivación, pero el virus parece ser susceptible al tratamiento con cloro a 30 partes por millón (0, 03 mg ml^{-1}) (Flegal *et al.,* 1997).

2.1.4. Ciclo de vida

No se han notificado infecciones por el VECA de alta multiplicidad en cultivo celular. Una infección a una multiplicidad de infección de 0,001 en cultivo celular primario de órgano linfoide ha indicado que el máximo título vírico se obtiene a los 4 días post-infección. En *P. monodon* tienen lugar signos clínicos de ECA en un plazo de 7-10 días tras la exposición. El VECA se replica en el citoplasma de células infectadas en las que hay abundantes precursores filamentosos largos de las nucleocápsidas y los viriones germinan hacia el interior de vesículas citoplásmicas en disposiciones paracristalinas densamente concentradas para salir a nivel de la membrana citoplásmica (Chantanachookin *et al.,* 1993).

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Solo se han notificado brotes de la ECA en el langostino jumbo (*P. monodon*) y en el camarón patiblanco *(P. vannamei*) (Chantanachookin *et al.,* 1993; Senapin *et al.,* 2010). Sin embargo, también se han detectado infecciones naturales en el langostino japonés (*P. japonicus*), el langostino banana (*P. merguiensis*), el camarón azul (*P. stylirostris*), el camarón blanco norteño (*P. setiferus*), el camarón resbaloso (*Metapenaeus ensis*), el camarón rosna (*Palaemon styliferus*) y el krill (*Acetes* sp.). Otras especies de camarones peneidos y palemónidos, gambas y krills en los que se ha notificado susceptibilidad a la infección experimental son los siguientes: el langostino tigre marrón (*P. esculentus*),

el camarón café norteño (*P. aztecus*), el camarón rosado norteño (*P. duorarum*), el camarón rabo verde (*Metapenaeus bennettae*), el camarón krakatoa (*Macrobrachium sintangense*), el camarón carpintero (*Palaemon serrifer*), el camarón de pasta (*Ascetes* sp.) y *Palaemonetes pugio* (Ma *et al.,* 2009). Cada especie tiene una susceptibilidad distinta a la enfermedad. En pruebas de laboratorio se ha observado que el VECA puede causar una alta mortalidad en *P. monodon, P. vannamei, P. stylirostris, P. aztecus, P. duorarum, M. sintangense, P. styliferus* y *P. serrifer* (Lightner *et al.*, 1998; Longyant *et al.*, 2005; 2006; Ma *et al.,* 2009). En un estudio realizado con 16 especies de cangrejo obtenidas de las proximidades de piscifactorías de camarones de Tailandia, no se observaron indicios de susceptibilidad a la infección, ni natural ni experimental (Longyant *et al.*, 2006). Se ha llevado a cabo una revisión crítica de la susceptibilidad de los crustáceos a la enfermedad de la cabeza amarilla y de las implicaciones de la inclusión en la legislación europea (Stentiford *et al*., 2009).Se ha detectado el VAB (virus asociado a la branquia) en *P. monodon* y en *P. esculentus* (Walker *et al.,* 2001). Hasta ahora solo se han detectado otros genotipos del complejo del VECA en *P. monodon* (Wijegoonawardane *et al.*, 2008a).

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

Penaeus monodon es susceptible a la infección por el VECA a partir del estadio de PL15 (Khongpradit *et al.*, 1995). Las infecciones experimentales con el VAB indican que los ejemplares de *P. japonicus* más grandes (~20 g) son menos susceptibles a la enfermedad que los más pequeños (~6–13 g) de la misma especie (Spann *et al.*, 2000).

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

Entre las especies de camarones susceptibles, la única que se sabe que resulta afectada con frecuencia (con una prevalencia de hasta el 100%) por el virus del complejo de la cabeza amarilla (genotipos 2–6) es *P. monodon* sano, que parece ser el hospedador natural (Walker *et al.*, 2001; Wijegoonawardane *et al.*, 2008a; 2009). Sin embargo, las infecciones por el VECA (genotipo 1) se suelen detectar solo en caso de enfermedad y no aparecen con frecuencia en *P. monodon* sanos, aunque sí se han detectado en poblaciones salvajes sanas de *P. stylirostris* (Castro-Longoria *et al.,* 2008). Durante los brotes de enfermedad en los estanques, la prevalencia de la infección por el VECA puede considerarse alta. Se han detectado infecciones naturales por el VECA en *P. japonicus, P. merguiensis, P. setiferus, M. ensis,* y *P. styliferus* (Cowley et al., 2002; Flegel *et al.*, 1995a; 1995b), pero se dispone de poca información sobre la prevalencia natural.

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

Los tejidos diana del VECA, que son de origen ectodérmico y mesodérmico, son el órgano linfoide, los hemocitos, el tejido hematopoyético, las laminillas de las branquias y el tejido conjuntivo esponjoso del subcutis, el intestino, la glándula antenal, las gónadas, los tractos nerviosos y los ganglios (Chantanachookin *et al.,* 1993; Lightner, 1996).

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

El VAB persiste como infección crónica en *P. esculentus* supervivientes durante al menos 50 días tras la exposición experimental (Spann *et al.*, 2003). La alta prevalencia de la infección por el VAB y otros virus del complejo de la cabeza amarilla (genotipos 2-6) en todos los estadios de vida de *P. monodon* sanos sugiere que son frecuentes las infecciones crónicas de por vida (Walker *et al.*, 2001; Wijegoonawardane *et al.*, 2008a). También existen indicios de la persistencia del VECA (genotipo 1) en supervivientes a la infección experimental (Longyant *et al.*, 2005; 2006).

2.2.6. Vectores

No existen vectores conocidos del VECA.

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

La susceptibilidad a la infección y la persistencia a largo plazo indican la posibilidad de que una amplia variedad de camarones peneidos y palemónidos salvajes actúen como portadores.

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mecanismos de transmisión

La infección por el VECA se puede transmitir horizontalmente mediante inyección, ingesta de tejido infectado, inmersión en extractos de tejidos que contengan agua marina filtrados para estar libres de bacterias, o por cohabitación de camarones nunca antes infectados con camarones infectados (Flegel *et al.*, 1995b; Lightner, 1996). También se ha demostrado infección de camarones por inyección de extractos del camarón de pasta (*Ascetes* sp.) obtenido de estanques infectados (Flegel *et al.*, 1995a). En el caso del VAB, se ha observado que se produce transmisión vertical de la infección a la descendencia,

desde progenitores tanto machos como hembras, probablemente por contaminación superficial o infección del tejido que envuelve el huevo fecundado (Cowley *et al.,* 2002). No se ha estudiado la dinámica de la infección por el VECA en estanques, pero la rápida acumulación de mortalidades durante los brotes de enfermedad sugiere una transmisión horizontal muy eficaz.

2.3.2. Prevalencia

La prevalencia de la infección por los virus del complejo de la cabeza amarilla en *P. monodon* sanos (según la detección mediante la reacción en cadena de la polimerasa [PCR] es muy alta (50-100%) en la mayoría de poblaciones salvajes y de piscifactoría analizadas en Australia, Asia y el este de África así como en piscifactorías de *L. vannamei* en México (Cowley *et al*., 2004; Castro-Longoria *et al.,* 2008; Sánchez-Barajas *et al.*, 2009; Walker *et al.*, 2001; Wijegoonawardane *et al.*, 2008a). La prevalencia de cada genotipo depende del origen geográfico del camarón. Por el contrario, excepto en situaciones de brotes de enfermedad en estanques de acuicultura, la prevalencia del VECA (genotipo 1) es con mayor frecuencia baja (>1%) en *P. monodon* sano salvaje o de piscifactoría. El uso de métodos de detección menos sensibles que la PCR anidada (como la histología, la inmunoelectrotransferencia, la transferencia puntual o la hibridación *in-situ*), es probable que en la mayoría de los casos informe de la prevalencia real de la infección en poblaciones de camarones que se están subestimando.

2.3.3. Distribución geográfica

La ECA se ha notificado en Taipei chino, Indonesia, Malasia, Filipinas, Sri Lanka, Tailandia y Vietnam (Walker *et al.*, 2001). Se han detectado VAB y otros genotipos del complejo de la cabeza amarilla en *P. monodon* sanos de Australia, Taipei chino, India, Indonesia, Malasia, Mozambique, Filipinas, Tailandia y Vietnam (Wijegoonawardane *et al.*, 2008a). También se ha detectado el VECA en *P. vannamei* de piscifactorías de México (Castro-Longoria *et al.,* 2008; Sánchez-Barajas *et al.*, 2009).

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

Dado que *P. monodon* se cría en estanques, la enfermedad causada por el VECA (genotipo 1) puede causar hasta un 100% de mortalidad en estanques de *P. monodon* infectados en un plazo de 3-5 días tras la aparición de los signos clínicos (Chantanachookin *et al.,* 1993). El VAB (genotipo 2) se ha asociado a mortalidades de hasta un 80% en estanques de *P. monodon* en Australia. Aunque pueden inducirse mortalidades experimentalmente por exposición al VECA o al VAB, mediante bioanálisis se ha observado que el VECA es mucho más virulento (~10^6 veces más, según el cálculo de la dosis letal 50 [DL_{50}]) (Oanh *et al.,* 2011). Los genotipos 3, 4, 5 y 6 todavía no se han asociado a esta enfermedad (Wijegoonawardane *et al.*, 2008a).

2.3.5. Factores ambientales

La amplificación del virus y la enfermedad asociada pueden desencadenarse por un estrés fisiológico inducido por cambios repentinos en el pH o el oxígeno disuelto, o por otros factores ambientales (Flegel *et al*., 1997). El hecho de que la virulencia del VECA sea mucho más alta que la del VAB y de otros genotipos parece garantizar que el umbral de infección necesario para que aparezca la enfermedad sea mucho más fácil de alcanzar.

2.4. Control y prevención

2.4.1. Vacunación

No se ha desarrollado ningún método eficaz de vacunación.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

Todavía no se dispone de ningún producto antivírico comercial eficaz.

2.4.3. Inmunoestimulación

No se dispone de informes científicamente confirmados.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

Ninguna comunicada.

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

Todas las especies de camarón marino criadas comercialmente parecen ser susceptibles al VECA.

2.4.6. Agentes bloqueantes

La inyección a camarones de ARN bicatenario (ds) homólogo a regiones del gen ORF1a/1b del VECA o del VAB (que acceden así al ARN vírico de todo el genoma) puede inhibir la replicación vírica y prevenir mortalidades tras la exposición experimental. El mecanismo de acción antivírica parece incluir la interferencia por ARN (ARNi).

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

Ninguna notificada.

2.4.8. Prácticas generales de manejo

Para reducir el riesgo de esta enfermedad pueden utilizarse poblaciones libres de patógenos específicos (SPF) o negativas al virus según la PCR, así como agua y sistemas de cultivo bioseguros.

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

Para realizar el diagnóstico durante un brote de la enfermedad, los camarones moribundos que pueden obtenerse de los márgenes de los estanques son la fuente de elección de material para el análisis. También deben obtenerse camarones aparentemente normales de los mismos estanques. A efectos de vigilancia de signos de infección en poblaciones de camarones aparentemente sanos los estadios de vida de misis en adelante (misis, postlarvas [PL], juveniles o adultos) pueden constituir fuentes de tejido adecuadas para el análisis.

3.2. Conservación de muestras para su envío

Los camarones (o tejido de camarones moribundos) moribundos obtenidos para el aislamiento del virus deben congelarse de inmediato en el lugar en un líquido formado por hielo seco/alcohol y guardarse congelados en hielo seco, nitrógeno líquido o a -80°C. No es adecuado congelarlos a -20°C o temperaturas superiores.

Las muestras para el cribado molecular mediante PCR deben guardarse en un exceso mínimo de tres veces de etanol (absoluto) de grado reactivo analítico al 90%. No se recomienda utilizar etanol de grado inferior (de laboratorio o de grado industrial). También pueden utilizarse conservantes comerciales del ARN (como el RNAlater).

Las muestras para histología deben conservarse en fijador de Davidson. La formalina (10%) en agua marina puede ser una alternativa útil.

Las muestras para microscopía electrónica deben procesarse a partir de camarones vivos.

En el Capítulo 2.2.0 se ofrece orientación sobre la conservación de las muestras para cada método de diagnóstico.

3.3. Combinación de varias muestras

Para la detección de infecciones por el VECA en poblaciones grandes de camarones, la combinación de varias muestras es aceptable para el cribado o la vigilancia de lotes de fases de vida entre misis y PL de un tanque de vivero o bien de lotes de camarones juveniles en un estanque. Para el análisis mediante PCR, el tamaño de la muestra compuesta debe determinarse por la masa de tejido que puede procesarse sin comprometer un análisis. Las cantidades totales de camarones muestreados, tanto a modo de una sola muestra combinada como en forma de combinaciones múltiples más pequeñas, se escoge en función de la prevalencia esperable y del intervalo de confianza exigido en la detección. Lo habitual en poblaciones de más de 100.000 camarones, si la prevalencia de la infección supera el 5%, es para detectar el VECA con un límite de confianza del 95% se necesite un total de 60 animales analizados en muestras combinadas de los tamaños adecuados. Sin embargo, la detección definitiva puede resultar comprometida si las cargas de VECA en los camarones infectados son muy bajas o si se utilizan pruebas menos sensibles que la PCR de dos pasos o la PCR en tiempo real. Véase también el Capítulo 2.2.0.

3.4. Órganos o tejidos de elección

Los tejidos más adecuados de camarones moribundos sospechosos de estar infectados por el VECA son los del órgano linfoide y las branquias. Para el cribado o vigilancia de camarones juveniles o adultos que parezcan

macroscópicamente normales, el órgano más adecuado es el linfoide pero pueden utilizarse branquias o hemolinfa para el muestreo sin sacrificio en el caso de las fases comprendidas entre las misis y las PL.

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

Sin determinar.

4. Métodos de diagnóstico

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

El VECA puede infectar camarones de piscifactoría a partir del estadio de PL tardía en adelante, pero la mayor parte de la mortalidad tiene lugar en los estadios de juvenil temprano a tardío. Los camarones moribundos pueden presentar un aspecto general descolorido y un color amarillento en el cefalotórax debido a que el hepatopáncreas se encuentra debajo, y que puede estar excepcionalmente blando en comparación con el de los camarones normales, que es marrón. En muchos casos se produce una pérdida total de la producción en cuestión de días tras la aparición de los primeros signos macroscópicos de ECA en los camarones (Chantanachookin *et al.,* 1993). Aunque en los brotes de ECA siempre se observa un cese de la alimentación, una congregación en los márgenes de los estanques y un aspecto en general descolorido, estos rasgos de la enfermedad no son especialmente particulares de la ECA. Los otros signos macroscópicos, más patognomónicos, no siempre se observan y, por tanto, no son fiables, ni siquiera para un diagnóstico provisional de la ECA. Los signos macroscópicos de enfermedad por el VAB son una natación cerca de la superficie y en los márgenes de los estanques, el cese de la alimentación y un enrojecimiento del cuerpo y los apéndices, así como un cambio de color de las branquias, que pasan a ser rosas a amarillas (Spann *et al.*, 1997). Sin embargo, aunque estos signos tienen lugar con frecuencia en los camarones enfermos, no se consideran patognomónicos de la enfermedad del VAB. Los camarones crónicamente infectados por el VECA o el VAB presentan un aspecto y comportamiento normales.

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Puede producirse una actividad alimentaria excepcionalmente alta seguida de un cese repentino de la alimentación en un plazo de 2 a 4 días tras la aparición de los signos clínicos macroscópicos de enfermedad y mortalidad. Pueden acumularse camarones moribundos en los márgenes del estanque cerca de la superficie (Chantanachookin *et al.,* 1993).

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

Véase el apartado 4.1.

4.2.2. Bioquímica clínica

No está descrita.

4.2.3. Anatomopatología microscópica

Se fijan tejidos del cefalotórax de camarones moribundos sospechosos de estar afectados por el VECA en fijador de Davidson, se preparan cortes de tejido y se tiñen con hematoxilina y eosina (H/E) de Meyer utilizando procedimientos histológicos estándar (Lightner, 1996). Se examinan los cortes mediante microscopía óptica y se averigua si presentan cantidades moderadas a altas de inclusiones citoplasmáticas intensamente basófilas, teñidas de manera uniforme, esféricas, de unos 2 µm de diámetro o más pequeñas en los tejidos de origen ectodérmico y mesodérmico (Chantanachookin *et al.,* 1993). Los tejidos del órgano linfoide, la subcutícula del estómago y las branquias son especialmente útiles.

4.2.4. Preparaciones húmedas

Se fijan camarones enteros o filamentos de branquias en fijador de Davidson (Lightner, 1996) durante toda la noche. Tras la fijación, se lavan bien algunos filamentos de branquias con agua de grifo para eliminar el fijador, y se tiñen con la tinción de hematoxilina y eosina (H/E) de Meyer (Lightner, 1996). Tras la tinción y la deshidratación, cuando el tejido está en xileno, se coloca un filamento de branquia sobre un porta de microscopio en una gota de xileno y, utilizando un par de agujas finas (un microscopio estéreo es útil), se rompen varios filamentos secundarios. Se sustituye el filamento principal en xileno donde

pueda guardarse indefinidamente como referencia permanente en un vial cerrado. Con cuidado de no dejar que el xileno se seque, se separan los filamentos secundarios sobre un porta y se retiran todos los fragmentos grandes o partículas que pudieran espesar la preparación innecesariamente. Por último, se añade una gota de líquido de montaje y un cubreobjetos. Se aplica una ligera presión para allanar la preparación lo máximo posible. Este procedimiento también puede utilizarse con capas finas de tejido subcuticular. Se examina al microscopio óptico mediante el objetivo de x40. En el caso de las muestras de brotes de ECA, se observarán cantidades moderadas a grandes de inclusiones citoplasmáticas intensamente basófilas, teñidas de manera uniforme, esféricas (de unos 2 µm de diámetro o menos) (Flegel *et al.,* 1997). Este hallazgo debe utilizarse junto con los resultados de los frotis de hemolinfa (véase abajo) para establecer un diagnóstico provisional de un brote de ECA. En cuanto a los tejidos y filamentos fijados en xileno, estos portas de preparaciones completas pueden guardarse como registro permanente.

Si se precisan resultados rápidos, el paso de la fijación puede acortarse a solo 2 horas cambiando el ácido acético del fijador de Davidson por HCl al 50%. Para optimizar los resultados, este fijador no debe guardarse más que durante unos pocos días antes de su uso. Tras la fijación, se lava bien para eliminar el fijador y se comprueba que el pH haya vuelto casi a la neutralidad antes de teñir. No se fija durante periodos más largos ni a temperaturas superiores a los 25°C, puesto que ello podría dar lugar a lesiones tisulares excesivas que dificultarían o imposibilitarían la interpretación.

4.2.5. Frotis

En el caso de camarones moribundos procedentes de brotes de ECA, los frotis de hemolinfa no son útiles porque los hemocitos suelen estar muy reducidos en las fases avanzadas de la enfermedad. Deben obtenerse muestras de hemolinfa de camarones macroscópicamente normales procedentes de un estanque sospechoso donde también se hayan obtenido camarones moribundos. Se extrae la hemolinfa con una jeringa que contenga dos volúmenes de formalina al 25% o bien de fijador de Davidson, en cuya fórmula el ácido acético se habrá sustituido por agua o por formalina. Se mezcla bien, sin hacer caso de los coágulos del interior de la jeringa, se deposita una gota en un porta, se realiza el frotis y a continuación se seca al aire antes de teñir con H/E u otras tinciones estándar de frotis de sangre. Se deshidrata, se añade líquido de preparación y se coloca un cubreobjetos. Se examina al microscopio óptico mediante un objetivo de x40. En el caso de muestras de brotes de la ECA, algunos de los frotis presentarán cantidades moderadas a altas de hemocitos con núcleos cariorrécticos o picnóticos. Es importante que los portas con estos núcleos no presenten signos de infección bacteriana concomitante, puesto que las infecciones bacterianas pueden causar alteraciones similares en los hemocitos. Un diagnóstico provisional de un brote de ECA deberá basarse en los resultados de los frotis de hemolinfa y los resultados de preparaciones completas realizadas con tinciones rápidas (véase arriba) o de cortes hísticos teñidos.

4.2.6. Microscopía electrónica/citopatología

Para la microscopía electrónica de transmisión (MET), los tejidos más adecuados de camarones moribundos sospechosos de estar infectados por el VECA son los del órgano linfoide y de las branquias. Para el cribado o la vigilancia de camarones macroscópicamente normales, el tejido más adecuado es el órgano linfoide.

Se aturden camarones vivos mediante inmersión en agua helada solo hasta que queden inmovilizados, o bien se sacrifican mediante una inyección de fijador. Se diseccionan rápidamente y se toman pequeños trozos de tejido diana (de no más de unos pocos mm de diámetro) y se fijan en al menos 10 volúmenes de glutaraldehído al 6% mantenido a 4°C y tamponado con solución de cacodilato de sodio ($Na[CH_3]2AsO_2.3H2O$) (8,6 g de cacodilato de Na, 10 g de NaCl, agua destilada para llegar a los 100 ml, ajustado a pH 7 con HCl 0,2 N) o solución de fosfato (0,6 g de $NaH_2PO_4.H_2O$, 1,5 g de Na_2HPO_4, 1 g de NaCl, 0,5 g de sacarosa, agua destilada para llegar a los 100 ml, se ajusta a pH 7 con HCl 0,2 N). Se fijan durante al menos 24 horas antes de procesarlos. En el caso de un almacenaje largo en fijador a 4°C, se reduce el glutaraldehído al 0,5-1,0%. El procesado consiste en la post-fijación con tetróxido de osmio al 1%, deshidratación, inclusión, corte y tinción con acetato de uranilo y citrato de plomo según los métodos estándar de MET. Los reactivos utilizados para este procedimiento se han descrito en otra parte (Lightner, 1996).

En el citoplasma de células infectadas por el VECA, se observan tanto precursores de la nucleocápsida como viriones con envoltura completos. Los precursores de la nucleocápsida son filamentos largos de unos 15 nm de diámetro y de longitud variable (80-450 nm) que aparecen en el citoplasma, a veces densamente concentrados en series paracristalinas. Los viriones son partículas baciliformes con envoltura (40–60 nm × 150–200 nm) con los extremos redondeados y protuberancias prominentes (8–11 nm) que sobresalen de la superficie. Los viriones suelen observarse en el citoplasma de las células infectadas y junto a vesículas intracelulares. También pueden observarse germinando en la membrana

citoplasmática y en espacios intersticiales. Mediante MET no es posible diferenciar los viriones y las nucleocápsidas del VAB de los del VECA.

Los esferoides del órgano linfoide se observan a menudo en *P. monodon* sanos crónicamente infectados con el VECA o el VAB, y la enfermedad con frecuencia cursa con necrosis del órgano linfoide (Spann *et al.*, 1998). Sin embargo, la formación de esferoides y la degeneración del tejido del órgano linfoide también pueden tener lugar durante la infección con otros virus de camarones (Lightner, 1996).

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

Véase el apartado 4.2.4.

4.3.1.1.2. Frotis

Véase el apartado 4.2.5.

4.3.1.1.3. Cortes fijados

Véase el apartado 4.2.3.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

Aunque se dispone de métodos de cultivo primario de células de camarón, no se recomiendan para el aislamiento/identificación del VECA por el alto riesgo de contaminación con agentes extraños. Por el momento no existen líneas celulares continuas adecuadas para el cultivo del VECA.

4.3.1.2.2. Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos

Se preparan los reactivos y se llevan a cabo las pruebas según los protocolos de Lu *et al.* (1994) y Loh *et al.* (1998). Esto consiste en la purificación de viriones del VECA de camarones infectados en el laboratorio, la generación de inmunoglobulinas (Ig) en conejos blancos neozelandeses, la purificación de la IgG utilizando columnas de proteína G bacteriana recombinante y la extracción de antígenos de camarón normal de reacción cruzada, mediante adsorción en tejido de músculo y hemolinfa de camarón triturado y secado con acetona. Para la prueba se extraen 0,1 ml de hemolinfa de muestras de camarón vivo y se diluyen en un volumen igual de tampón citrato para utilizarlas de inmediato, o bien se almacenan a -80°C hasta que se utilicen. Para la inmunoelectrotransferencia, se utilizan 200 µl de la muestra, se clarifican a 8.000 ***g*** durante 5 minutos y a continuación se sedimenta el sobrenadante a 140.000 ***g*** durante 5 minutos. Se resuspenden los precipitados en 100 µl de tampón de carga 2x (2,5 ml de Tris/NCl 0,5 mM, a pH 6,8, 4 ml de dodecil sulfato de sodio [SDS] al 10%, 2 ml de glicerol, 1 µl de beta-mercaptoetanol y 0,5 ml de agua destilada desionizada) y se calientan a 95°C durante 5 minutos. Se carga una sub-muestra de 10 µl sobre gel de SDS/poliacrilamida al 5%, y se lleva a cabo la electroforesis a 200 V. Se transfiere el gel situándolo sobre una membrana de nitrocelulosa (tamaño de poro de 0,1 mm) en tampón de transferencia (3,03 g de Tris base, 14,4 g de glicina y 200 ml de metanol por litro) a 100 V durante 1 hora. Se lava la membrana con solución salina tamponada con fosfato (PBS), a pH 7,4, se empapa en leche desnatada al 5% (en PBS) durante 1 hora y se lava con PBS durante 5 minutos. A continuación, se trata la membrana con una dilución del anticuerpo primario (IgG) a 1/1000 durante 1 hora, se lava tres veces con PBS durante 5 minutos y a continuación se trata durante 1 hora con una dilución a 1/2.500 de anti-IgG de conejo generada en cabra conjugada a peroxidasa de rábano. Se lava de nuevo tres veces con PBS durante 5 minutos y a continuación se trata con substrato, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, hasta que aparece un color azulado/morado. Se detiene la reacción empapando la membrana en agua destilada. Todas las incubaciones deben llevarse a cabo a 25°C ± 2°C. Se utiliza una preparación vírica purificada como control positivo y se identifican 2-4 bandas de proteínas importantes características del VECA a 116, 64 y 20 kDa. La sensibilidad es de 0,4 ng de proteína de VECA ($\approx 10^6$ viriones del VECA).

4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

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

Existen tres métodos de RT-PCR descritos. El primer protocolo es una RT-PCR de un solo paso adaptado de Wongteerasupaya *et al.* (1997) que puede utilizarse para la confirmación del VECA en camarones obtenidos de brotes sospechosos de ECA. Este protocolo detectará solo el VECA y no el

VAB ni otros genotipos. El segundo protocolo es un procedimiento de RT-PCR anidada múltiple más sensible adaptado de Cowley *et al.* (2004). Puede utilizarse para la detección diferencial de VECA y VAB en camarones que se hallen en un brote de enfermedad, o bien para el cribado de portadores sanos. Esta prueba no detectará todos los genotipos conocidos del complejo de la cabeza amarilla, y el genotipo 3 puede reaccionar como VAB. Una marca (Farming IntelliGene Technology Corporation, Taipei chino) comercializa una forma modificada adecuada de esta prueba. La OIE tiene un proceso formal de validación y certificación de pruebas comerciales. En el sitio web de la OIE se puede consultar un listado de los kits comerciales de pruebas y fabricantes certificados. El tercer protocolo es un procedimiento de RT-PCR anidada múltiple sensible proporcionado por Wijegoonawardane *et al*. (2008b). Esta prueba se puede utilizar para la detección de virus del complejo de la cabeza amarilla a efectos del cribado de camarones sanos. Detecta los seis genotipos actualmente conocidos (incluidos el VECA y el VAB), pero no discrimina entre genotipos. La determinación del genotipo se logra mediante un análisis de la secuencia de nucleótidos del producto de la RT-PCR.

Preparación de la muestra: En el caso de camarones juveniles o adultos, para preparar ARN total pueden utilizarse órgano linfoide, tejido de branquias o hemolinfa. Es preferible el tejido fresco. El tejido de órgano linfoide y de branquias conservado en etanol de grado analítico al 95% o en RNAlater (disponible en distintas marcas), o bien almacenado congelado a –70°C también son adecuados para la preparación de ARN total. Se procesan 10-20 mg de tejido de órgano linfoide o de branquias o 50 µl de hemolinfa en 500 µl del reactivo Trizol™[1] y se extrae ARN total según el manual de instrucciones del producto. Se resuspende el ARN en 25 µl de agua tratada con DEPC (dietil-pirocarbonato), se calienta a 55°C durante 10 minutos, se enfría con hielo y se utiliza de inmediato o se guarda a -70°C hasta que sea necesario. Lo ideal es preparar una dilución a 1/200 (es decir, 2,5 µl de ARN en 500 µl de agua tratada con DEPC), y determinar las absorbancias A_{260} nm y A_{280} nm (se precisa un espectrofotómetro de UV) para cuantificar el ARN y comprobar su calidad (proporción aproximada de 2:1). La cantidad de ARN depende del tipo y frescor de los tejidos, así como de la calidad del conservante utilizado y del tiempo durante el cual se haya conservado. Sin embargo, las cantidades de ARN aproximadas extraídas de tejidos frescos oscilan entre los 0,2 y los 2,0 µg μl^{-1}, y las extraídas de tejidos conservados en alcohol, entre 0,1 y 1,0 µg μl^{-1}.

De un tanque de precriadero o vivero que contenga 100.000 PL o más, se toma una muestra de unas 1.000 PL de cinco puntos distintos. Se combinan las muestras en un estanque, se remueve suavemente el agua y a continuación se escoge y se analiza una muestra de cinco PL vivas que se extraen del centro del estanque. El tamaño de la muestra se determina según la prevalencia supuesta o la que se tenga por objetivo. Se homogeneiza la muestra en un volumen adecuado del reactivo Trizol™ y se extrae ARN según el manual de instrucciones del producto. En base al procedimiento estándar de extracción con Trizol™, se utilizan masas de tejido equivalentes a 25–30 × PL5, 15 × PL10 y 5 x PL5 y se produce ARN total de alta calidad libre de contaminación por proteínas.

Para cada grupo de muestras de ARN a analizar, deben incluirse agua tratada con DEPC y extractos que se sepa que contienen ARN del VECA y/o ARN del VAB (según la prueba) como controles negativo y positivo, respectivamente.

Protocolo 1: RT-PCR para la detección específica del VECA en camarones enfermos

Se mezclan 2 µl de ARN en 20 µl de tampón para PCR (Tris/HCl 10 mM, a pH 8,3, KCl 50 mM) que contenga 2,5 U de transcriptasa inversa del M-MLV (virus de la leucemia murina de Moloney), 1,0 U de inhibidor de la ribonucleasa, cebador antisentido (144R, abajo) 0,75 µM, cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP y dGTP) 5 mM, y $MgCl_2$ 5 mM, y se incuba a 42°C durante 15 minutos para sintetizar ADNc. A continuación, se incuba la mezcla a 100°C durante 5 minutos para inactivar la transcriptasa inversa y se deja enfriar la mezcla hasta los 5°C. Se añade la mezcla de la PCR (Tris/HCl 10 mM, pH 8,3, KCl 50 mM) que contiene 2,5 U de ADN polimerasa *Taq*, $MgCl_2$ 2 mM y cebador codificante 10F 0,75 µM para conseguir un volumen final de 100 µl. A no ser que el instrumento vaya equipado con una tapa calentada, se recubren los tubos con 100 µl de aceite mineral y se lleva a cabo la amplificación mediante PCR durante 40 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 58°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos y finalmente a 72°C durante 10 minutos. Se añaden 20 µl del producto amplificado de la PCR a geles de agarosa/TAE (Tris-acetato-EDTA [ácido etilendiaminotetraacético]) al 2% que contengan 0,5 µg ml^{-1} de bromuro de etidio y un marcador apropiado de ADN a modo de escala, y se realiza la detección mediante un transiluminador ultravioleta

La reacción positiva vendrá indicada por la presencia de un producto de 135 pb. La sensibilidad de esta prueba es de unos 0,01 pg de ARN purificado de VECA ($\approx 10^3$ genomas).

1 Las referencias a 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*.

Secuencias del cebador de la PCR:
10F: 5'-CCG-CTA-ATT-TCA-AAA-ACT-ACG-3'
144R: 5'-AAG-GTG-TTA-TGT-CGA-GGA-AGT-3'

Protocolo 2: RT-PCR anidada para la detección diferencial del VECA y del VAB en camarones sanos o enfermos

Para la síntesis de ADNc, se añaden 2 µl de ARN (lo ideal son 1,0 µg de ARN total, si se cuantifica) y 0,7 µl de cebador GY5 (50 pmol μl^{-1}) hasta un total de 6 µl en agua tratada con DEPC, se incuban a 70°C durante 10 minutos y se enfrían sobre hielo. Se añaden 2 µl de tampón Superscript II x 5 (Tris/HCl 250 mM, pH 8,3, KCl 375 mM, $MgCl_2$15 mM), 1 µl de DTT 100 mM y 0,5 µl de mezcla madre de dNTP 10 mM (es decir, dATP 10 mM, dTTP 10 mM, dCTP 10 mM, dGTP 10) y se mezcla suavemente. Se precalienta a 42°C durante 2 minutos, se añaden 0,5 µl de transcriptasa inversa (200 U μl^{-1}) y se incuba a 42°C durante 1 hora. A continuación, se calienta la reacción a 70°C durante 10 minutos, se enfría sobre hielo y se centrifuga brevemente en una microcentrífuga para recoger el contenido del tubo. Para el primer paso de la PCR, se prepara una mezcla de reacción de 50 µl que contenga tampón *Taq* 1x (Tris/HCl 10 mM, pH 8,3, KCl 50 mM, Triton X-100 al 0,1%), $MgCl_2$ 1,5 mM de, los cebadores GY1 y GY4, cada uno a una concentración 35 pM, cada una de las dNTP (dATP, dTTP, dCTP y dGTP) 200 µM y 2,5 U de polimerasa *Taq* en un tubo de pared fina de 0,5 ml. Se recubre la mezcla de reacción con 50 µl de parafina líquida, se calienta a 85°C durante 2-3 minutos y a continuación se añade 1 µl de ADNc. Se lleva a cabo la amplificación mediante PCR utilizando 35 ciclos a 95°C durante 30 segundos, 66°C durante 30 segundos y 72°C durante 45 segundos, seguidos de una extensión final a 72°C durante 7 minutos. Para el segundo paso de la PCR, se prepara una mezcla de reacción de 50 µl que contenga 2 µl del producto del primer paso de la PCR, tampón *Taq* 1x (arriba), $MgCl_2$ 1,5 mM, 35 pmol de los cebadores GY2, Y3 y G6, cada una de las dNTP (dATP, dTTP, dCTP y dGTP) 200 µM y 2,5 U de polimerasa *Taq* en un tubo de pared fina de 0,5 ml revestido con parafina líquida. Se lleva a cabo la PCR aplicando unas condiciones de amplificación iguales a las descritas anteriormente. Se añaden 10 µl del producto amplificado mediante la PCR a geles de agarosa/TAE al 2% que contengan 0,5 µg ml^{-1} de bromuro de etidio y un marcador apropiado de ADN a modo de escala, y se realiza la detección mediante un transiluminador ultravioleta.

Si la carga vírica es lo suficientemente alta, se amplificará un fragmento de ADN de 794 pb del VAB o del VECA en el primer paso de la PCR. En el segundo paso de la PCR, la presencia de un producto de 277 pb indicará la detección de VECA, y un producto de 406 pb indicará la detección del VAB. La presencia de productos tanto de 406 como de 277 pb indicará una infección dual con VAB y VECA. La sensibilidad de detección de la PCR de segundo paso es unas 1.000 veces superior a la de la PCR de un solo paso, y permite detectar ARN del VAB o del VECA hasta un límite de 10 fg de ARN total de órgano linfoide.

Las secuencias de los cebadores de la RT-PCR genéricos para el VAB y el VECA (GY) o específicos del VAB (G) o el VECA (Y) son las siguientes:
GY1: 5'-GAC-ATC-ACT-CCA-GAC-AAC-ATC-TG-3'
GY2: 5'-CAT-CTG-TCC-AGA-AGG-CGT-CTA-TGA-3'
GY4: 5'-GTG-AAG-TCC-ATG-TGT-GTG-AGA-CG-3'
GY5: 5'-GAG-CTG-GAA-TTC-AGT-GAG-AGA-ACA-3'
Y3: 5'-ACG-CTC-TGT-GAC-AAG-CAT-GAA-GTT-3'
G6: 5'-GTA-GTA-GAG-ACG-AGT-GAC-ACC-TAT-3'

NB: Se han encontrado problemas de especificidad de los cebadores para algunas cepas emergentes, por lo que todos los productos de la PCR generados al usar el protocolo 2 deben ser secuenciados para confirmar el genotipo del virus.

Protocolo 3: RT-PCR anidada para la detección de todos los genotipos del complejo de la cabeza amarilla actualmente conocidos (incluidos el VECA y el VAB).

Para la síntesis de ADNc, se mezclan 2 µl de ARN (lo ideal son 1,0 µg de ARN total, si se cuantifica), 50 ng de cebadores hexámeros aleatorios y 1,0 µl de dNTP 10 mM y se llega a un volumen total de 14 µl en agua estéril tratada con DEPC, se incuba a 65°C durante 5 minutos y se enfría sobre hielo. Se añaden 4,0 µl de tampón Superscript III x 5, 1,0 µl de DTT 100 mM, 1,0 µl de una solución de 40 U μl^{-1} de RNaseOUT^{TM} (Invitrogen) y 1,0 µl de una solución de 200 U μl^{-1} de transcriptasa inversa y se mezcla suavemente. Se incuba a 25°C durante 5 minutos y a continuación a 42°C durante 55 minutos, se detiene la reacción calentando a 70°C durante 15 minutos, se enfría sobre hielo y se centrifuga brevemente en una microcentrífuga para recoger el contenido del tubo. Para el primer paso de la PCR, se añade 1 µl de ADNc a una mezcla de reacción de 25 µl en total, que contenga tampón *Taq* 1x (Tris/HCl 10 mM, pH 9,0, KCl 50 mM, Triton X-100 al 0,1%), 1,5 µl de $MgCl_2$ 25 mM, 0,35 µl de

mezcla de cebador que contenga 25 pmol μl^{-1} de cada conjunto de cebadores (véase abajo) YC-F1ab y YC-R1ab, 0,5 µl de la mezcla de dNTP 10 mM y 0,25 µl de una solución de 5 U μl^{-1} de ADN polimerasa *Taq*. Se lleva a cabo la amplificación mediante la PCR utilizando una desnaturalización a 95°C durante 1 minuto seguida de 35 ciclos a 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos, 72°C durante 40 segundos, seguida de una extensión final a 72°C durante 7 minutos. Para el segundo paso de la PCR, se utiliza 1 µl del producto del primer paso de la PCR en la mezcla de reacción según se ha preparado anteriormente, pero sustituyendo las combinaciones de cebadores YC-F2ab y YC-R2ab. Se lleva a cabo la amplificación mediante la PCR utilizando una desnaturalización a 95°C durante 1 minuto seguida de 35 ciclos a 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos, seguida de una extensión final a 72°C durante 7 minutos. Se añaden 8 µl del producto amplificado de la PCR a geles de agarosa/TAE al 2% que contengan 0,5 µg ml^{-1} de bromuro de etidio y un marcador apropiado de ADN a modo de escala, y se realiza la detección mediante un transiluminador ultravioleta

Si la carga vírica es suficientemente alta, se amplifica un fragmento de ADN de 358 pb en el primer paso de la PCR. El segundo paso de la PCR (anidada) amplifica un producto de 146 pb. La detección de estos productos indica la presencia de uno de los seis genotipos del complejo de la cabeza amarilla. Si es necesario, se puede determinar exactamente de qué genotipo se trata mediante un análisis de la secuencia de nucleótidos de cualquier producto de la PCR, seguida de una comparación con las secuencias de los genotipos conocidos, mediante una alineación múltiple de la secuencia y un análisis filogenético. Las sensibilidades de detección de la PCR de primer paso y de la PCR anidada son de 2.500 y de 2,5 moldes de ARN, respectivamente.

Las secuencias de los cebadores de la PCR (cada cebador está formado por un conjunto de cantidades iguales de dos secuencias relacionadas de oligonucleótidos) son las siguientes:

Conjunto YC-F1ab:	5'-ATC-GTC-GTC-AGC-TAC-CGC-AAT-ACT-GC-3'
	5'-ATC-GTC-GTC-AGY-TAY-CGT-AAC-ACC-GC-3'
Conjunto YC-R1ab:	5'-TCT-TCR-CGT-GTG-AAC-ACY-TTC-TTR-GC-3'
	5'-TCT-GCG-TGG-GTG-AAC-ACC-TTC-TTG-GC-3'
Conjunto YC-F2ab:	5'-CGC-TTC-CAA-TGT-ATC-TGY-ATG-CAC-CA-3'
	5'-CGC-TTY-CAR-TGT-ATC-TGC-ATG-CAC-CA-3'
Conjunto YC-R2ab:	5'-RTC-DGT-GTA-CAT-GTT-TGA-GAG-TTT-GTT-3'
	5'-GTC-AGT-GTA-CAT-ATT-GGA-GAG-TTT-RTT-3'

Códigos de bases mixtas: R(AG), Y(CT), M(AC), K(GT), S(GC), W(AT), H(ACT), B(GCT), V(AGC), D(AGT), N(AGCT).

4.3.1.2.3. Hibridación in-situ

A continuación se describe el protocolo de Tang *et al.* (2002). Es un método adecuado para la detección tanto del VECA como del VAB (Tang y Lightner (1999). Para conservar el ARN vírico, se fijan camarones vivos con fijador de Davidson modificado, tamponado con solución neutra, sin ácido acético (fijador RF) (Hasson *et al.*, 1997). Para lograr una buena conservación del tejido y al mismo tiempo conservar la accesibilidad del ARN, puede utilizarse fijador normal de Davidson siempre que el tiempo de fijación no supere las 24 horas (máximo de 48 horas). Se procesan los camarones fijados utilizando métodos histológicos estándar y se realizan cortes de 4 µm de espesor sobre portas Superfrost Plus (Fisher Scientific, Pennsylvania, EE.UU.). Antes de la hibridación, se incuban los cortes a 65°C durante 45 minutos, se retira la parafina con Hemo-De (Fisher Scientific, Pennsylvania, EE.UU.) y se rehidratan pasándolos por una serie de diluciones de etanol en agua. Se digieren los cortes con proteinasa K (100 µg ml^{-1}, en Tris/HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 10 mM, EDTA 1 mM) durante 15 minutos a 37°C, y a continuación se post-fijan en formaldehído (0,4%) durante 5 minutos. Se lavan en SSC (citrato salino estándar) 2x, después se pre-hibridan con 500 µl de solución de pre-hibridación (SSC 4x, formamida al 50%, solución de Denhardt 1x, 0,25 mg ml^{-1}de ARN de levadura, 0,5 mg m^{-1} de ADN de esperma de salmón sonicado, sulfato de dextrano al 5%) a 42°C durante 30 minutos. Para la hibridación se recubren los cortes con 250 µl de solución de hibridación que contenga una sonda marcada con digoxigenina (20-40 ng ml^{-1}) a 42°C durante toda la noche. Al día siguiente, se lavan los cortes del siguiente modo: con SSC 2x una vez durante 30 minutos a temperatura ambiente; SSC 1x dos veces durante 5 minutos a 37°C; SSC 0,5x dos veces durante 5 minutos a 37°C. Se incuban los cortes con un suero de anticuerpos de oveja anti-digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina (Roche) a 37°C durante 30 minutos. Se lavan con una solución de Tris/HCl 0,1 M, pH 7,5, y NaCl 0,15 M dos veces durante 10 minutos a temperatura ambiente y con una solución de Tris/HCl 0,1 M, pH 9,5, y NaCl 0,1 M. Se incuban con nitroazul tetrazolio y con 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato en la oscuridad durante 1-2 horas para que aparezca color. Se aplica una tinción de contraste con Marrón Bismarck Y (0,5%), se rehidratan pasándolos por una serie de diluciones de etanol y Hemo-De, se añade Permount (Fisher Scientific, Pennsylvania, EE.UU.) y se cubren con un cubreobjetos. Las células infectadas por el VECA se tiñen de un color azul a negro-morado que destaca sobre la tinción

de contraste marrón. Se incluyen controles positivos de tejido infectado por el VECA y controles negativos de tejido de camarón no infectado. La sonda de diagnóstico se prepara mediante marcaje por PCR utilizando los siguientes cebadores:

VECA1051F: 5'-ACA-TCT-GTC-CAG-AAG-GCG-TC-3'
VECA1051R: 5'-GGG-GGT-GTA-GAG-GGA-GAG-AG-3'

4.3.1.2.3 Purificación del agente patógeno

El método de la purificación del agente patógeno se basa en el descrito por Wongteersupaya *et al.* (1995). Lo ideal es utilizar unos 250 ejemplares juveniles sanos de camarón *P. monodon* (unos 10 g) como fuente de virus para la purificación. Tras un periodo de varios días de aclimatación en tanques de 1.500 litros (unos 80 camarones/tanque) a una salinidad de 3,5 partes por mil (mg/ml), se inocula a cada camarón por vía intramuscular 100 µl de una suspensión a 1/100 de extracto de branquia infectada. El día 2 post-infección, se obtienen los camarones moribundos que presenten signos característicos de la ECA. Se extrae hemolinfa mediante una jeringa de los senos de la base de las patas locomotrices y se mezcla con cuidado sobre hielo con el mismo volumen de medio de hemolinfa de langosta (LHM) (NaCl 486 mM, $CaCl_2$ 15 mM, KCl 10 mM, $MgCl_2$ 5 mM, Na_2HPO_4 0,5 mM, $MgSO_4$ 8,1 mM, $NaHCO_3$ 36 mM, dextrosa al 0,05% en Medio Mínimo de Eagle's, a pH ajustado a 7,6 con NaOH 1 N). Se centrifuga la mezcla a 480 ***g*** durante 30 minutos a 4°C para extraer los detritos celulares. Tras la centrifugación, se desecha el sedimento y se vuelve a centrifugar el líquido sobrenadante a 100.000 ***g*** durante 1 hora a 4°C. Se desecha la fracción sobrenadante y se resuspende con cuidado el sedimento a 4°C durante toda la noche en 1 ml de LHM. Se deposita una capa de esta suspensión sobre un gradiente continuo de Urografin al 20-40% y se ultracentrifuga a 100.000 ***g*** durante 1 hora a 4°C. Tras la centrifugación, se recoge la banda vírica mediante una pipeta Pasteur y se vuelve a diluir con tampón NTE (EDTA 0,02 M, NaCl 0,2 M, Tris/HCl 0,2 M [pH 7,4]) hasta un volumen final de 12 ml. Se ultracentrifuga la suspensión a 100.000 ***g*** durante 1 hora a 4°C y se resuspende el sedimento (virus purificado) en 100 µl de tampón TE (Tris/HCl 10 mM, EDTA 1 mM [pH 7,4]) y se guarda en alícuotas de 20 µl a -80°C hasta que sea necesario.

4.3.1.2.4 Bioanálisis

El procedimiento del bioanálisis se basa en el descrito por Spann *et al.* (1998), pero otros varios autores han descrito procedimientos similares (Lu *et al.,* 1994). El bioanálisis debe llevarse a cabo en camarones susceptibles (véase el apartado 2.2 anterior) que hayan sido certificados como SPF y que procedan de instalaciones de cría bioseguras. Como alternativa, deberá realizarse un cribado de los camarones susceptibles salvajes o de piscifactoría que vayan a utilizarse para el bioanálisis, mediante una PCR anidada con transcripción inversa (RT) utilizando muestras de linfa, con el fin de confirmar la ausencia de infecciones crónicas pre-existentes por el VECA, el VAB o virus relacionados. Los camarones deben mantenerse a lo largo de todo el procedimiento en las condiciones óptimas de supervivencia de la especie en cultivo de laboratorio.

Se obtienen camarones moribundos de un brote de enfermedad o bien camarones que se sospeche que son portadores de la infección, y se mantienen a 4°C sobre hielo. Se retiran y desechan la cola y los apéndices. Si es necesario, el camarón entero o el cefalotórax pueden congelarse de inmediato y almacenarse a -80°C o en nitrógeno líquido hasta que sea necesario. Se descongelan las muestras almacenadas rápidamente en un baño de agua a 37°C dentro de dos bolsas de plástico de autocierre y a continuación se mantienen a 4°C o sobre hielo durante todo el procedimiento. Se retira el caparazón y los aparatos bucales calcíferos. Se suspenden los tejidos restantes en seis volúmenes de tampón TN (Tris/HCl 0,02 M, pH 7,4, NaCl 0,4 M) y se homogeneizan en una trituradora de tejido para formar una suspensión sin grumos. Se clarifica el homogenado a 1300 ***g*** durante 20 minutos a 4°C. Se retira el líquido sobrenadante que se encuentra bajo la capa lipídica y se pasa por un filtro de 0,45 µm. Se mantiene el filtrado a 4°C para su utilización inmediata o se congela enseguida y se almacena en alícuotas a -80°C o en nitrógeno líquido. Se descongela el filtrado rápidamente a 37°C y se mantiene sobre hielo hasta que se utiliza.

Se inyectan 5 µl de filtrado por gramo de peso corporal a un mínimo de doce juveniles de camarón (1-5 g) de una especie susceptible (*P. monodon*, *P. esculentus*, *P. japonicus*, *P. merguiensis*, *P. vannamei*, *P. stylirostris*), en el segundo segmento abdominal utilizando una aguja de 0,45 mm de diámetro externo. Se inyecta tampón TN y un extracto de tejido filtrado preparado a partir de camarones no infectados a dos grupos equivalentes de al menos 12 camarones cada uno. A otro grupo de al menos 12 camarones se inyectará por último un inóculo calibrado y de composición conocida preparado a partir de camarones infectados por el VECA o el VAB (según sea necesario), que funcionará como control positivo. Se mantiene cada grupo de camarones en un tanque cubierto independiente, con una entrada independiente de agua a lo lago de todo el bioanálisis. Debe garantizarse que no se produzca ninguna transferencia inadvertida de agua entre los tanques, mediante la aplicación de las buenas prácticas de laboratorio. Se observan los camarones y se

registran las mortalidades durante al menos 21 días o hasta que los grupos analizados y el control positivo alcancen un 100% de mortalidad. Se obtiene al menos un camarón moribundo de cada uno de los cuatro grupos para examinarlo mediante histología, MET, hibridación *in-situ* de ácido nucleico y PCR o inmunoelectrotransferencia, con el fin de confirmar la presencia del VECA o del VAB (según sea necesario) en la muestra (los procedimientos de cada prueba se hallan descritos en los apartados anteriores).

NOTA: los camarones a analizar que sean sospechosos de ser portadores de infecciones crónicas de nivel bajo podrían producir un inóculo que contuviera una dosis muy baja de virus. En el bioanálisis, este tipo de inóculo puede no causar necesariamente mortalidad, signos macroscópicos de enfermedad ni signos histológicos característicos de una infección letal. En este caso, deben aplicarse pruebas moleculares o MET a los camarones sometidos al bioanálisis.

4.3.2. Métodos serológicos

No aplicables.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

Los métodos actualmente disponibles para la vigilancia específica y el diagnóstico de la ECA 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 específica y diagnóstico*

Método	**Vigilancia específica**				**Diagnóstico provisional**	**Diagnóstico confirmativo**
	Larvas	**PL**	**Juveniles**	**Adultos**		
Signos macroscópicos	d	d	c	c	c	d
Bioanálisis	d	d	d	d	c	b
MO directa	**d**	**d**	**d**	**d**	**a**	**d**
Histopatología	**d**	**d**	**c**	**c**	**a**	**d**
ME de transmisión	**d**	**d**	**c**	**c**	**d**	**b**
Pruebas basadas en anticuerpos	**d**	**d**	**c**	**c**	**a**	**b**
Sondas de ADN – *in situ*	d	d	c	c	b	a
PCR	a	a	a	a	a	a
Secuenciación	a	a	a	a	d	a

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

6. Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia específica destinada a declarar la ausencia de enfermedad de la cabeza amarilla

El método de elección para declarar la ausencia de enfermedad es la RT-PCR anidada (apartado 4.3.1.2.3.1; Protocolo 3) seguida de una secuenciación confirmativa del producto amplificado mediante PCR. Se precisa obtener unos resultados negativos en la PCR de dos pasos. Los casos, extremadamente infrecuentes, en los que un resultado positivo en la PCR de dos pasos no pueda confirmarse mediante secuenciación, también se considerarán

negativos. Dado que puede tener lugar una recombinación genética entre genotipos, la presencia de cualquiera de los genotipos se considera una prueba de la presencia de la ECA.

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

Un caso sospechoso de ECA se define como un brote de enfermedad en camarones marinos en el que se observan mortalidades acumuladas (de hasta el 100%) en los estadios de juveniles tempranos a tardíos, que pueden ir precedidas de un cese de la alimentación y de una acumulación de camarones en los márgenes de los estanques. Los camarones moribundos pueden presentar un aspecto general descolorido y un color amarillento en el cefalotórax, debido a que debajo se encuentra el hepatopáncreas, de color amarillo. El examen histológico del órgano linfoide fijado debe poner de manifiesto cantidades moderadas a altas de inclusiones citoplasmáticas intensamente basófilas, teñidas de manera uniforme, y esféricas (de unos 2 µm de diámetro o menores).

7.2. Definición de caso confirmado

La ECA puede confirmarse por la detección de niveles altos de infección diseminada en los tejidos de origen ectodérmico y mesodérmico mediante hibridación *in situ,* junto con la detección de productos amplificados del tamaño indicado, utilizando RT-PCR confirmativas y secuenciación, como se describe en el apartado 4.3 de este capítulo. Dado que las infecciones crónicas de nivel bajo con virus del complejo de la cabeza amarilla son frecuentes en ciertas zonas, la detección de la presencia de virus no constituye, en si misma, una prueba de la etiología.

8. Bibliografía

CASTRO-LONGORIA R., QUINTERO-ARREDONDO N., GRIJALVA-CHON J.M. & RAMOS-PAREDES J. (2008). Detection of the yellow-head virus (YHV) in wild blue shrimp, *Penaeusstylirostris*, from the Gulf of California and its experimental transmission to the Pacific white shrimp, *Penaeusvannamei*. *J. Fish Dis.,* **31** (12), 953–956.

CHANTANACHOOKIN C., BOONYARATPALIN S., KASORNCHANDRA J., DIREKBUSARAKOM S., AEKPANITHANPONG U., SUPAMATTAYA K., SRIURAITANA S. &FLEGEL T.W. (1993). Histology and ultrastructure reveal a new granulosis-like virus in *Penaeusmonodon* affected by yellow-head disease. *Dis. Aquat. Org.*, **17**, 145–157.

COWLEY J.A., CADOGAN L.C., WONGTEERASUPAYA C., HODGSON R.A.J., SPANN K.M., BOONSAENG V. & WALKER P.J. (2004). Differential detection of gill-associated virus (GAV) from Australia and yellow head virus (YHV) from Thailand by multiplex RT-nested PCR.*J. Virol. Methods*, **117**, 49–59.

COWLEY J.A., HALL M.R., CADOGAN L.C., SPANN K.M. & WALKER P.J. (2002).Vertical transmission of gill-associated virus (GAV) in the black tiger prawn *Penaeusmonodon. Dis. Aquat. Org*., **50**, 95–104.

COWLEY J.A., WALKER P.J., FLEGEL T.W., LIGHTNER D.V., BONAMI J.R., SNIJDER E.J. & DE GROOT R.J. (2012).Family Roniviridae.*In*: Virus Taxonomy,IXth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, King A., Adams M., Carstens E. &Lefkowitz E.J., eds. Elsevier, Academic Press, London, UK, 797–801.

FLEGEL T.W., BOONYARATPALIN S. &WITHYACHUMNARNKUL B. (1997).Current status of research on yellow-head virus and white-spot virus in Thailand.*In:* Diseases in Asian Aquaculture III, Flegel T.W. &MacRae I.H., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, the Philippines, 285–296.

FLEGEL T.W., FEGAN D.F. &SRIURAIRATANA S. (1995a).Environmental control of infectious shrimp diseases in Thailand.*In:* Diseases in Asian Aquaculture II, Shariff M., Subasinghe R.P. & Arthur J.R., eds. Asian Fisheries Society, Manila, the Philippines, 65–79.

FLEGEL T.W., SRIURAIRATANA S., WONGTERRASUPAYA C., BOONSAENG V., PANYIM S. &WITHYACHUMNARNKUL B. (1995b). Progress in characterization and control of yellow-head virus of Penaeusmonodon.*In:* Swimming Through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95, Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA, 76–83.

HASSON K.W., HASSON J., AUBERT H., REDMAN R.M. &LIGHTNER D.V. (1997). A new RNA-friendly fixative for the preservation of penaeid shrimp samples for virological assay using cDNA probes. *J. Virol. Methods,***66**, 227–236.

KHONGPRADIT R., KASORNCHANDRA J. &BOONYARATALIN S. (1995).Susceptibility of the postlarval stages of black tiger shrimp (*Penaeusmonodon*) to yellow-head baculovirus (YBV).*In:* Diseases in Asian Aquaculture II, Shariff M., Subasinghe R.P. & Arthur J.R., eds. Asian Fisheries Society, Manila, the Philippines, p. 6.

LIGHTNER D.V. (ED.) (1996).Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp.World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA.

LIGHTNER D.V., HASSON, K.W., WHITE, B.L. & REDMAN R.M. (1998).Experimental infection of western hemisphere penaeid shrimp with Asian white spot syndrome virus and Asian yellow head virus.*J. Aquat. Anim. Health*, **10**, 271–281.

LOH P.C., CESAR E., NADALA B. JR, TAPAY L.M. & LU Y. (1998).Recent developments in immunologically-based and cell culture protocols for the specific detection of shrimp viral pathogens. In: Advances in Shrimp Biotechnology, Flegel T.W., ed. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, Thailand, 255–259.

LONGYANT S., SATTAMAN S., CHAIVISUTHANGKURA P., RUKPRATANPORN S., SITHIGORNGUL W. &SITHIGORNGUL P. (2006). Experimental infection of some penaeid shrimps and crabs by yellow head virus (YHV).*Aquaculture,* **257**, 83–91.

LONGYANT S., SITHIGORNGUL P., CHAIVISUTHANGKURA P., RUKPRATANPORN S., SITHIGORNGUL W. &MENASVETA P. (2005). Differences in the susceptibility of palaemonid shrimp species to yellow head virus (YHV) infection. *Dis. Aquat. Org.*, **64**, 5–12.

LU Y., TAPAY L.M., BROCK J.A. &LOH P.C. (1994).Infection of the yellow head baculo-like virus (YBV) in two species of penaeid shrimp *Penaeusstylirostris* (Stimpson) and *Penaeusvannamei* (Boone).*J. Fish Dis.*, **17**, 649–656.

MA H., OVERSTREET R.M. &JOVONOVICH J.A. (2009).Daggerblade grass shrimp (*Palaemonetespugio*): A reservoir host for yellow-head virus (YHV). *J. Invert. Pathol.***101**, 112–118.

OANH D.T., VAN HULTEN M.C., COWLEY J.A. &WALKER P.J.(2011). Pathogenicity of gill-associated virus and Mourilyan virus during mixed infections of black tiger shrimp (*Penaeusmonodon*).*J. Gen. Virol*., **92**, 893–901.

SANCHEZ-BARAJAS M., LINAN-CABELLO M.A. & MENA-HERRERA A. (2009). Detection of yellow-head disease in intensive freshwater production systems of *Litopenaeusvannamei*.*Aquacult.Internat.n***17,** 101–112.

SENAPIN S., THAOWBUT Y., GANGNONNGIW W., CHUCHIRD N., SRIURAIRATANA S. &FLEGEL TW.(2010). Impact of yellow head virus outbreaks in the whiteleg shrimp, *Penaeusvannamei* (Boone), in Thailand.*J. Fish Dis*., **33** (5), 421–430.

SPANN K.M., COWLEY J.A., WALKER P.J. & LESTER R.J.G. (1997). A yellow-head-like virus from *Penaeusmonodon* cultured in Australia.*Dis. Aquat. Org.*, **31**, 169–179.

SPANN K.M. DONALDSON R.A. COWLEY J.A. & WALKER P.J. (2000). Differences in susceptibility of some penaeid prawn species to gill-associated virus (GAV) infection. *Dis. Aquat. Org.*, **42**, 221–225.

SPANN K.M., MCCULLOCH R.J., COWLEY J.A. & WALKER P.J. (2003).Detection of gill-associated virus (GAV) by *in situ* hybridisation during acute and chronic infections in *Penaeusmonodon* and *Penaeusesculentus*shrimp.*Dis. Aquat. Org*., **56**, 1–10.

STENTIFORD G.D., BONAMI J.R. &ALDAY-SANZ V. (2009).A critical review of susceptibility of crustaceans to Taura syndrome, Yellowhead disease and White Spot Disease and implications of inclusion of these diseases in European leglislation.*Aquaculture,***291**, 1–17.

TANG K.F.J. &LIGHTNER D.V. (1999). A yellow head virus gene probe: nucleotide sequence and application for *in situ* hybridization. *Dis. Aquat. Org*., **35**, 165–173.

TANG K.F.J., SPANN K.M., OWENS L. &LIGHTNER D.V. (2002).*In situ* detection of Australian gill-associated virus with a yellow head virus gene probe.*Aquaculture,***205**, 1–5.

WALKER P.J., COWLEY J.A. SPANN K.M., HODGSON R.A.J. HALL M.R &WITHYACHUMNARNKUL B. (2001). Yellow head complex viruses: Transmission cycles and topographical distribution in the Asia-Pacific Region. *In:* The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture 2001, Browdy C.L. &Jory D.E., eds. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 292–302.

WIJEGOONAWARDANE P.K.M., COWLEY J.A., SITTIDILOKRATNA, N., PHETCHAMPAI, N., COWLEY, J.A., GUDKOVS, N. & WALKER P.J. (2009).Homologous genetic recombination in the yellow head complex of nidoviruses infecting *Penaeusmonodon shrimp*. Virology doi: 1016/j.virol.2009.04.015.

WIJEGOONAWARDANE P.K.M., COWLEY J.A., PHAN T., HODGSON R.A.J., NIELSEN L., KIATPATHOMCHAI W. & WALKER P.J. (2008a).Genetic diversity in the yellow head nidovirus complex. Virology **380**, 213–225.

WIJEGOONAWARDANE P.K.M., COWLEY J.A. & WALKER P.J. (2008b).Consensus RT-nested PCR to detect yellow head virus genotypes in penaeid shrimp.*J. Virol. Methods*, **153**, 168–175.

WONGTEERASUPAYA C., BOONSAENG V., PANYIM S., TASSANAKAJON A., WITHYACHUMNARNKUL B. &FLEGEL T.W. (1997). Detection of yellow-head virus (YHV) of *Penaeusmonodon* by RT-PCR amplification.*Dis. Aquat. Org.,* **31**, 181–186.

WONGTEERASUPAYA C., SRIURAIRATANA S., VICKERS J.E., AKRAJAMORN A., BOONSAENG V., PANYIM S., TASSANAKAJON A., WITHYACHUMNARNKUL B. &FLEGEL T.W. (1995). Yellow-head virus of P*enaeusmonodon* is an RNA virus. *Dis. Aquat. Org.,***22**, 45–50.

*
* *

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

CAPÍTULO 2.2.9.

BACULOVIROSIS ESFÉRICA

(Baculovirus de *Penaeus monodon*)

1. Ámbito de aplicación

A efectos de este capítulo, la baculovirosis esférica se considera una infección por el baculovirus de *Penaeus monodon* (BVM). Sinónimos: el BVM de *P. monodon* se ha designado también como PmSNPV (que significa virus de la poliedrosis nuclear de envoltura única que afecta a *P. monodon*), de acuerdo con las directrices sobre nomenclatura de los virus publicadas por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) (Murphy *et al.* 1995), y aparece como la especie provisional de NPV de *P. monodon*, o PemoNPV (en español, NPVPemo), en los Informes 7ª y 8ª del ICTV (Fauquet *et al.,* 2005; Van Regenmortel *et al.,* 2000). Aunque puede que NPVPemo sea el nombre más correcto para el virus, para designar este virus en el presente *Manual Acuático* en la mayoría de los casos se utilizará el término baculovirus de *P. monodon* (BVM).

2. Información sobre la enfermedad

2.1. Factores relacionados con el agente

2.1.1. El agente patógeno, cepas del agente

Agente patógeno: baculovirus de *P. monodon* (BVM), según describen Lightner & Redman (1981), Lightner *et al.* (1983), Mari *et al.* (1993).

El Comité Internacional de Taxonomía de Virus incluye el BVM (baculovirus esférico) como especie provisionalmente denominada NPVPemo en el género Nucleopolyherdovirus (Fauquet *et al.,* 2005).

Cepas del agente patógeno: teniendo en cuenta la amplia distribución geográfica y la amplia gama de especies hospedadoras del BVM, es probable que existan diferentes cepas. Recientemente, se ha hallado que las pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) diseñadas para las cepas procedentes del este y sureste de Asia producen falsos negativos en *P. monodon* de África infectados por el BVM (Lightner, datos no publicados), lo cual sugiere una vez más que existe más de una cepa del BVM (o de la especie NPVPemo).

2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

No se dispone de datos.

2.1.3. Estabilidad del agente patógeno (métodos eficaces de inactivación)

No se dispone de datos.

2.1.4. Ciclo de vida

No aplicable.

2.2. Factores relacionados con el hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Se han notificado infecciones por el BVM en una o más especies de los siguientes géneros o subgéneros de peneidos (estos últimos se indican entre paréntesis): *Penaeus* (*Penaeus), Penaeus* (*Metapenaeus*), *Penaeus* (*Fenneropenaeus*) y *Penaeus* (*Melicertus*) (Doubrovsky *et al.,* 1988; Hao *et al.,* 1999; Lester *et al.,* 1987; Lightner, 1996; Lightner & Redman 1981; Spann & Lester 1996). La exposición experimental por agua y por vía oral de postlarvas (PL) de 1 día de vida de langostino japonés, *Penaeus* (*Marsupenaeus*) *japonicus*, al BVM no produjo infecciones detectables (Fukuda *et al.,* 1988). De igual forma, a pesar del cultivo simultáneo de *P. monodon* infectado por el BVM en varias piscifactorías del hemisferio occidental, y la consecuente exposición directa de ciertos peneidos del hemisferio occidental (es decir, concretamente *Penaeus vannamei*, *P. stylirostris* y *P. californiensis*) al BVM, el virus no causó infecciones en estas especies, ni se ha establecido en

las piscifactorías de camarones ni en poblaciones naturales de las zonas expuestas (Lightner, 1996; Lightner *et al.,* 1983).

2.2.2. Estadios susceptibles de la vida del hospedador

Los estadios susceptibles de la vida del hospedador a la infección por el BVM son todos, excepto los huevos y las larvas nauplias.

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

No se dispone de datos.

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

El BVM es estrictamente entérico e infecta a las células epiteliales de las mucosas de los túbulos del hepatopáncreas y del intestino medio anterior (Anderson *et al.,* 1987; Brock & Lightner 1990; Couch, 1991; Johnson & Lightner, 1988; Lightner, 1996; Lightner *et al.,* 1983).

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

En hospedadores peneidos del BVM es frecuente la infección persistente. Se ha observado que las hembras adultas salvajes de *P. monodon* que están intensamente infectadas por el BVM excretan heces contaminadas por el BVM cuando desovan, contaminando así los huevos y transmitiendo el virus a la siguiente generación (Johnson & Lightner 1988; Lightner, 1996).

2.2.6. Vectores

No se conocen vectores en las infecciones naturales.

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

No se dispone de datos.

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mecanismos de transmisión

La transmisión del BVM es horizontal y tiene lugar mediante la ingesta de tejido infectado (canibalismo), heces, cuerpos de inclusión o detritos o agua contaminados con el virus (Johnson & Lightner, 1988; Lightner, 1996). El BVM se ha transmitido experimentalmente en el laboratorio mediante la exposición de larvas o PL tempranas de *P. monodon* al virus por el agua o *per os*. Unos 2 días después de la exposición pueden observarse cuerpos de oclusión del BVM en células hepatopancreáticas cuando se exponen PL-1 a 28 ºC en agua de mar de 33 ppmil (Natividad & Lightner, 1992a; 1992b; Paynter et al., 1992).

2.3.2. Prevalencia

La prevalencia del BVM es muy variable, y oscila entre <1% en poblaciones salvajes y de piscifactoría, y hasta el 100% en poblaciones de piscifactoría de tanques de cría de larvas y estanques de precriaderos (Anderson et al., 1987; Chayaburakul et al., 2004; Chen et al., 1989b; 1989c; 1990; Lightner, 1996; Natividad & Lightner 1992a; Vijayan et al., 1995).

2.3.3. Distribución geográfica

El BVM es enzoótico en peneidos salvajes en las siguientes regiones limítrofes del Indo-Pacífico: este y sudeste asiático, el subcontinente indio, Oriente Medio, Australia, Indonesia, Nueva Caledonia, África oriental y Madagascar. Fuera del ámbito geográfico normal de *P. monodon*, no se ha informado de la existencia de BVM en camarones peneidos salvajes. Sin embargo, se ha informado de la existencia de BVM en lugares en los que se ha cultivado *P. monodon* en el Mediterráneo, África Oriental, Tahití y Hawai, así como en varios lugares de Norteamérica y Sudamérica y en el Caribe, pero solo en las poblaciones de *P. monodon* introducidas (Bondad-Reantaso *et al*., 2001; Lightner, 1996).

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

Los estadios larvarios (en concreto, protozoos y misis) y los estadios de PL temprana son las fases de la vida del hospedador en que pueden producirse importantes mortalidades, y son los que resultan infectados más fácilmente en estudios de desafío en el laboratorio (Chen et al 1989b; Natividad & Lightner 1992a; Paynter *et al*., 1992). En regiones enzoóticas en las que se cultiva *P. monodon*, la

prevalencia del BVM y la gravedad de la infección pueden ser altas (de entre el 50% y casi el 100%) en juveniles y adultos, pero sin mortalidad ni morbilidad asociadas. Las infecciones por el BVM aparentemente son bien toleradas por *P. monodon* a no ser que sufran un intenso estrés (Chayaburakul *et al.,* 2004; Chen *et al.,* 1989a; 1989b; 1989c, Lightner, 1996; Lightner *et al.,* 1992; Natividad & Lightner 1992b). No obstante, las infecciones intensas por el BVM en *P. monodon* de piscifactoría pueden detener el crecimiento, lo cual da lugar a una disminución de la supervivencia y a una reducción del rendimiento global del cultivo (Anderson *et al.,* 1987; Baticados *et al.,* 1991; Chayaburakul *et al.,* 2004; Fegan *et al.,* 1991; Lightner, 1996; Nash *et al.,* 1988; Natividad & Lightner 1992b).

2.3.5. Factores ambientales

No se dispone de datos

2.4. Control y prevención

2.4.1. Vacunación

No se ha desarrollado ningún método eficaz de vacunación contra la BVM.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

No se dispone de informes científicamente confirmados sobre tratamientos eficaces con sustancias químicas.

2.4.3. Inmunoestimulación

No se dispone de informes científicamente confirmados sobre tratamientos eficaces mediante inmunoestimulación.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

No se ha demostrado la existencia de ninguna población de especies susceptibles que sea resistente al BVM.

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

No es aplicable al BVM.

2.4.6. Agentes bloqueantes

No se conoce el uso de agentes bloqueantes.

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

Dado que el BVM se transmite de los ejemplares adultos a su descendencia por contaminación fecal de los huevos desovados, la prevención de la infección de viveros puede lograrse aplicando pasos adicionales para eliminar la contaminación fecal de dichos huevos y las larvas limpiando bien las larvas nauplias o los huevos con formalina, iodóforos y agua de mar limpia (Chen *et al.,* 1990).

2.4.8. Prácticas generales de manejo

Viveros: para la prevención de las infecciones por el BVM y de la enfermedad que causa, se han aplicado varias prácticas de manejo. La aplicación de métodos de detección sistemática del BVM a reproductores fue algo eficaz para detectar portadores del virus intensamente infectados y, por tanto, para reducir la transmisión de la enfermedad de los progenitores a la descendencia. Con métodos de análisis no letales, esto se logra con un simple examen de hebras fecales al microscopio óptico (o mediante análisis de hebras fecales por PCR, si se dispone sin problema de las instalaciones necesarias para llevar a cabo esta técnica). Como alternativa, pueden sacrificarse reproductores que se encuentren al final de su vida útil tras el desove, para llevar a cabo un simple examen al microscopio óptico de aplastamientos de hepatopáncreas (también puede extirparse el hepatopáncreas y analizarse mediante PCR) para determinar el estado del desovador respecto al BVM. Dado que el BVM se transmite de los ejemplares adultos a su descendencia por contaminación fecal de los huevos desovados, la prevención de la infección de viveros puede lograrse aplicando pasos adicionales para eliminar la contaminación fecal de los huevos desovados y las larvas limpiando bien las nauplias o los huevos con formalina, iodóforos y agua de mar limpia (Chen *et al.,* 1990).

Precriaderos y estanques de engorde: las infecciones por BVM siguen siendo frecuentes en estanques con fondo de tierra en zonas del Indo-Pacífico en las que el virus es enzoótico (Bondad-

Reantaso *et al.,* 2001; Chayaburakul*et al.,* 2004; Lightner, 1996), pero la incidencia y la prevalencia de las infecciones por el BVM puede reducirse en precriaderos y estanques de engorde revestidos internamente.

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

Las muestras adecuadas para determinar si existe infección por el BVM con métodos moleculares (por ejemplo, la PCR, la hibridación *in situ,* etc.) son las postlarvas (PL), los juveniles y los adultos. Aunque el BVM puede infectar todas las fases de vida, la gravedad de la infección, y por lo tanto, la carga vírica, pueden estar por debajo de los límites de detección en huevos desovados y en las fases larvarias, de modo que estas fases de vida podrían no constituir muestras adecuadas para la detección del BVM ni para la certificación de ausencia de baculovirosis esférica.

3.2. Conservación de las muestras para su envío

Para conocer los detalles sobre la conservación de las muestras para la histología o pruebas moleculares sistemáticas, así como para otros métodos analíticos, consúltese el capítulo 2.2.0.

3.3. Combinación de varias muestras

Las muestras obtenidas para las pruebas moleculares pueden juntarse formando muestras combinadas de no más de cinco ejemplares de juveniles, subadultos o adultos cada una. No obstante, en el caso de los huevos, las larvas y las postlarvas (PL), para disponer de suficiente muestra (ácido nucleico extraído) para ejecutar una prueba diagnóstica tal vez sea necesario combinar cantidades mayores de ejemplares (por ejemplo, ~150 o más huevos o larvas, o 50–150 PL en función del tamaño y de la edad). Consúltese también el Capítulo 2.2.0.

3.4. Órganos y tejidos de elección

El BVM es un virus entérico y puede detectarse en el hepatopáncreas.

Pueden obtenerse muestras fecales cuando se precise un método analítico no letal (por ejemplo, para analizar de forma no letal reproductores de gran valor).

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

El BVM es un virus entérico (se replica, por ejemplo, en el hepatopáncreas, el intestino medio o sus ciegos) y no se replica a nivel sistémico.

4. Métodos de diagnóstico

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

En el apartado 4.2 se describen los signos clínicos macroscópicos que presentan los camarones infectados por el BVM.

La infección del hepatopáncreas por el baculovirus de *P. monodon* (BVM) es una de las enfermedades más fáciles de diagnosticar en los camarones peneidos y en las gambas. Los cuerpos de oclusión que forma el virus son muy llamativos y fáciles de observar mediante microscopía óptica con muestras frescas, o por histología en el caso de muestras fijadas. Los métodos de microscopía directa son más adecuados para las PL, que a menudo son transportadas en el comercio regional e internacional. También se dispone de métodos moleculares muy sensibles para el diagnóstico del BVM, que son los más adecuados para la vigilancia, y sobre todo para el análisis no letal de reproductores.

- **Examen mediante microscopía directa**
  - *Preparaciones húmedas de tejido fresco:* el diagnóstico del BVM se lleva a cabo mostrando uno o varios cuerpos de oclusión generalmente esféricos en preparaciones húmedas de aplastamientos de hepatopáncreas o intestino medio examinadas mediante microscopía de contraste de fases o de campo brillante. En preparaciones no teñidas

cuidadosamente realizadas, los cuerpos de oclusión del BVM son inclusiones visibles únicas o múltiples, ligeramente refringentes, intranucleares y verdosas cuyo diámetro oscila entre menos de 0,1 µm y casi 20 µm. La tinción del aplastamiento de tejido con verde de malaquita acuoso al 0,05% ayuda a poner de manifiesto los cuerpos de oclusión tiñéndolos más intensamente que otros elementos esféricos de tamaño similar, como los núcleos celulares normales del hospedador, los nucléolos, gránulos secretores, fagolisosomas y gotitas lipídicas (Bondad-Reantaso *et al.,* 2001; Lightner, 1988; 1996; Lightner*et al.,* 1983).

- *Preparaciones húmedas de hebras fecales:* este método se puede utilizar como método no letal para detectar portadores del BVM. El método se puede aplicar a camarones juveniles o de fases posteriores, y tal vez sea más útil como método no letal para la detección de la infección en reproductores de alto valor. Las muestras fecales de camarón a analizar pueden obtenerse introduciendo el camarón en un acuario, un tanque de desove u otro tanque adecuado durante unas pocas horas hasta que aparezcan hebras fecales en el fondo del mismo. La mejor forma de obtener las hebras fecales es empleando una manguera de sifón de plástico transparente (lo ideal es un tubo acoplado a una sección de una pipeta de plástico a modo de extremo) colocada en un vaso de precipitados, un vaso normal o cualquier otro recipiente adecuado. Pueden realizarse preparaciones húmedas de las hebras fecales y examinarse directamente en busca de cuerpos de oclusión. Los cuerpos de oclusión del BVM son cuerpos más o menos esféricos, refringentes, y pueden aparecer aislados o formando agrupaciones. En hebras fecales muy frescas, pueden observarse formando agrupaciones que se mantienen unidas por la membrana nuclear. Al añadir una gota de verde de malaquita acuoso al 0,05% a la preparación húmeda se facilita la observación de los cuerpos de oclusión del BVM porque los tiñe de un verde más intenso que los demás elementos redondos observables en la muestra de heces (Bondad-Reantaso *et al.,* 2001; Lightner, 1996).
- Las heces obtenidas también puede utilizarse como muestras para el análisis no letal de detección del BVM por PCR. La PCR aporta una mayor sensibilidad diagnóstica para las infecciones de bajo grado que el examen por microscopía directa (Bondad-Reantaso*et al.,* 2001; Lightner& Redman 1998).

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Además de la letargia en las PL intensamente afectadas, no se ha documentado ninguna otra alteración del comportamiento en hospedadores infectados.

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

Los protozoos, los misis y las PL tempranas con infecciones intensas por BP pueden tener el intestino medio blanquecino (debido a la presencia de cuerpos de oclusión y detritos celulares en el material fecal) (Lightner, 1996). Los juveniles y los adultos no presentan signos macroscópicos de valor diagnóstico, así como tampoco las larvas con infecciones más leves.

4.2.2. Bioquímica clínica

No es aplicable.

4.2.3. Anatomopatología microscópica

Véase el apartado 4.2.6.

4.2.4. Preparaciones húmedas

Véase el apartado 4.1.1.

4.2.5. Frotis

No es aplicable.

4.2.6. Cortes fijados

Histopatología: la histología como diagnóstico definitivo de la infección por el BVM. Dado que la formalina tamponada al 10% y otros fijadores en el mejor de los casos aportan una fijación regular del hepatopáncreas del camarón (el principal órgano diana del BVM), es muy recomendable utilizar fijador de Davidson (que contiene un 33% de alcohol etílico [al 95%], un 20% de formalina [formaldehído aproximadamente al 37%], un 11,5% de ácido acético glacial y un 33,5% de agua destilada o de grifo)

para todas las histologías sistemáticas de camarones (Bell & Lightner, 1988; Lightner, 1996). Para optimizar resultados, no deben utilizarse camarones muertos. Para la fijación y el examen histológico solo deben escogerse camarones vivos, moribundos o que se hallen comprometidos. Los camarones elegidos se sacrifican mediante inyección de fijador directamente hacia el interior del hepatopáncreas; la cutícula que recubre el cefalotórax y el abdomen justo lateral a la línea media dorsal se abre con una tijeras de punta fina de cirugía para potenciar la penetración del fijador (puede retirarse el abdomen y desecharse), se sumerge el camarón entero (o el cefalotórax menos el abdomen) en fijador durante un periodo de entre 24 y no más de 48 horas, y a continuación se transfiere a alcohol etílico al 70%, donde se guardará. Tras ser transferidos a alcohol etílico al 70%, los ejemplares fijados se pueden transportar (por correo o mensajería al laboratorio de diagnóstico) envueltos en una toalla o papel absorbente saturado con alcohol etílico al 70% e introducidos en bolsas de plástico herméticas.

Para empezar el procesado histológico, los camarones fijados se "cortan" (para observar una guía fotográfica de este procedimiento, consúltese Bell & Lightner, 1998) para facilitar la posterior realización de cortes histológicos del hepatopáncreas y del intestino medio. Tras la deshidratación, las muestras se incluyen en parafina y se realizan cortes de 4-6 µm de espesor. Pueden utilizarse tinciones histológicas como la de Mayer Bennett o la de hematoxilina y eosina (H/E) de Harris para observar los cuerpos de oclusión esféricos en los hepatopancreatocitos, células del epitelio intestinal, o el lumen intestinal, diagnósticos del BVM. Lo característico es que las células hepatopancreáticas (o, en ocasiones, del intestino medio) infectadas por el BVM presenten núcleos destacadamente hipertrofiados con cuerpos de oclusión eosinófilos únicos o, más a menudo, formado agrupaciones, junto con una disminución y marginación de la cromatina. Los cuerpos de oclusión se pueden teñir de rojo brillante con las tinciones de H/E, e intensamente, aunque de forma variable, con las tinciones de tejido de Gram. Así, por ejemplo, la tinción histológica de Gram de Brown y Brenn, aunque no es específica de los cuerpos de oclusión del baculovirus tiende a teñir las oclusiones más intensamente (de rojo o púrpura, en función del espesor del corte, del tiempo de decoloración, etc.) que el tejido circundante, lo cual ayuda a poner de manifiesto su presencia en infecciones poco intensas (Bondad-Reantaso *et al.,* 2001; Brock &Lightner 1990; Lester *et al.,* 1987; Lightner 1988; 1996; Vogt, 1992).

Método de la autofluorescencia con floxina: se trata de otro método para detectar cuerpos de oclusión del BVM que se basa en la fluorescencia de los cuerpos de oclusión teñidos de floxina. Puede añadirse floxina acuosa al 0,001% a aplastamientos de tejido para crear preparaciones húmedas de hepatopáncreas o heces para el examen directo. Los cortes histológicos teñidos con una H/E sistemática que contenga floxina al 0,005%, también son adecuados para este procedimiento. Los cuerpos de oclusión de las preparaciones húmedas de aplastamientos de tejido, en las heces o en cortes histológicos emiten una fluorescencia de color amarillo-verde brillante sobre un fondo de color verde claro bajo epi-fluorescencia (filtro de barrera de 0-515 nm y filtro excitador de 490 nm). Otros elementos de los tejidos, así como los cuerpos de oclusión de baculovirus de los insectos no emiten fluorescencia con este método. Así pues, este método permite un diagnóstico rápido y específico (Bondad-Reantaso *et al.,* 2001; Lightner, 1996; Thurman *et al.,* 1990).

Hibridación in-situ*:* véase el apartado 4.3.1.2.3 abajo.

Métodos basados en anticuerpos: los anticuerpos policlonales producidos en conejos para la detección la poliedrina de la baculovirosis tetraédrica (BP) (Lewis, 1986) reaccionan de forma cruzada con el BVM en la inmunofluorescencia indirecta (IFAT) (Lightner, 1996), pero no se dispone de ninguno para el diagnóstico sistemático de infecciones por el BVM.

4.2.6. Microscopía electrónica/citopatología

Microscopía electrónica: la infección por BVM puede confirmarse poniendo de manifiesto el virus (o cuerpos de oclusión patognomónicos con viriones ocluidos) en cortes, o bien mostrando el virus en preparaciones de virus semi-purificado preparadas a partir del hepatopáncreas (Couch 1991; Fegan *et al.,* 1991; Johnson & Lightner 1988; Lightner *et al.,* 1983; Lu *et al.,* 1996; Mari *et al., 1*993).

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

Véase el apartado 4.1.1.

4.3.1.1.2. Frotis

Véase el apartado 4.2.5.

4.3.1.1.3. Cortes fijados

Véase el apartado 4.2.6.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

Ninguno documentado hasta ahora.

4.3.1.2.2. Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos

Véase el apartado 4.2.6.

4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

Métodos moleculares con sondas de ADN para el BVM: se han desarrollado sondas génicas no radiactivas marcadas con DIG para el BVM (Lightner *et al.,* 1994; Lu *et al.,* 1995; Mari *et al.,* 1993; Spann *et al.,* 1993). Se comercializan sondas de ADN marcadas con DIG para detectar el BVM, como los kits ShrimProbeTM de DiagXotics (Lawrenceville, New Jersey, EE.UU.). Estas sondas están marcadas con un marcador no radiactivo, digoxigenina-11-dUTP (DIG), y solo funcionan bien con la hibridación *in situ* aplicada a cortes histológicos, porque hay sustancias en el hepatopáncreas y en las heces de los camarones que comportan la aparición de falsos positivos y de falsos negativos cuando se emplean muestras que se transfieren directamente y no se extraen antes de aplicar la sonda.

Procedimiento de hibridación por transferencia puntual para el BVM: si bien existen sondas de ADN específicas del BVM, su aplicación a los procedimientos de hibridación por transferencia puntual no se recomienda para la mayoría de las aplicaciones sistemáticas con fines de diagnóstico. Los pigmentos presentes en el hepatopáncreas dejan una mancha coloreada en la membrana de hibridación que puede enmascarar una prueba positiva o inducir una falsa interpretación de una prueba negativa. De la misma manera, partículas de quitina (que unen las sondas de ADN de forma inespecífica), pigmentos, y otros materiales presentes en muestras fecales también pueden producir falsos positivos y falsos negativos en pruebas de hibridación por transferencia puntual. Para evitar estos problemas se recomienda la extracción de ADN del hepatopáncreas o las heces antes de la transferencia, o bien emplear sondas quimioluminiscentes o marcadas radiactivamente. Sin embargo, la idoneidad de otros métodos (es decir, la observación directa de preparaciones húmedas, la histología o la PCR) no ha hecho necesario el posterior refinamiento ni la aplicación adicional del método de la transferencia puntual (Lightner, 1996; Lightner*et al.,* 1983).

- *Procedimiento de la hibridación* In-situ*:* en el protocolo de la hibridación *in situ* detallado para la baculovirosis tetraédrica (BP) en el apartado 4.3.1.2.3. del capítulo 2.2.10 se utiliza el mismo método, excepto por el hecho de que se emplea una sonda marcada con DIG para BVM.

Reacción en cadena de la polimerasa: Se han desarrollado varios métodos de PCR para el BVM y pueden ser adecuados para ciertas aplicaciones (Chang *et al.,* 1993; Lu *et al.,* 1993; Umesha*et al.,* 2003; Vickers *et al.,* 1992; 1994). No obstante, recientemente se han desarrollado más sensibles y se ha observado que detectan el BVM de varias zonas geográficas (Belcher & Young 1998; Surachetpong *et al.,* 2005).

Se ha observado que existen ciertas sustancias en el hepatopáncreas y en las heces de los camarones que inhiben la ADN polimerasa que se utiliza en la PCR. Por tanto, se precisa una extracción del ADN antes de poder aplicar con éxito la PCR a la detección de este virus (Belcher & Young 1998; Chang *et al.,* 1993; Hsu *et al.,* 2000). Los kits de extracción de ADN son cómodos y se venden.

En cada prueba de PCR para el BVM deben incluirse los siguientes controles: una muestra de tejido o heces que se sepa que es negativa; una muestra de tejido o de heces que se sepa que es positiva (como el clon de ADN a partir del cual se diseñó un conjunto específico de cebadores); y un control “sin molde”.

PCR anidada para el BVM (Belcher & Young 1998): este protocolo de PCR anidada permite detectar concentraciones bajas de BVM (de incluso solo ocho equivalentes de genoma vírico). Se diseñaron dos cebadores externos y dos internos utilizando una secuencia de ADN derivada del plásmido p4Ec196, que se construyó a partir de un fragmento *Eco*RI de 7,4 kb de una cepa australiana de BVM. Las secuencias de los cebadores son las siguientes:

Cebador	Secuencia	Temperatura
MBV1.4F	5'-CGA- TTC-CAT-ATC-GGC-CGA-ATA-3'	62°C (68,9°C)
MBV 1.4r	5'-TTG-GCA-TGC-ACT-CCC-TGA-GAT-3'	64°C (70,8°C)
MBV 1.4NF	5'-TCC-AAT-CGC-GTC-TGC-GAT-ACT-3'	64°C (70,8°C)
MBV 1.4NR	5'-CGC-TAA-TGG-GGC-ACA-AGT-CTC-3'	66°C (72,8°C)

Las temperaturas de fusión de los cebadores se han calculado con la fórmula 2(A+T) + 4(G+C), o según el método del porcentaje de GC (son los valores entre paréntesis).

Extracción de ADN

i) Belcher & Young (1998) indicaron la presencia de inhibidores de la PCR en muestras de ADN preparadas a partir de PL de *Penaeus monodon* enteras infectadas por el BVM empleando el método de extracción recomendado por Wang *et al.* (1996) para BP, que incorpora proteinasa K. No obstante, empleando fenol caliente para extraer el ADN, este efecto inhibitorio desaparecía.

ii) Con el método del fenol caliente, la muestra a analizar (PL, hepatopáncreas de camarón, heces) se liofiliza y se muele con un mortero hasta obtener un polvo en nitrógeno líquido.

iii) Se añaden de inmediato unos 300 mg del material resultante a 400 µl de tampón de lisis (Tris/HCl 100 mM, ácido etilendiaminotetraacético [EDTA] 100 mM, dodecilsulfato de sodio al 1%, pH 8,0) precalentado (a 65ºC) y se incuba a 65ºC durante 5-10 minutos.

iv) La suspensión obtenida se homogeneiza no muy finamente mediante centrifugación manual en mortero y con un tubo de microcentrífuga. Se añade fenol tamponado con Tris/HCl, pH 8,0 (600 µl) y la mezcla se incuba durante 2 horas a 65ºC invirtiéndola de vez en cuando.

v) Tras la centrifugación a 12.000 ***g*** durante 10 minutos a temperatura ambiente, la capa acuosa se transfiere a un tubo de microcentrífuga nuevo y se extrae dos veces con un volumen igual de fenol/cloroformo (1/1). A continuación, se transfieren un total de 50 µl de la capa acuosa a un tubo de microcentrífuga nuevo que contenga 150 µl de tampón de dilución y se extrae una vez más con un volumen igual de fenol/cloroformo (1/1), y después se lleva a cabo una extracción directa con cloroformo.

vi) Se añade acetato de amonio a la capa acuosa a una concentración final de 2,5 M, se mezcla brevemente, y se añaden dos volúmenes de etanol a -20ºC con 1 µl de glucógeno a una concentración de 20 mg/litro para precipitar el ADN.

vii) El ADN precipita mediante incubación a -20ºC durante toda la noche o mediante incubación a -70ºC durante 1 hora.

viii) El ADN sedimenta a 12.000 ***g*** durante 15 minutos a 4ºC. El sedimento de ADN resultante se enjuaga dos veces, primero con 500 µl de etanol frío al 80% y se centrifuga a 12.000 ***g*** durante 10 minutos a 4ºC, y después con un enjuagado idéntico, y se centrifuga a temperatura ambiente.

ix) El sedimento final de ADN se seca *in vacuo,* y se vuelve a suspender en 100 µl de tampón de dilución (Tris/HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 0,1 mM, pH 8,0) a temperatura ambiente durante toda la noche o a 37ºC durante 2 horas. Tras el análisis espectrofotométrico, y antes de ejecutar la PCR, el ADN se diluye a 50 ng/µl en tampón de dilución.

Pasos de la PCR anidada de Belcher & Young (*1998*):

i) Antes de la PCR, el ADN total extraído se desnaturaliza en agua hirviendo durante 3 minutos, y después se enfría rápidamente en agua con hielo.

ii) Como molde se utiliza un total de 100 ng del ADN extraído.

iii) Cada tubo de reacción contiene KCl 50 mM, Tris/HCl 10 mM, pH 9, Triton X-100 al 0,1%, cada una de las dNTP a una concentración 0,2 mM, $MgCl_2$ 1,5 mM, tanto el cebador MBV1.4F como el cebador MBV1.4R a una concentración 0,25 µM, y 2,5 U de *Taq*, y se completa hasta un volumen final de 50 µl.

iv) Las mezclas de reacción se recubren con aceite mineral (según necesidad).

v) Las condiciones para la primera ronda de amplificación son las siguientes: un ciclo de 96°C durante 5 minutos; 40 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos, 72°C durante 60 segundos; y un ciclo de 72ºC durante 7 minutos.

vi) El segundo paso de la PCR anidada se lleva a cabo con 0,5 µl de la mezcla de reacción de la PCR primaria utilizada como molde con los cebadores internos.

vii) La segunda ronda de la reacción de amplificación contiene KCl 50 mM, Tris/HCl 10 mM, pH 9,0, Triton X-100 al 0,1%, $MgCl_2$ 1,5 mM, cada una de las dNTP a una concentración 0,2 mM, tanto el cebador MBV1.4NF como el MBV1.4NR a una concentración 0,25 µM, y 2,5 U de *Taq*, y se prepara hasta un volumen final de 50 µl.

viii) Las mezclas de reacción se recubren con aceite mineral (según necesidad).

ix) Las condiciones para la segunda ronda de amplificación son las siguientes: un ciclo de 96°C durante 5 minutos; 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos, 72°C durante 60 segundos; y un ciclo de 72°C durante 7 minutos.

x) Se ponen de manifiesto los productos de la PCR (de 533 pb los del primer paso, y de 361 los del segundo paso) añadiendo 1 µl de tampón de carga de gel (azul de bromofenol al 0,25% [p/v], Ficoll de tipo 400 al 15% [p/v], EDTA 100 mM, pH 8,0) a 10 µl de cada mezcla de reacción y se ejecuta la electroforesis por un gel de agarosa al 0,8% en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) que contenga 0,5 g/litro de bromuro de etidio.

En el Laboratorio de Referencia de la OIE, en la Universidad de Arizona, se utiliza otra PCR simple porque es menos propensa a la contaminación (Surachetpong *et al.,* 2005). En este método se emplean la muestra tipo y los métodos de extracción descritos anteriormente en este apartado.

Cebadores: un par de cebadores, uno directo y uno inverso (261F/261R), seleccionados del clon GC7 (entrados en GenBank y cuyo número de acceso es AY819785) produce un amplicón de 261 pb (Surachetpong*et al.,* 2005).

Las secuencias de estos cebadores son las siguientes:

261F 5'-AAT-CCT-AGG-CGA-TCT-TAC-CA-3'

261R 5'-CGT-TCG-TTG-ATG-AAC-ATC-TC-3'

Moldes de ADN:

i) Extraído de hepatopáncreas (congelado o fijado en etanol);

ii) Extraído de PL enteras (congelado o fijado en etanol);

iii) Extraído de heces (congelado o fijado en etanol).

Mezcla de reacción para la PCR:

Reactivo (concentración)	**25 µl de perlas de PCR***
H_2O destilada	23,5 µl
Cebador 261F (0,3 µM)	0,5 µl
Cebador 261R (0,3 µM)	0,5 µl
Molde de ADN (50–450 ng de ADN)	0,5 µl

*Perlas para PCR *PuReTaq™ Ready-To-Go PCR beads*™, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido

Parámetros de ciclación de la PCR:

Cebadores	Mezcla/Perlas	Tiempo	Temp. °C	Nº de ciclos
261F/261R	Perlas*	5 minutos	95	1
		30 segundos 30 segundos 30 segundos	94, 60, 72	35
		7 minutos	72	1

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

Los métodos actualmente disponibles para la vigilancia, la detección y el diagnóstico del BVM 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 = en la actualidad el método no se recomienda y/o no está disponible 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 de vigilancia, detección y diagnóstico de la baculovirosis esférica (Baculovirus de* Penaeus monodon)

Método	Vigilancia dirigida				Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
	Larva	PL	Juveniles	Adultos		
Signos macroscópicos	c	d	d	d	d	d
Bioanálisis	d	d	d	d	c	c
MO directa	b	b	c	c	a	a
Histopatología	b	b	c	c	a	a
Me de transmisión	d	d	d	d	d	a
Pruebas basadas en anticuerpos	d	d	d	c	d	d
Sondas de ADN – *in situ*	c	c	c	c	a	a
PCR	a	a	a	a	a	a
Secuenciación	d	d	d	d	d	a

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 baculovirosis esférica (baculovirus de *Penaeus monodon*)

Antecedentes de dos años de resultados analíticos negativos al BVM utilizando:

- PCR realizada en muestras del tipo y el tamaño adecuados;
- Ausencia de observación de cuerpos de oclusión en preparaciones húmedas y/o histología de muestras del tipo y tamaño adecuados.

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

En el caso de las larvas (en concreto, protozoarias, misis y PL tempranas) de especies susceptibles: mortalidad con larvas que presenten intestinos medios blancos. En el caso de los juveniles: mal crecimiento o mal rendimiento del cultivo en poblaciones con antecedentes de infección por el BVM o en zonas donde el BVM sea prevalente.

7.2. Definición de caso confirmado

Cualquier combinación de al menos dos de los siguientes tres métodos (con resultados positivos):

- Observación microscópica de cuerpos de oclusión esféricos en preparaciones húmedas de larvas enteras o hepatopáncreas extirpados. En el caso de PL de más edad, así como de juveniles y adultos: observación de cuerpos de oclusión esféricos en preparaciones húmedas de aplastamientos y/o en cortes histológicos del hepatopáncreas o de heces.
- Señal histológica positiva en la hibridación *in situ* correspondiente a lesiones propias del BVM (es decir, núcleos hipertrofiados con o sin los cuerpos de oclusión esféricos patognomónicos.
- Resultados positivos para el BVM en la PCR.

8. Bibliografía

ANDERSON I.G., SHARIFF M., NASH G. & NASH. M. (1987). Mortalities of juvenile shrimp *Penaeusmonodon*, associated with *Penaeusmonodon*baculovirus, cytoplasmic reo-like virus and rickettsial and bacterial infections, from Malaysian brackish water ponds. *AsianFish. Sci*., **1**, 47–64.

BATICADOS M.C.L., PITOGO, C.L., PANER M.G., DE LA PEZA L.D., TENDENCIA E.A. (1991). Occurrence and pathology of *Penaeusmonodon*baculovirus infection in hatcheries and ponds in the Philippines. *Israeli J. Aquaculture Bamidgeh*, **43**, 35–41.

BELCHER C.R. & YOUNG P.R. (1998). Colourimetric PCR-based detection of monodonbaculovirus in whole *Penaeusmonodon*postlarvae. *J. Virol. Methods*, **74**, 21–29.

BELL T.A. &LIGHTNER D.V. (1988). A Handbook of Normal Shrimp Histology. Special Publication No. 1. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 114 pp.

BONDAD-REANTASO M.G., MCGLADDERY S.E., EAST I. &SUBASINGHE R.P. (EDS) (2001). Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases. FAO Fisheries Technical Paper 402, Supplement 2. FAO, Rome, Italy, 240 pp.

BROCK J.A. &LIGHTNER D.V. (1990). Diseases of crustacea. Diseases caused by microorganisms. *In:* Diseases of Marine Animals, Vol. III, Kinne O., ed. BiologischeAnstalt Helgoland, Hamburg, Germany, 245–349.

CHAYABURAKUL K., NASH G., PRATANPIPAT P., SRIURARAIRATANA S. &WITHYACHUMNARNKUL. (2004). Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeusmonodon* cultivated in Thailand. *Dis. Aquat. Org.,***60**, 89–96.

CHANG P.S., LO C.F., KOU G.H. & CHEN S.N. (1993). Purification and amplification of DNA from *Penaeusmonodon*-type baculovirus (MBV). *J. Invertebr. Pathol.,***62**, 116–120.

CHEN S.N., CHANG P.S. & KOU G.H. (1989). Observation on pathogenicity and epizootiology of *Penaeusmonodon*baculovirus (MBV) in cultured shrimps in Taiwan. *Fish Pathol.,* **24**, 189–195.

CHEN S.N., CHANG P.S. & KOU G.H. (1990). Infection route and eradication of *Penaeusmonodon*baculovirus (MBV) in larval giant tiger prawns, *Penaeusmonodon*. *In:* Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States, Fulks W. & Main K.L., eds. Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 177–184.

CHEN S.N., CHANG P.S., KOU G.G. &LIGHTNER D.V. (1989). Studies on virogenesis and cytopathology of *Penaeusmonodon*baculovirus (MBV) in giant tiger prawn (*Penaeusmonodon*) and the red tail prawn (*Penaeuspenicillatus*). *Fish Pathol.,* **24**, 89–100.

CHEN S.N., LO C.F., LIU S.M. & KOU G.H. (1989). The first identification of *Penaeusmonodon*baculovirus (MBV) in cultured sand shrimp, *Metapenaeusensis*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.,***9**, 62–64.

COUCH J.A. (1991). Baculoviridae. Nuclear Polyhedrosis Viruses. Part 2. Nuclear Polyhedrosis Viruses of Invertebrates Other Than Insects. *In:* Atlas of Invertebrate Viruses, Adams J.R. &Bonami J.R., eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 205–226.

DOUBROVSKY A., PAYNTER J.L., SAMBHI S.K., ATHERTON J.G. & LESTER R.J.G. (1988). Observations on the ultrastructure of baculovirus in Australian *Penaeusmonodon* and *Penaeusmerguiensis*. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.,***39**, 743–749.

FAUQUET C.M., MAYO M.A., MANILOFF J., DESSELBERGER U. & BALL L.A. (2005). Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, 1259 pp.

FEGAN D.F., FLEGEL T.W., SRIURAIRATANA S. &WAIYAKRUTTHA M. (1991). The occurrence, development and histopathology of monodonbaculovirus in Southern Thailand. *Aquaculture*, **96**, 205–217.

FUKUDA H., MOMOYAMA K. & SANO T. (1988). First detection of monodonbaculovirus in Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi,* **54**, 45–48.

HAO N.V., THUY D.T., LOAN L.T.T., PHI T.T., PHUOC L.H., DUONG H.H.T., CORSIN F. &CHANRATCHAKOOL P. (1999). Presence of the two viral pathogens WSSV and MBV in three wild shrimp species (*Penaeusindicus, Metapenaeusensis* and *Metapenaeuslysianassa*) cultured in the mangrove forest of Ca Mau Province. *Asian Fish. Sci.,* **12**, 309–325.

HSUY.L., WANG K.H., YANG Y.H., TUNG M.C., HU C.H., LO C.F., WANG C.H. & HSU T. (2000). Diagnosis of *Penaeusmonodon*-type baculovirus by PCR and by ELISA of occlusion bodies. *Dis. Aquat. Org.,***40**, 93–99.

JOHNSON P.T. &LIGHTNER D.V. (1988). Rod-shaped nuclear viruses of crustaceans: gut-infecting species. *Dis. Aquat. Org.,***5**, 123–141.

LESTER R.J.G., DOUBROVSKY A., PAYNTER J.L., SAMBHI S.K. & ATHERTON J.G. (1987). Light and electron microscope evidence of baculovirus infection in the prawn *Penaeusplebejus*. *Dis. Aquat. Org.,***3**, 217–219.

LEWIS D.H. (1986). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting penaeidbaculovirus. *J. Fish Dis.,***9**, 519–522.

LIGHTNER D.V. (1988). Diseases of cultured penaeid shrimp and prawns. *In:* Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture, Sindermann C.J. &Lightner D.V., eds. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 8–127.

LIGHTNER, D.V. (ED.) (1996). A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 304 pp.

LIGHTNER D.V., BELL T.A., REDMAN R.M., MOHNEY L.L., NATIVIDAD J.M., RUKYANI A. &POERNOMO A. (1992). A review of some major diseases of economic significance in penaeid prawns/shrimps of the Americas and Indopacific. *In:* Diseases in Asian Aquaculture I, Shariff M., Subasinghe R.P., & Arthur J.R., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, 57–80.

LIGHTNER D.V., HEDRICK R.P., FRYER J.L., CHEN S.N., LIAO I.C. & KOU G.H. (1987). A survey of cultured penaeid shrimp in Taiwan for viral and other important diseases. *FishPathol.,***22**, 127–140.

LIGHTNER D.V., POULOS B.T., BRUCE L., NUNAN L., PANTOJA C., MARI J. &BONAMI J.R. (1994). Development and application of genomic probes for use as diagnostic and research reagents for the penaeid shrimp parvoviruses IHHNV and HPV and the baculoviruses MBV and BP. USMSFP 10th Anniversary Review, GCRL Special Publication No. 1, 59–85.

LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1981). A baculovirus-caused disease of the penaeid shrimp, *Penaeusmonodon. J. Invertebr. Pathol.,* **38**, 299–302.

LIGHTNER D.V & REDMAN R.M. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, **164**, 201–220.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M. & BELL T.A. (1983). Observations on the geographic distribution, pathogenesis and morphology of the baculovirus from *Penaeusmonodon*Fabricius. *Aquaculture*, **32**, 209–233.

LU C.C., TANG F.J.K. & CHEN S.N. (1996). Morphogenesis of the membranous labyrinth in penaeid shrimp cells infected with *Penaeusmonodon*baculovirus (MBV). *J. Fish Dis.,* 19, 357–364.

LU C.C., TANG F.J.K., KOU G.H. & CHEN S.N. (1993). Development of a *Penaeusmonodon*-type baculovirus (MBV) DNA probe by polymerase chain reaction and sequence analysis. *J. Fish Dis.,***16**, 551–559.

LU C.C., TANG F.J.K., KOU G.H. & CHEN S.N. (1995). Detection of *Penaeusmonodon*-type baculovirus (MBV) infection in *Penaeusmonodon*Fabricius by in situ hybridization. *J. Fish Dis.,***18**, 337–345.

MARI J., BONAMI J.R., POULOS B. &LIGHTNER D.V. (1993). Preliminary characterization and partial cloning of the genome of a baculovirus from *Penaeusmonodon* (PmSNPV = MBV). *Dis. Aquat. Org.,***16**, 207–215.

MURPHY F.A., FAUQUET C.M., MAYO M.A., JARVIS A.W., GHABRIAL S.A., SUMMERS M.D., MARTELLI G.P. & BISHOP D.H.L. (1995). Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol*. (Suppl. 10). Springer-Verlag, Vienna, Austria and New York, USA, 586 pp.

NASH G., POERNOMO A. & NASH M.B. (1988). Baculovirus infection in brackishwater pond cultured *Penaeusmonodon*Fabricius in Indonesia. *Aquaculture*, **73**, 1–6.

NATIVIDAD J.M. & LIGHTNER D.V. (1992). Prevalence and geographic distribution of MBV and other diseases in cultured giant tiger prawns (*Penaeusmonodon*) in the Philippines. *In:* Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States, Fulks W. & Main K., eds. The Oceanic Institute, Makapuu Point, Honolulu, Hawaii, USA, 139–160.

NATIVIDAD J.M. & LIGHTNER D.V. (1992). Susceptibility of the different larval and postlarval stages of black tiger prawn, *Penaeusmonodon*Fabricius, to monodonbaculovirus (MBV). *In:* Diseases in Asian Aquaculture I, Shariff M., Subasinghe R. & Arthur J.R., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, 111–125.

PAYNTER J.L., VICKERS J.E. & LESTER R.J.G. (1992). Experimental transmission of *Penaeusmonodon*-type baculovirus (MBV). *In:* Diseases in Asian Aquaculture I, Shariff M., Subasinghe R. & Arthur J.R., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, 97–110.

POULOS B.T., MARI J., BONAMI J.R., REDMAN R. &LIGHTNER D.V. (1994). Use of non-radioactively labeledDNA probes for the detection of a baculovirus from *Penaeusmonodon* by in situ hybridization on fixed tissue. *J. Virol. Methods,***49**, 187–194.

SPANN K.M. & LESTER R.J.G. (1996). Baculovirus of *Metapenaeusbennettae* from the Moreton Bay region of Australia. *Dis. Aquat. Org.,***27**, 53–58.

SPANN K.M., LESTER R.J.G. & PAYNTER J.L. (1993). Efficiency of chlorine as a disinfectant against monodonbaculovirus (MBV). *Asian Fish. Sci.,***6**, 295–301.

SURACHETPONG W., POULOS B.T., TANG K.F.J., LIGHTNER D.V. (2005). Improvement of PCR method for the detection of monodonbaculovirus (MBV) in penaeid shrimp. *Aquaculture*, **249**, 69–75.

THURMAN R.B., LIGHTNER D.V., BELL T.A. &HAZANOW S. (1990). Unique physicochemical properties of the occluded penaeid shrimp baculoviruses and their use in diagnosis of infections. *J. Aquat. Anim. Health,* **2**, 128–131.

UMESHA R.K., UMA A., OTTA S.K., KARUNASAGAR I., &KARUNASAGAR I. (2003). Detection by PCR of hepatopancreatic parvovirus (HPV) and other viruses in hatchery-reared *Penaeusmonodon*postlarvae. *Dis. Aquat. Org,.***57**, 141–146.

VAN REGENMORTEL M.H.V., FAUQUET C.M., BISHOP D.H.L., CARSTENS E.B., ESTES M.K., LEMON S.M., MANILOFF J., MAYO M.A., MCGEOCH D.J., PRINGLE C.R. &WICKNER R.B. (2000). Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, USA, 1162 pp.

VICKERS J.E., LESTER R.J.G., SPRADBROW P.B. & PEMBERTON J.M. (1992). Detection of *Penaeusmonodon*-type baculovirus (MBV) in digestive glands of postlarval prawns using polymerase chain reaction. *In:* Diseases in Asian Aquaculture I, Shariff M., Subasinghe R.P., & Arthur J.R., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, 127–133.

VICKERS J.E., LESTER R.J.G., SPRADBROW P.B. & PEMBERTON J.M. (1994). Evidence for homology between polyhedrin genes of baculoviruses of a prawn and an insect. *J. Invertebr. Pathol.,***63**, 207–208.

VIJAYAN K.K., ALAVANDI S.V., RAJENDRAN K.V. &ALAGARSWAMI K. (1995). Prevalence and histopathology of monodonbaculovirus (MBV) infection in *Penaeusmonodon* and *P. indicus* in shrimp farms in the south-east coast of India. *Asian Fish. Sci.,***8**, 267–272.

VOGT G. (1992). Transformation of anterior midgut and heaptopancreas by monodonbaculovirus (MBV) in *Penaeusmonodon*postlarvae. *Aquaculture*, **107**, 239–248.

WANG S.Y., HONG C. &LOTZJ.M. (1996). Development of a PCR procedure for the detection of *Baculoviruspenaei* in shrimp. *Dis. Aquat. Org*., **25**, 123–131.

*
* *

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

CAPÍTULO 2.2.10.

BACULOVIROSIS TETRAÉDRICA

(*Baculovirus penaei*)

1. Ámbito de aplicación

A efectos de este capítulo, la baculovirosis tetraédrica se considera una infección por *Baculovirus penaei*. Un sinónimo es NPVCPv (nucleopoliedrovirus de envoltura única del camarón *Penaeus vannamei*).

2. Información sobre la enfermedad

2.1. Factores del agente

Agente etiológico: *Baculovirus penaei* (BP), descrito por Couch (1974a; 1974b; 1989; 1991), Summers (1977), Overstreet (1994) y Bonami *et al.* (1995).

En el Octavo Informe del Comité Internacional de Taxonomía de Virus, Fauquet *et al*. (2005) detallan un listado de los virus MBV (virus de la baculovirosis esférica) emparentados, como especies provisionalmente clasificadas en el género *Nucleopolyherdovirus*. Por tanto, el BP también debe considerarse una especie provisional de este género.

2.1.1. El agente patógeno, cepas del agente

Cepas del agente patógeno: se han observado al menos tres cepas geográficas, que son las siguientes: 1) la de la costa sureste del Atlántico y del Golfo de México de EE.UU. y del Caribe; 2) la de la costa del Pacífico de Sudamérica, Centroamérica y Norteamérica; y 3) la de Hawai (Brock *et al.,* 1986; Bruce *et al.,* 1993; Durand *et al.,* 1998).

2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

No se dispone de datos

2.1.3. Estabilidad del agente patógeno (métodos eficaces de inactivación)

No se dispone de datos.

2.1.4. Ciclo de vida

No aplicable.

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Se han notificado infecciones por BP en una o más especies de los siguientes géneros o subgéneros de camarones peneidos (los segundos están entre paréntesis): *Penaeus* (*Litopenaeus*), (*Farfantepenaeus*), (*Fenneropenaeus*), (*Melicertus*), (*Penaeus*), *Trachypenaeus* y *Protrachypene* (Bueno *et al*., 1990; Durand *et al.,* 1998; Le Blanc *et al.,* 1991; Lightner, 1996; Lightner *et al.,* 1989; Machado *et al*., 1995; Overstreet, 1994). Todas las especies de peneidos son posibles hospedadoras (Lightner, 1996; 1999; Overstreet, 1994).

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

Todos los estadios de la vida del hospedador son susceptibles a la infección por BP, excepto los huevos y las larvas nauplias.

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

No se dispone de datos.

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

BP es estrictamente entérico e infecta a las células epiteliales de las mucosas de los túbulos del hepatopáncreas y del intestino medio anterior (Brock y Lightner, 1990; Couch, 1974a; Couch, 1991; Johnson y Lightner, 1988; Lightner, 1996).

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

Es frecuente observar infecciones persistentes en camarones peneidos hospedadores de BP. Las hembras adultas salvajes de *P. vannamei* que están intensamente infectadas por BP excretan heces contaminadas con BP al desovar, y de este modo contaminan los huevos y transmiten el virus a la siguiente generación (Johnson y Lightner, 1988; Lightner, 1996).

2.2.6. Vectores

No se conoce ninguno en las infecciones naturales, pero las larvas nauplias de los rotíferos *Brachionus plicatilis* y *Artemia salina* se utilizaron como portadores pasivos de BP para liberar el virus a estadios larvarios de *P. vannamei* en infecciones experimentales (Overstreet *et al.,* 1988; Stuck y Wang 1996).

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

No se ha observado ninguno.

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mecanismos de transmisión

La transmisión de BP es horizontal, por ingesta de tejido infectado (canibalismo), heces, cuerpos de oclusión o detritos o agua contaminados (Johnson y Lightner, 1988; Lightner, 1996; Overstreet *et al.,* 1988).

2.3.2. Prevalencia

Es muy variable, y va de <1% en poblaciones salvajes y de piscifactoría a incluso el 100% en poblaciones de piscifactoría en tanques de cría de larvas y en estanques de precriaderos (Brock y Lightner 1990; Lightner, 1996).

2.3.3. Distribución geográfica

BP es enzoótico en peneidos salvajes de las Américas y de Hawai. No se ha notificado en camarones peneidos salvajes ni de piscifactoría del hemisferio oriental, a pesar de las cuantiosas introducciones de peneidos de las Américas en Asia y en la región del Indo-Pacífico (Bobdad-Reantaso *et al.,* 2001; Brock *et al.,* 1986; Lightner, 1996).

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

Los estadios larvarios (en concreto los protozoos y los misis) y las postlarvas (PL) tempranas resultan infectados con mayor facilidad en estudios de desafío de laboratorio (Bruce *et al.,* 1994a; Hammer *et al.,* 1998; Le Blanc y Overstreet 1990; Overstreet *et al.,* 1988; Stuck y Overstreet 1994; Stuck *et al.,* 1996; Stuck y Wang 1996) y son los estadios en los que es probable que tengan lugar las máximas mortalidades en viveros de camarones peneidos. Es poco habitual observar mortalidades altas como consecuencia de una infección por BP en los juveniles y los adultos, pero en las piscifactorías de camarones la infección podría causar un mal crecimiento y una reducción de la supervivencia en los estanques de precriadero o de engorde (Brock y Main 1994; Lightner, 1996; Overstreet, 1994).

2.3.5. Factores ambientales

No se dispone de datos.

2.4. Control y prevención

2.4.1. Vacunación

No se se han desarrollado métodos eficaces de vacunación contra BP.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

No se dispone de informes confirmados científicamente de tratamientos eficaces con sustancia químicas.

2.4.3. Inmunoestimulación

No se dispone de informes confirmados científicamente de tratamientos inmunoestimulantes eficaces.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

Se ha demostrado el potencial de la selección genética para crear resistencia contra BP.

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

No es aplicable a BP.

2.4.6. Agentes bloqueantes

No se han documentado agentes bloqueantes.

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

Se ha observado la inactivación de BP mediante desinfectantes, pH bajos, calor y radiación UV (Le Blanc y Overstreet, 1991).

2.4.8. Prácticas generales de manejo

Viveros: se han aplicado varias prácticas de manejo para la prevención de las infecciones por BP y de la enfermedad que causa. El pre-cribado de reproductores en cuanto a BP ha tenido cierta eficacia en la detección de portadores intensamente infectados por el virus, y por tanto en la reducción de la transmisión de la enfermedad de los progenitores a la descendencia. Con métodos de análisis no letales, esto se consigue mediante un examen microscópico simple de hebras fecales (o aplicando la reacción en cadena de la polimerasa [PCR] a hebras fecales si se dispone de instalaciones para llevar a cabo una PCR). Como alternativa, pueden sacrificarse reproductores viejos tras el desove y examinarse aplastamientos de hepatopáncreas mediante microscopía óptica simple (o bien analizarse hepatopáncreas extirpados mediante PCR) para determinar el estado de infección por BP en los reproductores. Dado que el BP se transmite de adultos a la descendencia por contaminación fecal de los huevos desovados, puede llevarse a cabo una prevención de la infección en los viveros aplicando otros pasos para eliminar la contaminación fecal de los huevos desovados y las larvas lavando a fondo las larvas nauplias y los huevos con formalina, iodóforos y agua de mar limpia (Chen *et al.,* 1990). La desinfección sistemática de los huevos desovados por reproductores infectados o potencialmente infectados ha reducido la incidencia de las epizootias de BP en los viveros (Lightner y Redman, 1998).

Precriaderos y estanques de engorde: En estanques de tierra de la zona de las Américas donde el virus es enzoótico (Bondad-Reantaso *et al.,* 2001; Lightner, 1996) siguen produciéndose infecciones por BP de manera frecuente, pero la incidencia y la prevalencia de BP podrían reducirse en estanques de viveros y de engorde revestidos.

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

Las muestras adecuadas para la detección de la infección por BP utilizando métodos moleculares (como la PCR, la hibridación *in situ,* etc.) son las postlarvas (PL), los juveniles y los adultos, cuando se dispone de tejidos u órganos entéricos. Aunque BP podría infectar a cualquier estadio de vida, la gravedad de la infección, y por tanto la carga vírica, podría estar bajo los límites de detección en los huevos desovados y en los estadios larvarios, de modo que estos estadios de vida podrían no ser muestras adecuadas para la detección de BP ni para la certificación de la ausencia de la enfermedad causada por BP.

3.2. Conservación de muestras para su envío

En cuanto a la conservación de las muestras para la histología o las pruebas moleculares sistemáticas, y para obtener orientación sobre cómo conservar las muestras para las pruebas previstas, consúltese el Capítulo 2.2.0.

3.3. Combinación de varias muestras

Las muestras que se toman para pruebas moleculares pueden combinarse formando muestras compuestas que representen no más de cinco ejemplares por muestra de juveniles, subadultos o adultos. Sin embargo, en el caso de los huevos, las larvas y las postlarvas (PL), para obtener suficiente material (ácido nucleico extraído) como para ejecutar una prueba diagnóstica, tal vez sea necesario combinar cantidades mayores (por ejemplo, ~150 huevos o larvas o más, o unas 50–150 PL, según el tamaño y la edad). Consúltese también el Capítulo 2.2.0.

3.4. Órganos o tejidos de elección

BP es un virus entérico y puede detectarse en el hepatopáncreas.

Pueden obtenerse muestras fecales cuando se requiere aplicar pruebas no letales (por ejemplo, si es preciso un análisis no letal de reproductores de alto valor).

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

BP es un virus entérico (infecta el hepatopáncreas, el intestino medio o sus ciegos) y no se replica a nivel sistémico.

4. Métodos de diagnóstico

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

Consúltese el Apartado 4.2, donde se ofrece una descripción de los signos clínicos macroscópicos que presentan los camarones infectados con BP.

- **Examen mediante microscopía directa**
  - *Preparaciones húmedas de tejido fresco:* el diagnóstico de infecciones por BP se lleva a cabo mediante la observación de cuerpos de oclusión tetraédricos únicos o múltiples en núcleos de células epiteliales en preparaciones de aplastamientos de hepatopáncreas o intestino medio que se examinan por microscopía de contraste de fases o de campo claro. La forma tridimensional de los cuerpos de oclusión es tetraédrica o piramidal, y su tamaño oscila entre menos de 0,1 µm y casi 20 µm desde la base de la pirámide al pico, con una longitud vertical modal de 8 µm. En algunas publicaciones, los cuerpos de oclusión de BP se denominan PIB (cuerpos de inclusión poliédricos) (Bondad-Reantaso *et al.,* 2001; Brock y Main 2006; Lightner, 1996).
  - *Preparaciones húmedas de hebras frescas:* Este método no letal podría utilizarse para realizar un cribado de los reproductores en cuanto a BP. El método puede aplicarse a juveniles o a camarones de más edad, y tal vez sea el método no letal más útil para el cribado de reproductores de alto valor. Las muestras fecales de camarones a analizar pueden obtenerse colocando el camarón en un acuario, un tanque de desovado u otros tanques adecuados durante unas pocas horas hasta que aparezcan hebras fecales en el fondo del estanque. Las hebras fecales se obtienen mejor utilizando una manguera de plástico transparente con sifón (lo ideal es un conducto de aire acoplado a un corte de una pipeta de plástico a modo de punta), introduciéndolas en un vaso de precipitados, un vaso u otro recipiente adecuado. Las hebras fecales podrían depositarse en preparaciones húmedas, y puede averiguarse si contienen cuerpos de oclusión mediante microscopía directa. Los cuerpos de oclusión de BP son tetraedros prominentes y refringentes, cuyo tamaño oscila entre apenas visibles y casi los 20 µm de altura (Bondad-Reantaso *et al.,* 2001; Brock y Main 2006; Lightner, 1996).
  - Las heces obtenidas también podrían utilizarse como muestra para el análisis no letal de detección de BP mediante PCR. La PCR proporcionará una mayor sensibilidad diagnóstica en infecciones de bajo grado que el examen mediante microscopía directa (Bondad-Reantaso *et al.,* 2001; Lightner y Redman 1998).

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Aparte del letargo en las PL intensamente afectadas, no se ha observado ningún otro cambio de comportamiento en los hospedadores infectados.

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

Los protozoos, los misis y las PL tempranas con infecciones intensas por BP pueden presentar un intestino medio blanquecino (debido a la presencia de cuerpos de oclusión y detritos celulares en el material fecal). Los juveniles y los adultos no presentan signos macroscópicos de valor diagnóstico, así como tampoco las larvas con infecciones menos intensas.

4.2.2. Bioquímica clínica

No es aplicable.

4.2.3. Anatomopatología microscópica

Consúltese el apartado 4.2.6.

4.2.4. Preparaciones húmedas

Consúltese el apartado 4.1.1.

4.2.5. Frotis

No es aplicable.

4.2.6. Cortes fijados

Histopatología: puede utilizarse histología para lograr un diagnóstico definitivo de infección por BP. Dado que la formalina tamponada al 10% y otros fijadores en el mejor de los casos aportan una fijación mediocre del hepatopáncreas del camarón (el principal órgano diana de BP y de otras infecciones por baculovirus en los camarones peneidos), se recomienda claramente utilizar fijador de Davidson (que contenga un 33% de alcohol etílico [al 95%], un 20% de formalina [con alrededor de un 37% de formaldehído], un 11,5% de ácido acético glacial y un 33,5% de agua destilada o de grifo) para todos los estudios histológicos sistemáticos de camarones (Bondad-Reantaso *et al.,* 2001; Lightner y Redman 1998). Para observar los cuerpos de oclusión tetraédricos patognomónicos (de BP) en los hepatopancreatocitos, las células epiteliales del intestino o el lumen intestinal pueden utilizarse tinciones histológicas habituales, como la de hematoxilina/eosina de Mayer-Bennett o de Harris (Bonami *et al.,* 1995; Bondad-Reantaso *et al.,* 2001; Lightner, 1996). Lo habitual es que las células hepatopancreáticas (o, en ocasiones, las del intestino medio) infectadas por BP presenten núcleos considerablemente hipertrofiados con uno o, lo más habitual, múltiples cuerpos de oclusión eosinófilos, con una cromatina escasa y dispuesta en los márgenes (Bondad-Reantaso *et al.,* 2001; Lightner, 1996). Los cuerpos de oclusión pueden teñirse de un rojo brillante con las tinciones de H/E, y de forma intensa, aunque variable, en el caso de las tinciones de Gram. Así, por ejemplo, la tinción de Gram histológica de Brown y Brenn, aunque no es específica para los cuerpos de oclusión de los baculovirus, tiende a teñir las oclusiones más intensamente (de rojo o morado, en función del espesor de la preparación, de la duración del cambio de color, etc.) que el tejido circundante, lo cual puede contribuir a demostrar su presencia en infecciones de poca intensidad (Bondad-Reantaso *et al.,* 2001; Brock y Lightner 1990; Lightner, 1996).

Método de la autofluorescencia con tinción de floxina: otro método para detectar cuerpos de oclusión de BP se basa en la fluorescencia de los cuerpos de oclusión teñidos con floxina. Puede añadirse floxina al 0,001% a preparaciones de aplastamientos de tejido para crear preparaciones húmedas de hepatopáncreas o heces con el fin de examinarlas mediante microscopía directa. Los cortes histológicos teñidos con H/E sistemática que contenga floxina al 0,005% también son adecuados para este procedimiento. Las oclusiones de BP de las preparaciones húmedas de aplastamientos de tejido, de heces o de cortes histológicos emiten fluorescencia de un color verde amarillento brillante sobre un fondo verde pálido bajo epi-fluorescencia (filtro barrera de 0-515 nm y filtro de excitación de 490 nm). Los demás elementos de los tejidos y los cuerpos de oclusión de los baculovirus de los insectos no emiten fluorescencia con este método. Así, el método permite un diagnóstico rápido y específico (Bondad-Reantaso *et al.,* 2001; Lightner, 1996).

Hibridación *in-situ* (véase el apartado 4.3.1.2.3, abajo).

4.2.6. Microscopía electrónica/citopatología

La infección por BP puede confirmarse mediante observación del virus (o cuerpos de oclusión patognomónicos) en los cortes, o por la observación del virus en preparaciones de virus

semipurificadas preparadas a partir de hepatopáncreas (Couch 1974; 1991; Johnson y Lightner, 1988).

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

Véase el apartado 4.1.1.

4.3.1.1.2. Frotis

Véase el apartado 4.1.2.

4.3.1.1.3. Cortes fijados

Véase el apartado 4.2.6.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

Ninguno documentado hasta ahora.

4.3.1.2.2. Métodos de detección de antígeno basados en anticuerpos

Métodos basados en anticuerpos: se han desarrollado anticuerpos policlonales para la detección de BP (Lightner, 1996), pero no se dispone de ninguno para el diagnóstico sistemático de infecciones por BP.

4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

Hibridación *in-situ*: el método de la hibridación *in-situ* en el que se utiliza una sonda de ADN marcada con DIG sigue en general los métodos descritos por Poulos *et al.* (1994) y Lightner (1996), y se describen a continuación.

i) Se incluye en parafina el tejido fijado con solución de Davidson, y se realizan cortes de 4 µm o menos de espesor. Se sitúan los cortes sobre portas de microscopio cargados positivamente. No se debe utilizar gelatina en agua para hacer flotar los cortes; se debe utilizar solo agua destilada o desionizada.

ii) Se calientan los portas durante 30–45 minutos a 60°C. Se rehidrata el tejido del siguiente modo:

Xileno (o sustituto adecuado)	3×	5 minutos cada uno
Alcohol absoluto	2×	1 minuto cada uno
Alcohol al 95%	2×	10 inmersiones cada uno
Alcohol al 80%	2×	10 inmersiones cada uno
Alcohol al 50%	1×	10 inmersiones cada uno
Agua destilada	6×	10 inmersiones cada uno (no dejar secar los portas)

iii) Se pipetean 500 µl de proteinasa K a una concentración de 100 g/ml recién preparada en tampón TNE. Se incuban durante 15 minutos a 37°C.

iv) Se lavan los portas en formaldehído frío al 0,4% durante 5 minutos.

v) Se lavan los portas en SSC 2x durante 5 minutos a temperatura ambiente.

vi) Se prehibridan los portas utilizando 500 µl de tampón de hibridación y se incuban durante 30 minutos a 42°C en una cámara de hibridación.

vii) Se diluye una sonda específica marcada con DIG en tampón de hibridación hasta la concentración adecuada y se hierve durante 10 minutos. Se enfría de inmediato sobre hielo durante 5 minutos.

viii) Se pipetean 500 µl de sonda sobre el porta. Se sitúa sobre un bloque caliente a 85°C durante 6-7 minutos. Se enfrían inmediatamente los portas sobre hielo durante 5 minutos. Se incuban durante toda la noche a 42°C en una cámara de hibridación.

ix) Se lavan los portas del siguiente modo:

SSC 2x	2 ×	15 minutos a temperatura ambiente
SSC 1x	2 ×	5 minutos a 42°C
SSC 0,5x	2 ×	15 minutos a 42°C
Tampón I	1 ×	15 minutos a temperatura ambiente

x) Se pipetean 500 µl de tampón II (Tampón bloqueante). Se incuban a 37°C durante 30 minutos.

xi) Se pipetean 250 µl de anticuerpo anti-DIG-AP (se diluye 1 µl en 1 ml de Tampón II). Se incuban a 37°C durante 30 minutos.

xii Se lavan los portas del siguiente modo:

Tampón I	2×	10 minutos a temperatura ambiente
Tampón III	1×	5 minutos a temperatura ambiente

xiii) Se mezclan 4,5 µl de NBT (nitroazul de tetrazolio) y 3,5 µl de X-fosfato (fosfato de bromocloro-indoil) por cada ml de Tampón III que contenga alcohol polivinílico al 1%. Se pipetean 500 µl sobre cada porta y se incuban durante 1-3 horas en oscuridad a temperatura ambiente en una cámara húmeda.

xiv) Se detiene la reacción de color aplicando Tampón IV durante 5 minutos a temperatura ambiente.

xv) Se lleva a cabo una tinción de contraste de los portas y se rehidratan del siguiente modo:

Agua destilada	1×	10 inmersiones
Bismarck Brown al 0,5%	1×	2-5 minutos
Alcohol al 95%	3×	10 inmersiones cada uno
Alcohol absoluto	3×	10 inmersiones cada uno
Xileno (o sustituto adecuado)	4×	10 inmersiones cada uno

xvi) Las preparaciones e montan con Permount y un cubreobjetos. Se averigua si presentan precipitado morado/negro asociado a células.

Notas:

- Este protocolo puede llevarse a cabo en una incubadora diseñada para la hibridación *in-situ*, o bien puede utilizarse un deshidratador de alimento como fuente de calor para la cámara de la incubación *in-situ.* Los portas pueden colocarse en cajas de pipeta, con agua en el fondo, cerradas y situadas en el deshidratador. Es importante controlar la temperatura y la humedad atmosférica.
- El paso de la hibridación (viii) puede llevarse a cabo utilizando un cubreobjetos para reducir la evaporación. Si se utiliza un cubreobjetos, el volumen de sonda puede reducirse a 250 µl.
- El paso del calentamiento a 85°C es necesario para desnaturalizar el genoma de ADN bicatenario. Cuando no se desarrollan reacciones, la causa más habitual es un calentamiento insuficiente del genoma.
- Se precisa proteinasa K para eliminar la unión de la proteína al ácido nucleico y para aumentar la unión de la sonda al ácido nucleico.
- Las fórmulas de los tampones utilizados en este proceso se detallan en el apartado sobre reactivos (abajo).

Reactivo y tampones para el método de la hibridación *in-situ*:

i) Tampón Tris/NaCl/EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) (TNE) 10×

Tris base 0,5	60,57 g
NaCl 100 mM	5,84 g
EDTA-2 H_2O 1 mM	3,72 g
H_2O DD	900 ml

pH a 7,4 con HCl concentrado o 5 M. C.s.p. 1 litro. Se esteriliza en autoclave. Se guarda a 4°C. Para obtener TNE 1x, se diluyen 100 ml de solución madre 10× en 900 ml de H_2O DD; se filtran solución 1× por un filtro de 0,45 µm.

ii) Lisozima, 100 µg/ml (se prepara justo antes de utilizar)

TNE 1x	10 ml
Lisozima	1 mg

iii) Proteinasa K, 100 µg/ml (se prepara justo antes de utilizar)

TNE 1x	10 ml
Proteinasa K	100 µl de solución madre de proteinasa K (10 mg/ml)

Solución madre de PK: se añaden 100 mg de proteinasa K a 10 ml de H_2O DD. Se dispensan 100 µl en el interior de tubos y se guarda a –20°C. Se prepara la concentración de trabajo (100 µg/ml) justo antes de utilizar.

iv) Formaldehído al 0,4%

Formaldehído al 37%	5,4 ml
H_2O DD	500 ml

Se guarda a 4°C; puede volver a utilizarse 5 veces o se guardase durante 3 meses antes de desecharse.

v) Tampón de hibridación (50 ml de volumen final)

SSC 4x	10 ml de SSC 20x
Formamida al 50%	25 ml de formamida al 100%
Solución de Denhardt 1x	2,5 ml de solución de Denhardt 20×
ADN de esperma de salmón a 0,5 mg/ml	2,5 ml de solución de 10 mg/ml
Sulfato de dextrano al 5%	10 ml de sulfato de dextrano al 25%

Se guarda a 4°C

vi) Tampón SSC 20x

NaCl 3 M	175,32 g
Citrato de Na dihidratado 0,3 M	88,23 g
H_2O DD	C.s.p. 1.000 ml

pH a 7,0; se esteriliza en autoclave; se guarda a 4°C.

Para obtener SSC 2x, se diluyen 100 ml de SSC 20x en 900 ml de H_2O DD; para obtener SSC 1x, se diluyen 50 ml de SSC 20x en 950 ml de H_2O DD; para obtener SSC 0,5x, se diluyen 50 ml de SSC 20x en 1.950 ml de H_2O DD. Se filtran las soluciones por un filtro de 0,45 µm; se guarda a 4°C.

vii) Solución de Denhardt 20x

BSA (Fracción V)	0,4 g de albúmina de suero bovino
Ficoll 400	0,4 g de solución Ficoll
PVP 360	0,4 g de polivinilpirrolidona
H_2O DD	100 ml

Se filtra con un filtro de 0,45 µm; se guarda a 4°C.

viii) Sulfato de dextrano al 25%

Sulfato de dextrano	25 g
H_2O DD	C.s.p. 100 ml

Se calienta con calor suave removiendo hasta que se disuelva; se guarda congelado.

ix) ADN de esperma de salmón (10 mg/ml)

ADN de esperma de salmón	0,25 g
H_2O DD	25 ml

Se añade lentamente ADN al agua en un vaso de precipitados con una barra de agitación. Se calienta y remueve hasta que se disuelva el ADN, añadiendo más hasta que todo el ADN esté disuelto. Se esteriliza en autoclave. Se dispensa en tubos estériles. Se guarda a -20°C.

x) Tampón I 10x

Tris base 1 M	121,1 g
NaCl 1,5 M	87,7 g
H_2O DD	C.s.p. 1.000 ml

pH a 7,5 con HCl. Se esteriliza en autoclave; se guarda a 4°C.

Para obtener Tampón I 10x, se diluyen 100 ml de solución madre 10x en 900 ml de H_2O DD. Se filtran por un filtro de 0,45 µm; se guardan a 4°C.

xi) Tampón II (tampón bloqueante y Tampón de Dilución Ab)

Reactivo Genius 11	0,5 g
Tampón I	100 ml

Se calienta con calor suave removiendo durante 30 minutos para disolverlo. La solución será turbia, pero sin partículas. Se guarda a 4°C hasta un máximo de 2 semanas.

xii) Tampón III

Tris base 100 mM	12,1 g
NaCl 100 mM	0,58 g
H_2O DD	C.s.p. 1.000 ml

pH a 9,5 con HCl
A continuación añadir:

$MgCl_2.6H_2O$ 50 mM	16,10 g

Se filtra por un filtro de 0,45 µm; se guarda a 4°C.

xiii) Alcohol polivinílico (PVA) al10%

Alcohol polivinílico (30.000–70.000 MW)	10 g
H_2O DD	100 ml

Se remueve el PVA y calentarlo, si es necesario, para que disuelva. Se dispensan 10 ml/tubo. Se guardan a –20°C.

xiv) Solución de revelado

Se mezclan 90 ml de Tampón III con 10 ml de PVA al 10% y se guardan a 4°C. Justo antes de utilizar, por cada ml de Tampón III con PVA se añade:

Sal de nitroazul de tetrazolio	4,5 µl de NBT (75 mg/ml en dimetilformamida al 70%)
Sal fosfato de toluidina 5-bromo-4-cloro-3-indoil	3,5 µl de X-fosfato (50 mg/ml en dimetilformamida)

xv) Tampón IV 10x

Tris base 10 mM	1,21 g
EDTA.$2H_2O$ 1 mM	3,7 g
H_2O DD	C.s.p. 1.000 ml

pH a 8,0 con HCl 5 N. Se esteriliza en autoclave; se guarda a 4°C.

Para obtener Tampón IV 1x, se diluyen 100 ml de solución madre 10x en 900 ml de H_2O DD. Se filtra por un filtro de 0,45 µm; se guarda a 4°C.

xvi) Marrón Bismarck Y al 0,5%

Marrón Bismarck Y	2,5 g
H_2O DD	500 ml

Se disuelve la tinción en agua. Se filtra por un filtro Whatman Nº 1; se guarda a temperatura ambiente.

- *Métodos de la reacción en cadena de la polimerasa:*

El protocolo aquí descrito es una modificación del de Wang *et al.* (1996).

Muestras adecuadas: hepatopáncreas extirpado, larvas o PL enteras (combinadas), o heces. Las muestras pueden ser frescas, congeladas conservadas en etanol al 90% o en otros conservantes diseñados para la conservación de muestras destinadas a la amplificación del ADN.

Se han hallado sustancias en el hepatopáncreas y en las heces de los camarones que inhiben la polimerasa del ADN utilizada en la prueba de la PCR. Por tanto, para poder utilizar con éxito la PCR para detectar BP es necesaria una extracción previa del ADN.

Extracción del ADN

Los kits de extracción de ADN son cómodos y pueden adquirirse comercialmente. Como alternativa, puede aplicarse un procedimiento de extracción de ADN como el siguiente:

i) Se añade una muestra de heces o de hepatopáncreas al tampón de digestión (con una proporción de muestra/tampón de alrededor de 1/10 en un máximo de 400 µl de tampón) que contenga KCl 50 mM, Tris/HCl 10 mM, a pH 8,3, 0,1 mg/ml de gelatina, un 0,45% de Nonidet P-40, un 0,45% de Tween 20 y 80 µg/ml de proteinasa K, aplastada y dispersada con un palillo de madera o una punta de pipeta.

ii) Tras dispersar la muestra en el tampón de digestión, se calienta a 60°C durante 1 hora y a continuación a 95°C durante 10 minutos.

iii) Se centrifuga a 12.000 ***g*** durante 2 minutos, se transfiere el líquido sobrenadante a un tubo nuevo y se guarda sobre hielo.

iv) Se extraen 50 µl de la muestra digerida y se diluyen con 150 µl de tampón de dilución (Tris/HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 0,1 mM) y se extrae con 200 µl de fenol/alcohol isoamílico/cloroformo (PIC) (25/1/24).

v) Tras someter la muestra al vórtex durante 5 segundos, se deja el tubo 5 minutos y después se centrifuga a 12.000 ***g*** durante 2 minutos.

vi) Se extraen 160 µl de la fase acuosa (superior) y se transfieren a un nuevo tubo de microcentrífuga.

vii) El paso de extracción puede repetirse si es necesario.

viii) Se precipita el ADN añadiendo 20 µg de glucógeno (1 µl de una solución madre de 20 mg/ml), 65 µl de una solución de acetato de amonio 7,5 M y 390 µl de etanol, se guarda a -20°C durante más de 1 hora, y después se sedimenta el ADN mediante centrifugación a 12.000 ***g*** durante 5 minutos.

ix) Se lava el sedimento de ADN con 200 µl de etanol al 70% para eliminar el acetato de amonio residual, se seca y a continuación se disuelve el sedimento de ADN en 30 µl de tampón de dilución o agua destilada antes de añadir la muestra (molde) a la mezcla de reacción de la PCR y empezar la PCR.

Método de la PCR (Wang *et al.,* 1996)

Cebadores: tres cebadores directos y tres inversos escogidos de un segmento de ~1.430 pares de bases (pb) del gen de la polihedrina de BP indicados por Wang *et al.* (42). Las secuencias de estos cebadores son las siguientes:

BPA	5'-GAT-CTG-CAA-GAG-GAC-AAA-CC-3'	Temperatura 61°C
BPB	5'-ATC-GCT-AAG-CTC-TGG-CAT-CC-3'	Temperatura 64°C
BPD	5'-TGT-TCT-CAG-CCA-ATA-CAT-CG-3'	Temperatura 62°C
BPE	5'-TAC-ATC-TTG-GAT-GCC-TCT-GC-3'	Temperatura 63°C
BPF	5'-TAC-CCT-GCA-TTC-CTT-GTC-GC-3'	Temperatura 68°C
BPG	5'-ATC-CTG-TTT-CCA-AGC-TCT-GC-3'	Temperatura 64°C

Las combinaciones de estos cebadores amplifican segmentos de ADN molde de BP de: BPA/BPF – 196 pb; BPA/BPB – 560 pb; BPA/BPG – 933 pb; BPD/BPB – 207 pb; BPD/BPG – 580 pb; y BPE/BPG – 221 pb.

El siguiente procedimiento de PCR se adaptó de Wang *et al.* (1996):

i) Para la PCR de detección de BP, se desnaturaliza el ADN de cada muestra extraída calentándolo en un baño de agua hirviendo durante 3 minutos, y a continuación se enfría al momento en agua con hielo.

ii) Se añaden 25 µl de mezcla de reacción que contenga cada cebador a una concentración 5 mM, $MgCl_2$ 1,5 mM y 0,5–1 unidad de ADN polimerasa.

iii) Tras calentar la mezcla de reacción durante 3 minutos a 95°C, se llevan a cabo 30 ciclos de PCR (un paso de fusión del ADN a 94°C, un paso de hibridación del cebador a 60°C y un paso de elongación a 72°C) seguidos de un paso de elongación de 5 minutos a 72°C.

iv) Los productos de la PCR resultantes pueden compararse con estándares moleculares mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% o bien pueden analizarse para determinar si los contienen mediante una sonda de ADN específica del fragmento, siguiendo una inmunoelectrotransferencia.

v) Los siguientes controles deben incluirse en toda prueba de PCR de detección de BP: una muestra de tejido o fecal que se sepa que es negativa; una muestra de tejido o fecal que se

sepa que es positiva (esta puede ser el clon de ADN a partir del cual se ha diseñado un conjunto específico de cebadores), y un control “no molde”.

Método alternativo utilizado por el Laboratorio de Referencia de la OIE en la Universidad de Arizona (no publicado). Deben utilizarse los tipos de muestra y los métodos de extracción descritos arriba.

Cebadores: el par de cebadores, uno directo y uno inverso (6581F/6582R) escogidos del clon IR36 (denominado B1.23 por Bonami *et al.,* (1995) y depositado en el GenBank con número de acceso DQ496179) produce un amplicón de 644 pb. Las secuencias de estos cebadores son las siguientes:

6581 5’-TGT-AGC-AGC-AGA-GAA-GAG-3’

6582 5’-CAC-TAA-GCC-TAT-CTC-CAG-3’

Método:

Mezcla de reacción de la PCR:

Reactivo	**25 µl de mezcla de reacción**	**25 µl de perlas de PCR***	**Conc. final**
dH_2O	16,5 µl	23,0 µl	
Tampón 10x	2,5 µl		1×
dNTP	0,5 µl de cada		200 µM cada una
Cebador A	0,5 µl	0,5 µl	0,31 µM
Cebador B	0,5 µl	0,5 µl	0,31 µM
$MgCl_2$	1,5 µl		1,5 µM
Enzima	0,5 µl		2,5 U
Molde	1,0 µl	1,0 µl	

*Perlas de PCR PuReTaq™ Ready-To-Go™, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido

Parámetros de ciclado de la PCR:

Cebadores	**Mezcla/Perlas**	**Tiempo**	**Temp. °C**	**Nº de ciclos**
6581/6582	Mix/Perlas*	5 minutos	95	1
		30 segundos, 30 segundos, 1 minuto	95, 60, 72	35
		7 minutos	72	1
			0,5 µl	0,31 µM

4.3.1.2.4. Purificación del agente patógeno

Ninguna

4.3.2. Métodos serológicos

Ninguno aplicable.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

Los métodos actualmente disponibles para la vigilancia, la detección y el diagnóstico de BP 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 y/o no está disponible 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. *Vigilancia, detección y métodos de diagnóstico de la Baculovirosis tetraédrica* (Baculovirus penaeid)

Método	Vigilancia específica				Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
	Larvas	PL	Juveniles	Adultos		
Signos macroscópicos	c	d	d	d	d	d
Bioanálisis	d	d	d	d	c	c
MO directa	b	b	c	c	a	a
Histopatología	b	b	c	c	a	a
ME de transmisión	d	d	d	d	d	a
Pruebas basadas en anticuerpos	d	d	d	c	d	d
Sondas de ADN – *in situ*	c	c	c	c	a	a
PCR	a	a	a	a	a	a
Secuenciación	d	d	d	d	d	a

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 baculovirosis tetraédrica (*Baculovirus penaeid*)

Resultados negativos en las pruebas de detección de BP durante dos años, utilizando:

- PCR realizada en muestras del tipo y tamaño muestral adecuados; y/o
- Preparación húmeda y/o resultados histológicos en los que no se observen cuerpos de oclusión tetraédricos en muestras del tipo y tamaño adecuados.

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

En el caso de larvas (sobre todo protozoos, misis y PL tempranas): mortalidad con larvas que presenten intestinos medios blancos. En el caso de juveniles: mal crecimiento en poblaciones con antecedentes de infección por BP.

7.2. Definición de caso confirmado

Resultados positivos en cualquier combinación de al menos dos de los siguientes tres métodos:

- Observación mediante microscopía de cuerpos de oclusión tetraédricos en preparaciones húmedas de larvas enteras o hepatopáncreas extirpados. En el caso de PL más tardías, juveniles o adultos: cuerpos de oclusión tetraédricos evidentes en preparaciones húmedas de aplastamientos y/o en cortes histológicos de hepatopáncreas o en heces.

- Señal histológica positiva en la hibridación *in-situ* para lesiones propias de BP (es decir, núcleos hipertrofiados con o sin cuerpos de oclusión tetraédricos patognomónicos).

- Resultados de PCR positivos para BP

8. Bibliografía

BONAMI J.R., BRUCE L.D., POULOS B.T., MARI J. &LIGHTNER D.V. (1995). Partial characterisation and cloning of the genome of PvSNPV (= BP-type virus) pathogenic for *Penaeusvannamei*. *Dis. Aquat. Org.,***23**, 59–66.

BONDAD-REANTASO M.G., MCGLADDERY S.E., EAST I., SUBASINGHE R.P. (EDS) (2001). Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases.FAO Fisheries Technical Paper 402, Supplement 2.FAO, Rome, Italy, 240 pp.

BROCK J.A. &LIGHTNER D.V. (1990).Diseases of crustacea. Diseases caused by microorganisms. *In:* Diseases of Marine Animals, Vol. III, Kinne O., ed. BiologischeAnstalt Helgoland, Hamburg, Germany, 245–349.

BROCK J.A. &MAIN K. (1994).A Guide to the Common Problems and Diseases of Cultured *Penaeusvannamei*. Published by the Oceanic Institute, Makapuu Point, Honolulu, Hawaii, USA. 242 pp.

BROCK J.A., NAKAGAWA L.K., VAN CAMPEN H., HAYASHI T. &TERUYA S. (1986). A record of *Baculoviruspenaei* from *Penaeusmarginatus* Randall in Hawaii.*J. Fish Dis.,***9**, 353–355.

BRUCE L.D., LIGHTNER D.V., REDMAN R.M. &STUCK K.C. (1994).Application of traditional and molecular detection methods to experimental studies on the development of *Baculoviruspenaei* (BP) infections in larval *Penaeusvannamei*.*J. Aquat. Anim. Health*, **6**, 355–359.

BRUCE L.D., REDMAN R.M., LIGHTNER D.V. &BONAMI J.R. (1993). Application of gene probes to detect a penaeid shrimp baculovirus in fixed tissue using *in situ* hybridization. *Dis. Aquat. Org*., **17**, 215–221.

BUENO S.L.S., NASCIMENTO R.M. &NASCIMENTO I. (1990). *Baculoviruspenaei* infection in *Penaeussubtilis*: A new host and a new geographic range of the disease. *J. World Aquaculture Soc*., **21**, 235–237.

CHEN S.N., CHANG P.S. &KOU G.H. (1990). Infection route and eradication of *Penaeusmonodon*baculovirus (MBV) in larval giant tiger prawns, *Penaeusmonodon*.*In:* Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States, Fulks W. & Main K.L., eds. Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 177–184.

COUCH J.A. (1974). An enzootic nuclear polyhedrosis virus of pink shrimp: ultrastructure, prevalence, and enhancement*. J. Invertebr. Pathol*.,**24**, 311–331.

COUCH J.A. (1991). Baculoviridae.Nuclear Polyhedrosis Viruses.Part 2.Nuclear Polyhedrosis Viruses of Invertebrates Other Than Insects.*In:* Atlas of Invertebrate Viruses, Adams J.R. &Bonami J.R., eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 205–226.

DURAND S., LIGHTNER D.V. & BONAMI J.R. (1998).Differentiation of BP-type baculovirus strains using *in situ* hybridization. *Dis. Aquat. Org*., **32**, 237–239.

HAMMER H.S., STUCK K.C. & OVERSTREET R.M. (1998). Infectivity and pathogenicity of *Baculoviruspenaei* (BP) in cultured larval and postlarval Pacific white shrimp, *Penaeusvannamei*, related to the stage of viral development. *J. Invertebr. Pathol*.,**72**, 38–43.

JOHNSON P.T. &LIGHTNER D.V. (1988). Rod-shaped nuclear viruses of crustaceans: gut-infecting species. *Dis. Aquat. Org.,***5**, 123–141.

LE BLANC B.D. & OVERSTREET R.M. (1990). Prevalence of *Baculoviruspenaei* in experimentally infected white shrimp (*Penaeusvannamei*) relative to age. *Aquaculture*, **87**, 237–242.

LE BLANC B.D. & OVERSTREET R.M. (1991).Effect of dessication, pH, heat and ultraviolet irridation on viability of *Baculoviruspenaei*.*J. Invertebr. Pathol*.,**57**, 277–286.

LE BLANC B.D., OVERSTREET R.M. &LOTZ J.M. (1991).Relative susceptibility of *Penaeusaztecus* to *Baculoviruspenaei*.*J. World Aquaculture Soc*., **22**, 173–177.

LIGHTNER D.V. (ED.) (1996).A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp.World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.304 pp.

LIGHTNER D.V. (1999). The penaeid shrimp viruses TSV, IHHNV, WSSV, and YHV: current status in the Americas, available diagnostic methods and management strategies. *J. Applied Aquaculture*, **9**, 27–52.

LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, 164, 201–220.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M. &ALMADA RUIZ E.A. (1989).*Baculoviruspenaei* in *Penaeusstylirostris*(Crustacea: Decapoda) cultured in Mexico: unique cytopathology and new geographic record. *J. Invertebr. Pathol*., **53**, 137–139.

MACHADO C.R., BUENO S.L. DE S. &MENCK C.F.M. (1995). Cloning shrimp *Baculoviruspenaei* DNA and hybridization comparison with *Autographacalifornica* nuclear polyhedrosis virus.*Rev. Brasil. Genet*. (*Brazil. J. Genetics*), **18**, 1–6.

OVERSTREET R.M. (1994). BP (*Baculoviruspenaei*) in penaeid shrimps. USMSFP 10th Anniversary Review, GCRL Special Publication No. 1, 97–106.

OVERSTREET R.M., STUCK K.C., KROL R.A. &HAWKINS W.E. (1988). Experimental infections with *Baculoviruspenaei* in the white shrimp *Penaeusvannamei* as a bioassay.*J. World Aquaculture Soc.,***19**, 175–187.

POULOS B.T., MARI J., BONAMI J.R., REDMAN R., &LIGHTNER D.V. (1994). Use of non-radioactively labeled DNA probes for the detection of a baculovirus from *Penaeusmonodon* by in situ hybridization on fixed tissue*. J. Virol. Methods,***49**, 187–194.

STUCK K.C. & OVERSTREET R.M. (1994).Effect of *Baculoviruspenaei*on growth and survival of experimentally infected postlarvae of the Pacific white shrimp, *Penaeusvannamei*.*J. Invertebr. Pathol*.,**64**, 18–25.

STUCK K.C., STUCK L.M., OVERSTREET R.M. & WANG S.Y. (1996). Relationship between BP (*Baculoviruspenaei*) and energy reserves in larval and postlarval Pacific white shrimp *Penaeusvannamei*. *Dis. Aquat. Org*., **24**, 191–198.

STUCK K.C. & WANG S.Y. (1996).Establishment and persistence of *Baculoviruspenaei* infections in cultured Pacific white shrimp *Penaeusvannamei*.*J. Invertebr. Pathol*.,**68**, 59–64.

SUMMERS M.D. (1977). Characterization of Shrimp Baculovirus.U.S. Environmental Protection Agency Report, EPA-600/3-77-130, US E.P.A., Gulf Breeze, Florida, USA, 35 pp.

WANG S.Y., HONG C. &LOTZ J.M. (1996).Development of a PCR procedure for the detection of *Baculoviruspenaei* in shrimp.*Dis. Aquat. Org*., **25**, 123–131.

*
* *

NB: Existen un Laboratorio de Referencia de la OIE para la Baculovirosis tetraédrica (*Baculovirus penaei*) (puede consultarse en la Tabla del final de este *Manual Acuático* o en la página web de la OIE: www.oie.int).

APARTADO 2.3.

ENFERMEDADES DE LOS PECES

CAPÍTULO 2.3.0.

INFORMACIÓN GENERAL

A. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

1. Evaluación del estado sanitario de la unidad epidemiológica

1.1. Tipos de muestras que deben utilizarse para las pruebas

El tipo de muestra y la cantidad de muestras que deben recogerse dependen de la enfermedad o agente patógeno, del tamaño de los animales y del objetivo de la prueba (es decir, si se trata del diagnóstico de una enfermedad manifiesta, la detección de peces portadores subclínicos de agentes patógenos o una vigilancia específica para demostrar la ausencia de una enfermedad determinada). En la *Guía de la OIE para la Vigilancia Sanitaria de los Animales Acuáticos* (2009) y en el Capítulo 1.3 del Código Sanitario de la OIE para los Animales Acuáticos se ofrece información sobre el diseño y la evaluación de los sistemas de vigilancia para animales acuáticos, y en los capítulos de este *Manual Acuático* dedicados a cada enfermedad se ofrecen detalles sobre los requisitos de las muestras.

1.2. Especificaciones en función de la población de peces

En la *Guía de la OIE para la Vigilancia Sanitaria de los Animales Acuáticos* (2009) y en el Capítulo 1.4 del *código Sanitario de la OIE para los Animales Acuáticos* se ofrecen datos generales. Los detalles concretos sobre los requisitos de las muestras para cada enfermedad de la lista de la OIE se ofrecen en cada uno de los capítulos correspondientes de este *Manual Acuático.* En ausencia de pruebas que indiquen lo contrario, el diseño de un sistema de vigilancia para demostrar la ausencia de enfermedad en un país, zona o compartimiento precisa un nivel mínimo de muestras adecuado para una prevalencia supuesta del 2% utilizando una prueba que se considere sensible al 100%, y para mantener el esa ausencia de enfermedad, debe realizarse un muestreo adecuado para una prevalencia supuesta del 5 al 10%.

1.3. Especificaciones en función del estado clínico

En el caso de infección clínica, además de alevines o vísceras enteras, otros órganos que también deben tomarse son el riñón anterior, el bazo y el corazón o el encéfalo para la mayoría de pruebas de detección de virus (branquias e intestino cuando se pretenda detectar el herpesvirus koi), piel o músculo cuando se pretenda diagnosticar el síndrome ulcerante epizoótico, y piel y aletas para detectar *Gyrodactyluls salaris.* Las muestras de diez peces clínicamente enfermos deben ser suficientes para la/s prueba/s de detección de agentes patógenos en cada unidad epidemiológica. Para detectar portadores subclínicos de virus o para la vigilancia específica en la que se exija una gran cantidad de muestras, las muestras pueden combinarse formando muestras compuestas como se indica en cada capítulo específico del *Manual Acuático.*

1.4. Especificaciones en función del tamaño de los peces

1.4.1. Para las enfermedades de la lista, excepto la herpesvirosis de la carpa koi y la encefalopatía y retinopatía virales

Alevines y alevines con saco vitelino: se obtiene el pez entero pero se retira el saco vitelino si lo hay.

Peces de entre 4 y 6 cm: se extraen las vísceras enteras, incluido el riñón. Puede obtenerse un trozo de encéfalo tras separar la cabeza a nivel del borde posterior del opérculo y presionando lateralmente.

Peces de más de 6 cm: se extrae el riñón, el bazo y el corazón o el encéfalo y/o los tejidos adecuados para el agente patógeno específico que se desee detectar (consúltense los detalles en los capítulos sobre cada enfermedad en este *Manual Acuático*).

Peces adultos: se extrae el líquido ovárico, el esperma y/o los tejidos adecuados para el agente patógeno específico que se desee detectar (consúltense los detalles en los capítulos sobre cada enfermedad en este *Manual Acuático*

1.4.2. Para el síndrome ulcerante epizoótico (SUE)

Cualquier tamaño de pez: riñón, hígado, tejido muscular (para detalles específicos véase el Capítulo 2.3.2. Síndrome ulcerante epizoótico).

1.4.3. Para *Gyrodactylussalaris*

Cualquier tamaño de pez: piel y aletas (para detalles específicos véase el Capítulo 2.3.3. Girodactilosis [*Gyrodactylussalaris*]).

1.4.4. Para la herpesvirosis de la carpa Koi (HVK)

Peces de entre 4 cm y adultos: se extraen las branquias, el riñón, el bazo, el encéfalo y tejidos intestinales en función de la prueba utilizada (para detalles específicos véase el Capítulo 2.3.6. Herpesvirosis de la carpa Koi).

1.4.5. Para la encefalopatía y retinopatía virales(ERV)

Peces de entre 2 y 4 cm: se toma la cabeza entera.

Peces de entre 4 cm y adultos: se toma el encéfalo y posiblemente los ojos y la medula espinal (para detalles específicos véase el Capítulo 2.3.11. Encefalopatía y retinopatía virales).

2. Procesado general de las muestras

2.1. Examen macroscópico

En el caso de las enfermedades de la lista de la OIE, el examen macroscópico se utiliza principalmente para detectar signos clínicos del síndrome ulcerante epizoótico o *Gyrodactylus salaris,* pero va seguido de un examen microscópico de preparaciones histológicas para el primero, o de preparaciones húmedas de raspados de piel/aletas para el segundo.

2.2. Examen virológico

2.2.1. Transporte y tratamiento de las muestras con antibiótico

Se depositan muestras compuestas de órganos o de líquidos ováricos en viales estériles y se guardan a 4°C o sobre hielo hasta que se extrae el virus en el laboratorio. Lo ideal es llevar a cabo la extracción del virus en un plazo de 24 horas tras recoger los peces, pero también es aceptable un plazo de 48 horas si la temperatura se mantiene a 0°C–4°C, o plazos más largos en el caso de muestras de enfermedades clínicas que se hayan congelado a -80°C. Sin embargo, debe evitarse la congelación de muestras destinadas a la detección de portadores subclínicos.

Las muestras de órganos también pueden transportarse al laboratorio introduciéndolas en viales que contengan medio de cultivo celular o solución salina equilibrada de Hank (HBSS) con antibióticos que supriman el crecimiento de contaminantes bacterianos (un volumen de órgano en al menos cinco volúmenes de líquido de transporte). Las concentraciones de antibiótico adecuadas son: gentamicina (1000 µg ml^{-1}) o penicilina (800 Unidades Internacionales [IU] ml^{-1}) y estreptomicina (800 µg ml^{-1}). Al medio de transporte también pueden añadirse compuestos antifúngicos como Mycostatin® o Fungizone®, a una concentración final de 400 IU ml^{-1}. Puede añadirse suero o albúmina (5–10%) para estabilizar el virus si el transporte va a durar más de 12 horas.

2.2.2. Extracción de virus

Este procedimiento debe llevarse a cabo a temperaturas inferiores a los 15°C (preferiblemente a 0 a 10°C)

- Se decanta el medio suplementado con antibiótico para separarlo de la muestra de órganos.

- Se homogeneizan las muestras de órganos compuestas en medio de transporte a una dilución final de 1/10 con un mortero o un homogeneizador eléctrico hasta obtener una pasta.
- Se centrifuga el homogenado en una centrífuga a 2–5°C a 2.000-4.000 ***g*** durante 15 minutos, se recoge el sobrenadante y se trata durante cuatro horas a 15°C o bien durante toda la noche a 4°C con antibióticos, como gentamicina 1 mg ml^{-1}. Si el envío de la muestra se ha llevado a cabo en un medio de transporte (es decir, con exposición a antibióticos) el tratamiento del sobrenadante con antibióticos puede omitirse. El tratamiento con antibióticos hace innecesaria la filtración por filtros de membrana.
- De igual forma, las muestras de líquido ovárico pueden tratarse con antibióticos para controlar la contaminación microbiana, pero no deben diluirse más de cinco veces en el medio que contiene HBSS y antibiótico.
- Las muestras de líquido ovárico deben centrifugarse como los homogenados de órganos, y sus sobrenadantes deben utilizarse directamente en pasos posteriores.

2.2.3. Tratamiento para neutralizar virus enzoóticos

Los peces a menudo son portadores subclínicos de virus endémicos, como birnavirus (por ejemplo, el de la necrosis pancreática infecciosa [VNPI]), que inducen un efecto citopático en cultivos celulares susceptibles y, por tanto, complican el aislamiento y la identificación de los agentes patógenos en cuestión. En este tipo de situaciones, la infectividad de los virus enzoóticos debe neutralizarse antes de llevar a cabo pruebas de detección de virus de la lista del *Código Sanitario de Animales Acuáticos.* Sin embargo, cuando es importante determinar si está presente uno de los virus enzoóticos, las muestras deben analizarse en presencia y en ausencia de anticuerpos neutralizantes (NAb).

Para neutralizar los birnavirus acuáticos, se mezclan volúmenes iguales (200 µl) de una solución de uno o más NAb contra los serotipos de birnavirus autóctonos con el sobrenadante a analizar. Se deja que la mezcla reaccione durante 1 hora a 15°C o durante toda la noche a 4°C antes de inocularla en monocapas celulares susceptibles. El título de la solución de NAb utilizada debe ser de al menos 2000 en una prueba de reducción del 50% de placas frente a los serotipos víricos presentes en la zona geográfica en cuestión.

Cuando las muestras proceden de un país, región o población o unidad de producción de peces considerados libres de infecciones víricas enzoóticas, este tratamiento del homogenado de órganos debe omitirse.

Este enfoque también puede utilizarse para neutralizar otros virus enzoóticos de la zona analizada.

2.3. Examen parasitario

En el Capítulo 2.3.3. Girodactilosis (*Gyrodactylus salaris*) se ofrecen detalles concretos.

2.4. Examen fúngico

En el Capítulo 2.3.2. Síndrome ulcerante epizoótico se ofrecen detalles concretos.

B. MATERIALES Y PRODUCTOS BIOLÓGICOS NECESARIOS PARA EL AISLAMIENTO Y LA IDENTIFICACIÓN DE AGENTES PATÓGENOS DE LOS PECES

1. Virus de los peces

1.1. Líneas celulares de peces

Las siguientes líneas celulares de peces se utilizan para detectar los agentes patógenos víricos mencionados en el *Manual Acuático*:
Epitelioma papuloso de carpa (EPC)
Alevines de mojarra de oreja azul (BF-2)
Piscardo (FHM)
Gónadas de trucha arco iris (RTG-2)
Embrión de salmón real (CHSE-214)
Riñón cefálico de salmón (SHK-1)
Riñon de salmón del Atlántico (ASK)

Aleta de ronco (GF)
Aleta de carpa Koi (KF-1)
Encéfalo de carpa (CCB)

Channa striata (SSN-1)

1.2. Medios de cultivo

El medio mínimo esencial de Eagle (EMEM) tradicional con sal de Earle suplementado con suero fetal bovino al 10% (FBS), agentes antimicrobianos y L-glutamina 2 mM es el más utilizado en los cultivos de células de peces.

Sin embargo, el medio de Stoker, que es una forma modificada del anterior y está formado por una concentración doble de ciertos aminoácidos y vitaminas, se recomienda en concreto para potenciar el crecimiento celular, utilizando las mismas suplementaciones que antes + un 10% de fosfato de triptosa.

Estos medios están tamponados con bicarbonato sódico, tris-hidroximetil aminometano (Tris) 0,16 M, HCl, o, preferiblemente, ácido N-2-hidroxietil-piperacina-N-2-etanosulfónico (HEPES) 0,02 M. La utilización de bicarbonato sódico solo se restringe a los cultivos celulares preparados en recipientes muy bien cerrados.

Como alternativa, para ciertas líneas celulares, como SHK-1, se recomienda el medio de Leibovitz (L15) suplementado con FBS (al 5% o 10%), L-glutamina (4 mM) y gentamicina (50 µg ml^{-1}).

Para el crecimiento celular, el contenido en FBS del medio suele ser del 10%, mientras que para el aislamiento de virus o la producción de virus puede reducirse al 2%. De forma similar, el pH del medio de cultivo para el crecimiento celular es de 7,3-7,4 y se ajusta a 7,6 para la producción de virus o las pruebas de detección de virus.

La composición de las mezclas de agentes antimicrobianos más utilizados es penicilina (100 IU ml^{-1}) y dihidrostreptomicina (100 µg ml^{-1}). Se añade micostatina (50 IU ml^{-1}) si es probable que se produzca contaminación fúngica. Pueden utilizarse otros agentes antimicrobianos o concentraciones de los mismos según considere el técnico, en función de la sensibilidad a los antimicrobianos de las cepas bacterianas o fúngicas con las que se encuentre.

1.3. Controles positivos para virus y preparación del antígeno

1.3.1. Nomenclatura de los virus

- Virus de la necrosis hematopoyética epizoótica (VNHE)
- Virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (VNHI)
- Virus de la anemia infecciosa del salmón (VAIS)
- Herpesvirus Koi (HVK)
- virus de *Oncorhynchus masou* (VOM)
- Iridovirus de la dorada japonesa (IVDJ)
- Virus de la viremia primaveral de la carpa (VVPC)
- Virus de la septicemia hemorrágica viral (VSHV)
- Virus de la encefalopatía y retinopatía virales (VERV) también denominado virus de la necrosis nerviosa viral (VNNV).

1.3.2. Producción de virus

Para la producción *in Vitro* de la mayoría de cultivos madre de estos virus, deben inocularse cultivos de monocapas celulares (consúltense los apartados pertinentes de este *Manual Acuático*) en recipientes de cultivo tisular adecuados (por ejemplo, frascos de plástico) con multiplicidades de infección (m.d.i.) bastante bajas, es decir, de 10^{-2} a 10^{-3} unidades formadoras de placas (UFP) por célula.

Las temperaturas preferibles para la propagación del virus son las siguientes:

- 15°C para VNHI, VSHV, VOM y VERV (genotipo BFNNV) y VAIS
- 20°C para VVPC, HVK y VERV (genotipos BFNNV, SJNNV y TPNNV)

- 22°C para VNHE
- 25°C para IVDJ y VERV (genotipos RGNNV y SJNNV)
- 30°C para VERV (genotipo RGNNV)

1.3.3. Conservación y almacenaje de cultivos víricos madre

- Se centrifugan los cultivos celulares a 2-5°C y a 2.000-4.000 ***g*** durante 15 minutos y a continuación se diluyen los sobrenadantes que contienen el virus para obtener títulos víricos de una media de 10^6 UFP ml^{-1}.
- Se dispensan las suspensiones víricas resultantes en viales estériles a razón de 0,3–0,5 ml cada uno.
- Se congela y guarda cada serie de suspensiones madre víricas estándar a -80°C o en nitrógeno líquido, y se comprueba el título de cada suspensión vírica madre a intervalos periódicos si no se ha utilizado desde la última comprobación.

Liofilización: se pueden guardar inóculos de cepas víricas estándar durante largos periodos (décadas) liofilizándolas. Para ello, suspensiones víricas en medio de cultivo celular suplementado con un 10% de suero fetal bovino se mezclan (v/v) con un volumen igual de medio crioprotector (como hidrolizado de lactoalbúmina al 20% en agua destilada) antes del procesado. Se sella o tapa al vacío y se guarda a 4°C, en la oscuridad.

2. Técnicas

2.1. Serología

2.1.1. Producción de antisueros y anticuerpos policlonales de conejo contra virus de peces

Existen varias formas de generar en conejos anticuerpos contra virus de peces. Sin embargo, el título y la especificidad están influidos por el programa de inoculación que se utilice. Para producir antisueros que vayan a ser utilizados en los procedimientos de aislamiento y/o identificación de virus descritos más adelante puede utilizarse los siguientes protocolos de inmunización.

2.1.1.1 Antisueros contra el virus de la necrosis pancreática infecciosa

Inyección intravenosa de 50–100 µg de virus purificado el día 0, seguida de un recordatorio idéntico el día 21, y sangrado 5-7 días después. Los conejos pueden volver a ser utilizados si no se sangran por completo.

2.1.1.2 Antisueros contra otros virus

Los protocolos de inmunización alternan una inyección intramuscular o intradérmica con futuros recordatorios por vía intravenosa:

Día 0: Inyección principal, 500–1.000 µg de virus purificado se mezclan (v/v) con adyuvante (incompleto de Freund u otros[1] adyuvantes que se consideran más aceptables) administrando un volumen total de 1,2 ml. Este antígeno se administra al conejo como inyecciones intradérmicas en varios puntos (2 puntos a cada lado) una vez el animal ha sido rasurado.

Día 21: Se toma una muestra de unos 2 ml de sangre y se comprueba su reactividad (neutralización, fluorescencia); se vuelve a inyectar por vía intravenosa la misma cantidad de virus purificado que en la inyección principal, pero sin adyuvante. Antes de la segunda inyección intravenosa, el conejo debe ser tratado con prometazina (12 mg por vía intramuscular) para prevenir una posible respuesta anafiláctica.

Día 28: Se toma una muestra de sangre, se comprueba la reactividad del suero y se sangra o vuelve a inyectar el conejo en función de los resultados.

En el caso de los rabdovirus, este procedimiento de inmunización está bien adaptado a la producción de antisueros que se utilizan en la inmunofluorescencia y en el enzimoinmunoanálisis. No obstante, un método más eficiente de producción de antisueros neutralizantes es la inyección intravenosa regular sin

1 La utilización de los adyuvantes completos de Freund puede estar restringida en contextos de bienestar animal. Los adyuvantes sintéticos alternativos son el dimicolato de trehalosa o el monofosfato lípido A.

adyuvante (0,2 ml) cada 3-4 días (dos veces a la semana). Pueden ser necesarias incluso 15 inyecciones; 1 semana después de la última inyección, debe recogerse y analizarse una muestra de suero.

2.1.3. Procesado y almacenaje de sueros inmunes

Tras la coagulación de la sangre, se recoge y centrifuga el suero a 20 °C y se calienta durante 30 minutos a 56°C. Se filtra el suero resultante inactivado por calor por un filtro de membrana (de 450 nm de tamaño de poro) y se guarda temporalmente a 4°C durante el tiempo necesario para comprobar su reactividad y especificidad y para comprobar que estas propiedades no resulten afectadas por las condiciones de conservación (por ejemplo, la congelación o la liofilización). Los sueros estériles de conejo pueden guardarse durante al menos 2 meses a 4°C sin riesgo de que se alteren sus propiedades. Se distribuyen (normalmente en pequeños volúmenes) y se congelan a -20°C o se liofilizan.

Pueden extraerse inmunoglobulinas (Ig) de antisueros mediante métodos convencionales adecuados para la purificación de Ig. La unión selectiva a la proteína A constituye un método fiable y eficaz. La concentración de soluciones de Ig se ajusta a los valores exigidos para la posterior preparación o almacenaje de conjugado.

Conservación de Ig: Se mezcla una solución de Ig con una concentración de 2 mg/litro con glicerol estéril puro (v/v) y se guarda a -20°C. También pueden prepararse soluciones de Ig con una concentración superior, utilizando también glicerol.

2.1.4. Anticuerpos monoclonales de ratón

A lo largo de los últimos años se han generado anticuerpos monoclonales (MAb) contra la mayoría de virus de peces. Algunos de estos, aisladamente o en forma de dos o tres MAb asociados, han dado lugar a reactivos biológicos adecuados para la identificación de grupos de virus (NPI, SHV, NHI). Otros MAbs, tomados individualmente o como componentes de conjuntos de Ab, permiten una tipificación precisa de VSHV y VNHI. Estos MAb pueden obtenerse en los Laboratorios de Referencia de la lista que aparece al final de este *Manual Acuático*.

Teóricamente, los IgG monoclonales de ratón pueden procesarse y guardarse igual que los IgG policlonales. Sin embargo, la reactividad de ciertos MAb puede quedar perjudicada por procesos como los enzimáticos, el marcaje con sustancias radiactivas o la liofilización. Por tanto, es necesario analizar cómo influyen en distintos MAb las condiciones en las que se utilizarán.

2.2. Microscopía directa

Las muestras para el examen mediante microscopía directa de frotis o improntas de tejidos deben examinarse cuanto antes tras la recogida. Siempre que sea posible deben utilizarse ejemplares vivos, o frescos, refrigerados a 4°C o fijados con formalina tamponada al 10% cuando no se disponga de ejemplares vivos. Si se dispone de un laboratorio de campo adecuado, debe utilizarse para procesar y examinar las muestras cerca del lugar donde se han recogido.

2.3. Técnicas histológicas

2.3.1. Fijación e inclusión de tejidos

Para la histología solo deben tomarse muestras de ejemplares vivos o moribundos de peces con lesiones clínicas. Los tejidos retirados se fijan de inmediato en formalina tamponada al 10%. Se utilizan al menos diez volúmenes de fijador por cada volumen de muestra de tejido y se deja fijar durante al menos 24 horas. Tras retirar el fijador, las muestras de tejido se deshidratan en concentraciones crecientes de etanol, se aclaran en un agente miscible en cera, como el xileno, y a continuación se incluye en parafina mediante los protocolos estándar.

2.3.2 Corte y tinción de tejidos

Se realizar cortes de unos 5 μm de espesor a partir del bloque. Se monta cada corte sobre un porta, se retira la cera con agente miscible en cera, como el xileno o 'Clearene®', y se rehidrata.

Para los exámenes de la mayoría de enfermedades, los cortes a continuación pueden teñirse con hematoxilina y eosina (H/E), mediante el siguiente procedimiento:

Retirada de la cera

1. Se sumergen los portas en 'Clearene®' para retirar la cera, durante un mínimo de 2 minutos.
2. Se repite el paso 1 en xileno o 'Clearene'.
3. Se sumergen en alcohol al 1005 para retirar el disolvente, durante un mínimo de 2 minutos.
4. Se repite el paso 3 en alcohol al 100% limpio.

Tinción

5. Se lavan bajo el chorro de agua del grifo (RTW) durante 2–5 minutos. Los portas deben estar transparentes, no turbios.
6. Se sumergen en una solución de hematoxilina durante 3 minutos
7. Se vuelven azules bajo el RTW durante 5–10 minutos (o carbonato de litio saturado); no pueden volverse excesivamente azules.
8. Se sumergen en ácido/alcohol durante un máximo de 10 segundos.
9. Se lavan en RTW (o carbonato de litio) hasta que están azules.
10. Se comprueba al microscopio si el citoplasma está transparente y los núcleos azules.
11. Se sumergen en eosina acuosa durante 3 minutos.
12. Se lavan bien en RTW para diferenciar la eosina.

Deshidratación, lavado y montaje

13. Se lavan bien en alcohol al 70% pero no durante demasiado tiempo, puesto que este elimina la eosina.
14. Se sumergen en alcohol al 100% durante 1–2 minutos.
15. Se repite el paso 14 en alcohol limpio.
16. Se sumergen en alcohol/Clearene 50/50 durante 1–2 minutos.
17. Se sumergen en Clearene.
18. Se repite con un baño de Clearene limpio, los portas deben estar transparentes.
19. Se montan en medio de montaje DPX (distiereno, plastificante y xileno) y se dejan secar.

Para observar granulomas e hifas fúngicas, como ocurre en el síndrome ulcerante epizoótico, puede utilizarse una tinción fúngica general, como la de Grocott-Gomori, en lugar de H/E.

2.3.3 Preparación de portas para la inmunohistoquímica

Es importante observar que una fijación prolongada puede enmascarar los antígenos de interés. Por tanto, se recomienda aplicar una fijación mínima garantizando al mismo tiempo una conservación óptima (24-48 horas). La fijación se puede reducir más cuando se utilizan trozos pequeños de tejido. Sin embargo, se recomienda incorporar un paso de recuperación de antígeno (incluido en el protocolo que se indica a continuación) siempre que sea posible. A continuación, se indica un protocolo estándar de inmunohistoquímica que se usa de forma sistemática en laboratorios de histología, pero debido a posibles variaciones entre anticuerpos y a los kits de detección comerciales, es probable que cada cual tenga que optimizar la técnica en función de sus propios objetivos. Dichos objetivos incluirían factores como la determinación del título óptimo de anticuerpos, que es la dilución más alta que da lugar a la tinción específica más intensa y al mismo tiempo menor tinción "de fondo" inespecífica. Además, es posible que cada cual tenga que plantearse la posibilidad de corregir la duración de la incubación del reactivo.

1. Se llevan a cabo los pasos 1–5 del apartado 2.3 2.
2. Se enjuagan los portas en dos cambios de Tween 20 al 0,2% en PBS durante 2 minutos.
3. Se lleva a cabo la recuperación del antígeno colocando los portas en una cubeta Coplin de plástico que contenga tampón citrato de sodio y se coloca sobre una rejilla de una vaporera situada dentro de una olla a presión.
4. Se calienta la olla a presión con calor intenso hasta que el indicador de salida de vapor indique que se ha alcanzado la presión máxima.

5. Se reduce la temperatura y se deja sobre un calientaplatos unos 10 minutos manteniendo la presión.
6. Se retira del calientaplatos y se deja enfriar y evaporar unos 20-30 minutos en una campana de gases antes de abrirla.
7. Se extra la cubeta Coplin de la olla a presión y se sustituye el tampón citrato de sodio por agua de grifo tibia seguida de agua de grifo fría y agua destilada. Esto sirve para enfriar los portas progresivamente.
8. Si es necesario, se lleva a cabo un bloqueo de la actividad biotina/avidina endógena (a) se incuban los protas durante 15-20 minutos en avidina al 0,005% en PBS (b) se enjuaga en PBS y a continuación (c) se incuban en biotina al 0,005% en PBS durante 15-20 minutos. Como alternativa, se utiliza un sistema de bloqueo comercial de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Esto normalmente se lleva a cabo en tejidos que contienen altos niveles de biotina, como el hígado, el riñón o el bazo.
9. Se enjuagan los portas brevemente en agua de grifo.
10. Se enjuagan los portas en Tween 20 al 0,2% en PBS durante 2 minutos.
11. Se inclinan para retirar el reactivo y se secan alrededor del corte de tejido asegurando que el corte se mantenga húmedo.
12. Se incuban con anticuerpo primario a 25°C durante 30 minutos con una rotación orbital suave si se dispone de ella.
13. Se enjuagan los portas en Tween 20 al 0,2% en PBS de una botella de lavado.
14. Se inclinan para retirar el reactivo y se secan alrededor del corte de tejido asegurando que el corte se mantenga húmedo
15. Se incuban con anticuerpo secundario biotinilado a 25°C durante 10 minutos con una rotación orbital suave si se dispone de ella.
16. Se enjuagan los portas en Tween 20 al 0,2% en PBS de una botella de lavado.
17. Se inhibe la actividad peroxidasa endógena colocando los portas en peróxido de hidrógeno al 0,3% en PBS con azida sódica al 0,1% durante 10-15 minutos a temperatura ambiente.
18. Se enjuagan los portas en Tween 20 al 0,2% en PBS de una botella de lavado.
19. Se incuba con el complejo comercial preferido de detección de estreptavidina marcada con peroxidasa a 25°C durante 10 minutos con una rotación orbital suave si se dispone de ella.
20. Se enjuagan los portas en Tween 20 al 0,2% en PBS de una botella de lavado.
21. Se aplica cromógeno DAB a los portas y se desarrolla el producto de la reacción realizando un seguimiento al microscopio durante el tiempo óptimo. La duración variará en función del producto de DAB utilizado.
22. Se detiene la reacción colocando los portas en agua de grifo.
23. Se lleva a cabo una potenciación cromógena (opcional) colocando los portas en sulfato de cobre al 0,5% en PBS durante 1-5 minutos a 25°C con una rotación orbital suave.
24. Se enjuagan en agua destilada.
25. Se aplica una tinción de contraste con hematoxilina de Harris durante 2-3 minutos.
26. Se enjuagan con agua.
27. Se deshidratan, se aclaran y se montan.

Preparación del reactivo

PBS-Tween 20 (0,2%):	Solución salina tamponada con fosfato	10 litros
	Tween 20	2 ml
Tampón citrato de sodio:	Citrato de tri-sodio (dihidrato)	2,94g
	Agua destilada	1 litro
	Tween 20	0,5 ml

Se mezcla para disolver, se ajusta el pH a 6,0 con HCl 1 N antes de añadir el Tween 20. Se guarda esta solución a temperatura ambiente un máximo de 3 meses o a 4°C si el periodo de almacenaje va a ser superior.

2.4. Microscopía electrónica

La microscopía electrónica (de transmisión o de barrido) es una útil herramienta de investigación para el estudio de las enfermedades de los animales acuáticos. No obstante, estos métodos no se suelen utilizar en el diagnóstico sistemático de las enfermedades de los peces de la lista de la OIE, de modo que en este *Manual Acuático* no están descritos.

2.5. Utilización de técnicas moleculares para análisis y diagnóstico confirmativos

Se han desarrollado técnicas moleculares, como sondas de ácido nucleico y una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para identificar muchos agentes patógenos de los animales acuáticos. Sin embargo, como ocurre con muchas otras técnicas de diagnóstico, la ventaja de la sensibilidad a menudo queda contrarrestada por problemas de interpretación o susceptibilidad a problemas técnicos. Al utilizar la PCR como método de diagnóstico, es importante el diseño de cebadores y sondas, la utilización de controles, y la validación del método de PCR elegido. La PCR puede depender bastante de las condiciones en las que se ejecuta y puede estar muy sujeta a la contaminación del laboratorio por productos de PCR previos, lo cual da lugar a falsos positivos. Así pues, aunque en esta versión del *Manual Acuático* se incluyen varios protocolos de sondas de ácido nucleico y de PCR como métodos de diagnóstico o confirmativos para peces, siempre que ha sido posible se han especificado técnicas bien conocidas (como el aislamiento del virus) como métodos estándar de detección. Siempre que se utilicen estas técnicas moleculares más recientes, deben llevarse a cabo con cautela y prestando especial atención a la utilización de controles positivos y negativos apropiados.

2.5.1. Preparación y tipos de muestras

En el caso de estas técnicas, las muestras deben prepararse para conservar el ácido nucleico del patógeno. Asimismo, las muestras destinadas a análisis con métodos basados en anticuerpos deben conservarse para retener los puntos antigénicos reactivos a los anticuerpos utilizados.

Las muestras destinadas a análisis basados en el ácido nucleico o en anticuerpos deben manipularse y empaquetarse con muchísimo cuidado para minimizar la posible contaminación cruzada entre muestras o que el material se deteriore antes de poder realizar la prueba. Para prevenir la contaminación, deben utilizase recipientes nuevos (bolsas de plástico o frascos para muestras). Dentro de cada recipiente o contenedor para grupos de muestras debe introducirse una etiqueta impermeable con los datos correspondientes.

Algunos de los métodos adecuados para la conservación y transporte de muestras destinadas a pruebas moleculares o basadas en anticuerpos son los siguientes:

- Ejemplares vivos conservados en hielo o refrigerados: en el caso de los ejemplares que pueden transportarse rápidamente al laboratorio para ser analizados en un plazo de 24 horas, las muestras se introducen en bolsas de muestra envueltas de una cantidad suficiente de hielo húmedo en una caja isotérmica y se envían al laboratorio.
- Ejemplares enteros congelados: se escogen ejemplares vivos según el objetivo del muestreo, 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 temperaturas inferiores. Se prepara e introduce la etiqueta en el recipiente con las muestras, se introducen las muestras en una caja isotérmica con una cantidad suficiente de hielo seco, y se envían al laboratorio.
- Muestras conservadas en alcohol: en las zonas donde el almacenaje y el envío de muestras congeladas son problemáticos, puede utilizarse etanol al 90-95% para conservar, guardar y transportar ciertos tipos de muestras. Se preparan para el envío según los métodos descritos anteriormente.
- Tejidos fijados para hibridación *in-situ* e inmunohistoquímica: para este fin, serán adecuados los métodos clásicos de conservación de tejidos. Normalmente la formalina tamponada es una buena opción si posteriormente van a utilizarse sondas moleculares. Para respetar el ADN, la sobre-fijación (de más de 24-48 horas) en particular deberá evitarse.

2.5.2. Conservación del ARN y el ADN en los tejidos

Se corta el tejido realizando un corte de menos de 0,5 cm en una dimensión y se sumerge en 10 volúmenes de RNAlater (por ejemplo, una muestra de 0,5 g requiere unos 5 ml de RNAlater). Los

órganos pequeños, como los riñones, el hígado y el bazo pueden guardarse enteros en RNAlater. Estas muestras pueden guardarse a 4°C durante un mes, a 25°C durante 1 semana o indefinidamente a -20°C o temperaturas inferiores. Los tejidos de archivo tratados con RNAlater se guardan a -20°C o temperaturas inferiores.

2.5.3. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN, se trituran los tejidos en 10 volúmenes de tampón de extracción (NaCl [100 mM], ácido etilendiaminotetraacético [EDTA, 25 mM], a pH 8, y dodecil sulfato de sodio [SDS, 0,5%]) suplementado con proteinasa K (100 µg ml^{-1}). Tras una incubación durante toda la noche a 50°C, se extrae el ADN mediante un protocolo estándar de fenol/cloroformo, y se precipita con etanol. Para aislar el ADN de los tejidos conservados en RNAlater, simplemente se retira el tejido del RNAlater y se trata como si se acabara de tomar la muestra. La mayoría de tejidos se pueden homogeneizar directamente en tampón de lisis o de extracción.

Teniendo en cuenta las limitaciones de tiempo y los riesgos para el personal del laboratorio, los kits comerciales pueden constituir alternativas técnicas satisfactorias. La utilización de kits comerciales debe validarse comparándolos con un protocolo estándar de fenol/cloroformo antes de utilizarse sistemáticamente en laboratorios de diagnóstico.

2.5.4. Extracción de ARN

Para aislar ARN de tejidos conservados en RNAlater, simplemente se retira el tejido del RNAlater y se trata como si se acabara de tomar la muestra. La mayoría de tejidos se pueden homogeneizar directamente en tampón de lisis o de extracción.

Teniendo en cuenta las limitaciones de tiempo y los riesgos para el personal del laboratorio, los kits comerciales pueden constituir alternativas técnicas satisfactorias. La utilización de kits comerciales debe validarse comparándolos con un protocolo estándar de fenol/cloroformo antes de utilizarse sistemáticamente en laboratorios de diagnóstico.

2.5.5. Preparación de portas para la hibridación *in-situ*

Para la hibridación *in-situ* (ISH), deben fijarse los tejidos de peces en formalina tamponada durante unas 24 horas y a continuación incluirse en parafina según métodos histológicos estándar, como se describe en el apartado 3.3. Los cortes deben tener un grosor de 5 µm y se deben depositar sobre portas recubiertos de aminalquilsilano, que a continuación se hornean durante toda la noche en un horno a 40°C. Se retira la cera de los portas sumergiéndolos en xileno durante 10 minutos. Este paso se repite una vez y a continuación se elimina el disolvente sumergiéndolos en dos baños sucesivos de etanol absoluto de 10 minutos cada uno. A continuación, los cortes se rehidratan mediante inmersión en una serie de diluciones de etanol. El protocolo puede exigir un paso de permeabilización de membrana que permita el acceso al ADN diana. Para este fin, los cortes se tratan con proteinasa K (100 µg ml^{-1}) en tampón TE (Tris [50 mM], EDTA [10 mM]), a 37°C durante 30 minutos. Para las pruebas de ISH, es fundamental teñir un porta que se sepa que es positive y uno que se sepa que es negativo, para eliminar falsos positivos debidos a una tinción inespecífica/tinción en los bordes, y falsos negativos debidos a errores en el protocolo de tinción.

3. Otros tipos de información necesaria

El origen geográfico de las muestras debe definirse mediante el nombre del lugar de recogida junto con sus coordenadas geográficas o su localización en el curso de un río o en una masa de agua. También es indispensable conocer el nombre de la persona que ha recogido la muestra, la empresa, la fecha, el momento, el nombre de la masa de agua y una descripción del lugar. Además, se debe registrar la información que permita una trazabilidad de la muestra desde el lugar donde se recogió hasta el lugar donde se almacenará o el laboratorio donde se analizará, y también en el interior de dichas instalaciones. Las instalaciones donde se guarde deben registrar información sobre el método de conservación, el lugar donde está guardada y la fecha y hora de almacenaje en cada armario o nevera de almacenaje, además de información sobre la temperatura de almacenaje (la cual, preferiblemente, deberá registrarse sin interrupción). Esta información debe poder asociarse a un único código de muestra para todas las muestras. En el caso de los laboratorios, la fecha de recepción, la información sobre el lugar de almacenamiento, la fecha de análisis, los datos del análisis y la fecha del informe deben guardarse para todas las muestras identificadas con un solo código. Estos datos facilitarán mucho la trazabilidad de posibles problemas con la muestra y proporcionarán la garantía de que las muestras se manipularán adecuadamente.

BIBLIOGRAFÍA CLAVE PARA AMPLIAR LA LECTURA

AMEND D., YASUTAKE W. & MEAD R. (1969). A hematopoietic virus disease of rainbow trout and sockeye salmon.*Trans. Am. Fish. Soc.,***98**, 796–804.

ARNZEN J.M., RISTOW S.S., HESSON C.P. &LIENTZ J. (1991).Rapid fluorescent antibody test for infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) utilizing monoclonal antibodies to nucleoprotein and glycoprotein.*J. Aquat. Anim. Health*, **3**, 109–113.

AUBERTIN A.M. (1991). Family Iridoviridae.*In:* Classification and Nomenclature of Viruses, Francki R.J., Fauque C.M., Knudson D.L. & Brown F., eds. *Arch. Virol*. (Suppl. 2). Springer, New York, USA and Vienna, Austria, 132–136.

BOOTLAND L.M. & LEONG J.A. (1992).Staphylococcal coagglutination, a rapid method of identifying infectious hematopoietic necrosis virus.*Appl. Environ. Microbiol.,***58**, 6–13.

BOWSER P.R & PLUMB J.A. (1980). Fish cell lines: establishment of a line from ovaries of channel catfish. *In Vitro,***16**, 365–368.

DOBOS P. (1991). Family Birnaviridae.*In:* Classification and Nomenclature of Viruses, Francki R.J., Fauque C.M., Knudson D.L. & Brown F., eds. *Arch. Virol.* (Suppl. 2). Springer, New York, USA and Vienna, Austria, 200–202.

EAGLE H. (1959).Amino acid metabolism in mammalian cell cultures.*Science*, **130**, 432.

FIJAN N., PETRINEC Z., SULIMANOVIC D. &ZWILLENBERG L.O. (1971).Isolation of the causative agent from the acute form on infectious dropsy of carp.*Vet. Arch. Zagreb*, **41**, 125–138.

FIJAN N., SULIMANOVIC D., BEARZOTTI M., MUZINIC D., ZWILLENBERG L.O., CHILMONCZYK S., VAUTHEROT J.F. & DE KINKELIN P. (1983). Some properties of the *Epitheliomapapulosumcyprini*(EPC) cell line from carp *(Cyprinuscarpio). Ann. Virol. Institut Pasteur*, **134E**, 207–220.

HEDRICK R.P., MCDOWELL T.S., AHNE W., TORHY C. & DE KINKELIN P. (1992). Properties of three iridovirus-like agents associated with systemic infections of fish. *Dis. Aquat. Org.*, **13**, 203–209.

HILL B.J., WILLIAMS R.F., FINLAY J. (1981). Preparation of antisera against fish virus disease agents.*Dev. Biol. Stand.,* **49**, 209–218.

HSU Y.L., MARK ENGELKING H. & LEONG J. (1986).Occurrence of different types of infectious hematopoietic necrosis virus in fish.*Appl. Environ. Microbiol.*,**52**, 1353–1361.

HYATT A.D., EATON B.T., HENGSTBERGER S. &RUSSEL G. (1991). Epizootic hematopoietic necrosis virus: detection by ELISA, immuno-histochemistry and electron microscopy. *J. Fish Dis.*, **14**, 605–618.

JENSEN M.H. (1965).Research on the virus of Egtved disease*. Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **126**, 422–426.

LANGDON J.S., HUMPHREY J.D., WILLIAMS L.M., HYATT A.D., WESTBURY H.A. (1986). First virus isolation from Australian fish: an iridovirus-like pathogen from redfin perch, *Percafluviatilis* L. *J. Fish Dis.*, **9**, 263–268.

LANNAN C.N., WINTON J.R., FRYER J.L. (1984). New cell lines. Fish cells: Establishment and characterization of nine cell lines from salmonids. *In Vitro*, **20**, 671–676.

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., OLESEN N.J. &VESTERGAARD-JORGENSEN P.E. (1988).Production and characterization of monoclonal antibodies to four Egtved virus structural proteins.*Dis. Aquat. Org.*, **4**, 35–42.

MOURTON C., ROMESTAND., DE KINKELIN P., JEFFROY J.,LEGOUVELLO R. & PAU B. (1992). A highly sensitive immunoassay for the direct diagnosis of viral haemorrhagic septicaemia, using anti-nucleocpasid monoclonal antibodies.*J. Clin. Microbiol.*,**30**, 2338–2345.

MUNDAY B.L., KWANG J. & MOODY N. (2002) Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *J. Fish Dis*.,**25**, 127–142.

NAKANE P.K. &KAWAOI A. (1974).Peroxidase-labeled antibody, a new method of conjugation.*J. Histochem. Cytochem*.,**22**, 1084–1091.

OLESEN N.J., LORENZEN E. &LAPATRA S. (1999).Production of neutralizing antisera against viral haemorrhagic septicaemia (VHS) virus by intravenous infection of rabbits.*J. Aquat. Anim. Health*, **11**, 10–16.

OLESEN N.J. &VESTERGAARD-JORGENSEN P.E. (1992). Comparative susceptibility of three fish cell lines to Egtved virus, the virus of viral haemorrhagic septicaemia. *Dis. Aquat. Org.,***12**, 235–237.

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.

PAUL J. (1976). Media for culturing cells and tissues.*In:* Cell and Tissue Culture, Paul J., ed. Churchill Livingstone, Edinburgh and London, UK, and New York, USA, 91–123.

RISTOW S.S. &ARNZEN J.M. (1989).Development of monoclonal antibodies that recognize a type 2 specific and a common epitope on the nucleoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus*. J. Aquat. Anim. Health*, **1**, 119–125.

ROIZMAN B. (1991). Family Herpesviridae.*In:* Classification and Nomenclature of Viruses, Francki R.J., Fauque C.M., Knudson D.L. & Brown F., eds. *Arch. Virol.*(Suppl. 2). Springer, New York, USA and Vienna, Austria, 103–110.

STOKER M. &MCPHERSON I. (1961). Studies on transformation of hamster cells by polyoma virus *in vitro. Virology*, **14**, 359–370.

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.

WOLF K. (1988). Fish Viruses and Viral Diseases.Cornell University Press, Ithaca, New York, USA, 476 pp.

WOLF K. &QUIMBY M.C. (1962).Established eurythermic line of fish cell *in vitro. Science*, **135**, 1065–1066.

WOLF K. &QUIMBY M.C. (1973). Fish viruses: Buffers and methods for plaquing eight agents under normal atmosphere. *Appl. Microbiol.*, **25**, 659–664.

*
* *

CAPÍTULO 2.3.1.

NECROSIS HEMATOPOYÉTICA EPIZOÓTICA

1. Ámbito de aplicación

A efectos de este capítulo, la necrosis hematopoyética epizoótica se considerará la infección sistémica clínica o subclínica de peces con aletas causada por el virus de la necrosis hematopoyética epizoótica (VNHE).

2. Información sobre la enfermedad

2.1. Factores del agente

2.1.1. El agente patógeno, cepas del agente

El VNHE es un miembro del género *Ranavirus* de la familia Iridoviridae cuya especie tipo es el virus 3 de la rana (VF3) (Chinchar *et al.,* 2005). Otras especies son el virus de Bohle (IVB), el virus del bagre (VB), el virus del siluro europeo (VSE) y el ranavirus de Santee-Cooper. Debe tenerse cuidado al hablar del VB y del VSE como dos virus independientes, pues la literatura científica (Hyatt *et al.*, 2000) indica que son cepas de un mismo virus. En este género existen muchas otras especies probables. Se han aislado ranavirus de ranas sanas o enfermas, de salamandras y de reptiles en América, Europa y Australia (Chinchar*.,* 2002; Drury *et al.,* 2002; Fijan *et al.,* 1991; Hyatt *et al.*, 2002; Speare y Smith, 1992; Whittington *et al.*, 2010; Wolf *et al*., 1968; Zupanovic *et al*., 1998). Los ranavirus tienen viriones icosaédricos grandes (150-180 nm), un genoma con ADN bicatenario de 150-170 kb, y se replican tanto en el núcleo como en el citoplasma, con ensamblaje citoplásmico (Chinchar *et al.,* 2005). Estos virus poseen antígenos comunes que pueden detectarse mediante varias técnicas.

Desde el reconocimiento en 1986 de que esta enfermedad se debía en Australia al VNHE, se han descrito síndromes similares por iridovirus necrotizantes en peces de piscifactorías. Entre éstos se incluyen el bagre (*Ictalurus melas*) en Francia (VB) (Pozet *et al*., 1992), el siluro (*Silurus glanis*) en Alemania (VSE) (Ahne *et al.,* 1989; 1990), el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) en Dinamarca (Bloch y Larsen, 2009) y otros peces en Finlandia (Ariel *et al.,* 1999).

El VNHE y el VB son virus distintos, que se pueden diferenciar mediante análisis genómico (Ahne *et al.,* 1998; Holopainen *et al*., 2009; Hyatt *et al.*, 2000; Mao *et al*., 1996; 1997; Marsh *et al*., 2002). Esto permite la separación epidemiológica de casos de la enfermedad en peces con aletas de Australia (VNHE) y de Europa (VB) y la diferenciación de éstos de los ranavirus que afectan a ranas (VF3 e IVB). Sin embargo, muchas cepas de ranavirus no se han caracterizado hasta este nivel.

2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

El VNHE es muy resistente a la sequedad y en agua puede sobrevivir durante meses (Langdon, 1989). Puede persistir en tejidos congelados de peces durante más de dos 2 años (Langdon, 1989) y en peces muertos congelados por al menos un año (Whittington *et al.*, 1996). Por estas razones se supone que el VNHE puede perdurar durante meses o años en el agua y los sedimentos de una piscifactoría, así como en las plantas y el material asociado al equipo.

2.1.3. Estabilidad del agente (métodos eficaces de inactivación)

El VNHE es susceptible al etanol al 70%, al hipoclorito de sodio a una concentración de 200 mg/litro y al calentamiento a 60°C durante 15 minutos (Langdon, 1989). Los datos para la inactivación de un ranavirus de anfibio también pueden ser relevantes: 150 mg/litro de clorhexidina y 200 mg/litro de peroximonosulfato de potasio fueron eficaces tras 1 minuto de contacto (Bryan *et al*., 2009). Si antes se seca, el VNHE en sobrenadante de cultivo celular es resistente al calor (Whittington *et al.*, 2010).

2.1.4. Ciclo de vida

La vía de infección se desconoce, pero los peces son susceptibles experimentalmente tras una exposición mediante baño. El virus infecta varios tipos de células, como los hepatocitos, las células hematopoyéticas y las células endoteliales de muchos órganos (Reddacliff y Whittington, 1996). El virus de tejidos y animales muertos infectados se libera al agua a medida que se estos desintegran.

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Solo se conocen infecciones naturales por VNHE en dos especies de teleósteos, la perca (*Perca fluviatilis*) y la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Langdon, 1989; Langdon *et al.,* 1986; 1987; 1988), pero otras especies de peces con aletas son susceptibles a infecciones experimentales por el VNHE. Individuos de las siguientes especies han muerto tras su inoculación mediante baño: perca Macquarie (*Macquaria australasica*), perca plateada (*Bidyanus bidyanus*), gambusia (*Gambusia affinis*) y *Galaxias olidus*. Algunas especies, como el pez rojo *Carassius auratus*) y la carpa (*Cyprinus carpio*), son resistentes (Langdon, 1989). En estudios europeos se ha observado que el bagre negro (*Ameirus melas*) y el lucio (*Esox lucius*) son susceptibles al VNHE mediante exposición por baño (Bang Jensen *et al.,* 2009; Gobbo *et al.,* 2010).

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

Los estadios susceptibles de la vida del hospedador son todas las edades de la trucha arco iris y en la perca.

2.2.3. Especies o subpoblación predilectas (probabilidad de detección)

Los signos clínicos suelen ser más evidentes en los peces pequeños y en los juveniles que en los adultos tanto de la trucha arco iris como de la perca.

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

Los órganos Diana y los tejidos infectados por el virus son: el hígado, el bazo y otros tejidos parenquimatosos. No se sabe si el VNHE se puede detectar en tejidos gonadales, líquido ovárico o el líquido espermático, ni si estos tejidos son adecuados para la vigilancia de reproductores.

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

Trucha arco iris: En la trucha arco iris, la elevada mortalidad de los casos y la baja prevalencia de la infección por el VNHE en las infecciones naturales implica que la tasa de incorporación de portadores es probablemente muy baja (< 2%) (Whittington *et al.*, 1994). En un alevín de trucha arco iris clínicamente sano se detectó una infección persistente con un número muy pequeño de viriones infecciosos a los 63 días de una inoculación intraperitoneal (Whittington y Reddacliff, 1995), pero la significación de esta observación no está clara debido a la ruta artificial de inoculación. El VNHE se ha encontrado en peces de piscifactoría, pero como también presentaban lesiones histológicas compatibles con el VNHE, su presencia se considera como una infección activa más que debida a un estado de portador (Whittington *et al.*, 1999). El número de muestras de reproductores analizadas es demasiado escaso como para estar seguros de que los reproductores no están infectados (Whittington *et al.*, 1994). No se han detectado anticuerpos anti-VNHE en el suero de alevines 0+ durante ni después de un brote, pero sí se han detectado en una baja proporción de peces de piscifactoría 1+ a 2+ y, por tanto, no está claro si estos eran supervivientes del brote (Whittington *et al.*, 1994; 1999). Existen datos de poblaciones europeas de trucha arco iris sometidas a infecciones experimentales en que se han identificado posibles portadores (Ariel yBang Jensen, 2009).

Perca: Esta especie es muy susceptible al VNHE y parece improbable que constituya un reservorio como hospedador adecuado en Australia (Whittington y Reddacliff, 1995). Sin embargo, hay algunas evidencias contradictorias. El VNHE o un ranavirus relacionado se aisló en 2 de 40 percas adultas y aparentemente sanas durante una epizootia en peces juveniles en Victoria, Australia (Langdon *et al.,* 19870), pero como el período de incubación se extiende hasta 28 días (Whittington y Reddacliff, 1995), estos peces podrían haber estado en fase preclínica. En Victoria se han obtenido varias cepas de ranavirus en la perca en épocas en las que no había ninguna epizootia evidente, y algunos ejemplares aparentemente sanos tenían anticuerpos séricos contra el VNHE o un virus relacionado (Whittington y Hyatt, datos no publicados). Además, hay datos de poblaciones europeas de percas sometas de infecciones experimentales en que la virulencia del VNHE parecía ser inferior que en Australia (Ariel y Bang Jensen, 2009).

Bacalo Murray: esta especie puede ser un portador adecuado, puesto que se ha observado infección sin enfermedad tras una inoculación mediante baño (Langdon, 1989).

Trucha arco iris y salmón del Atlántico: estas especies podrían ser un portador adecuado, puesto que se ha observado infección sin enfermedad tras inoculación intraperitoneal o mediante baño (Langdon, 1989).

Lucio: esta especie puede ser un portador adecuado según las pocas pruebas realizadas con alevines (Bang Jensen *et al.,* 2009).

2.2.6. Vectores

Dado que el VNHE es un virus resistente, podría ser transferido en redes, barcos y demás equipo, o en peces utilizados como cebo por parte de quienes practican la pesca deportiva. Las aves son posibles vectores mecánicos del VNHE, ya que lo portan en el intestino, las plumas, el alimento y pico. Las aves piscívoras se alimentan de juveniles de perca afectados y el contenido gastrointestinal de estas aves puede contener VNHE (Whittington *et al.*, 1994). Sin embargo, es probable que el virus se inactive a las temperaturas corporales propias de las aves (40–44°C). No obstante, es posible la transmisión del VNHE por regurgitación de material ingerido en un plazo de pocas horas tras la ingesta (Whittington *et al.*, 1994).

2.2.7. Animales salvajes acuáticos portadores o sospechosos de serlo

Ninguno conocido.

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mecanismos de transmisión

Trucha arco iris: el VNHE se ha transmitido entre piscifactorías de trucha arco iris mediante transferencia de alevines infectados y probablemente mediante el agua de transporte (Langdon *et al.,* 1988; Whittington *et al.*, 1994; 1999). Se asume que los envíos de peces contienen una pequeña proporción de ejemplares con infección subclínica o clínica progresiva, más que de peces portadores. La baja prevalencia de la infección en la trucha arco iris indica que la infección activa puede pasar fácilmente desapercibida en una población y transmitirse por el comercio de peces. No se dispone de datos sobre la posible transmisión vertical del VNHE en la superficie o el interior de huevos, y no se han evaluado los protocolos de desinfección para huevos. Todavía no se ha aislado el VNHE de tejidos ováricos ni de reproductores. La reaparición anual en trucha arco iris de piscifactoría puede deberse a la reinfección de lotes sucesivos de peces o por percas salvajes presentes en el mismo embalse.

Perca: La aparición de VNHE en perca en sistemas de ríos y embalses muy apartados, y su avance río arriba indica que el VNHE se transmite por medios distintos del agua; los mecanismos consisten en la translocación de peces o cebo vivos por parte de quienes practican la pesca deportiva. Las migraciones de perca en Australia no están claras (consúltese también el Apartado 2.2.6 Vectores).

2.3.2. Prevalencia

Trucha arco iris: la enfermedad en general es difícil de identificar, tiene mortalidades muy bajas y el VNHE puede estar presente en una piscifactoría sin causar sospecha. Durante los brotes, el VNHE se ha detectado mediante aislamiento del virus en un 60-80% de los peces moribundos o muertos, pero en solo un 0-4% de los peces clínicamente sanos con los que ha contactado. Con límites de confianza del 99%, la prevalencia de la infección subclínica es del 0-8% (Whittington *et al.*, 1994; 1999). El virus podría no hallarse en absoluto en cohortes supervivientes tras un brote. Se detectaron anticuerpos anti VNHE en peces de piscifactoría a una baja prevalencia (0,7%, del 0,02% al 3,7% con límites de confianza del 95%).

Perca: la enfermedad se reconoce por una mortalidad epizoótica en peces de cualquier edad que afecta a una gran proporción de la población con declives drásticos de la población (Langdon *et al.,* 1986; 1987; Whittington *et al.*, 1996). Lo habitual es que en las zonas endémicas resulten afectados alevines y juveniles, pero en zonas recién afectadas también pueden resultar afectados los adultos. Cuando la enfermedad se detecta por primera vez en una zona, se observa un drástico declive de la población (Langdon *et al.,* 1986; 1987; Whittington *et al.*, 1996).

2.3.3. Distribución geográfica

Trucha arco iris: la infección por el VNHE se ha observado solo en piscifactorías situadas en los embalses de los ríos Murrumbidgee y Shoalhaven, en Nueva Gales del Sur, Australia (Whittington *et al*., 2010). Sin embargo, algunas piscifactorías de esta zona han permanecido libres de la enfermedad (Whittington *et al.*, 1999).

Perca: la EHN es endémica en el sureste de Australia, pero su distribución es discontinua (Whittington *et al*., 2010). La enfermedad se encuentra en muchos embalses pequeños y grandes de Victoria y desde 1986 se ha extendido progresivamente río arriba en el embalse del río Murrumbidgee a través de Nueva Gales del Sur y el territorio de la capital australiana. Se ha observado una diseminación similar en el Río Murray, del sur de Australia (Whittington *et al.*, 1996).

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

Trucha arco iris: Parece que, en condiciones naturales, el VNHE es poco infectivo pero causa una alta mortalidad. Puede haber VNHE en una piscifactoría sin causar sospecha porque la mortalidad puede no aumentar por encima del porcentaje habitual. Lo más habitual es observar VNHE en alevines de corta edad de menos de 125 mm de longitud de la horquilla con mortalidades diarias de menos del 0,2% y mortalidades totales de hasta el 4%. Sin embargo, truchas arco iris de cualquier edad pueden ser susceptibles, aunque todavía no se ha observado infección en reproductores (Whittington *et al.*, 1994; 1999). Existe un bajo impacto económico directo de la baja mortalidad. En conformidad con el patrón natural de la enfermedad, la trucha arco iris fue resistente a la exposición mediante baño en $10^{2,2}$ $DICT_{50}$ (dosis que causa una infección del 50% en cultivo de tejido) ml^{-1} (Whittington y Reddacliff, 1995), mientras que solo 1 de 7 resultó infectada tras una inoculación por baño durante 1 hora en 10^3 $DICT_{50}$ ml^{-1} (Langdon *et al.,* 1988). Podrían existir diferenciar de susceptibilidad entre poblaciones de truchas arco iris europeas y australianas (Ariel y Bang Jensen, 2009).

Perca: En los brotes naturales se produce un alto porcentaje de infección y de mortalidad que, con el tiempo, da lugar a una pérdida de poblaciones salvajes de peces (Langdon *et al.,* 1986; 1987; Whittington *et al.*, 1996). La inoculación mediante baño experimental con apenas 0,08 $DICT_{50}$ ml^{-1} resultó letal, y dosis demasiado bajas como para ser detectadas mediante aislamiento vírico en células BF-2 fueron letales por inoculación intraperitoneal (Whittington y Reddacliff, 1995). Podrían existir diferencias de susceptibilidad entre poblaciones de perca europeas y australianas (Ariel y Bang Jensen, 2009).

2.3.5. Factores ambientales

Trucha arco iris: Los brotes naturales parecen estar relacionados con unas malas prácticas de manejo, en concreto el hacinamiento, insuficiente flujo de agua y la contaminación de tanques con alimento. Los parámetros de la calidad del agua son subóptimos, y es frecuente observar enfermedades intercurrentes, como enfermedades cutáneas causadas por protozoos y hongos, e infecciones bacterianas sistémicas. Las lesiones cutáneas pueden facilitar una vía de entrada al VNHE. Se han observado brotes en piscifactorías a temperaturas del agua de entre 11 y 20°C (Whittington *et al.*, 1994; 1999). El periodo de incubación tras la inoculación por vía intraperitoneal fue de 3-10 días a 19-21°C en comparación con los 14-32 días a 8-10°C (Whittington y Reddacliff, 1995).

Perca: Las epizootias naturales del VNHE que afectan a juveniles y adultos de perca tienen lugar principalmente en verano (Langdon *et al.,* 1986; 1987; Whittington *et al.*, 1994). Se ha asumido que la enfermedad en juveniles está relacionada con la aparición anual de grandes cantidades de peces de corta edad no inmunes y su subsiguiente exposición al virus mientras mantienen un comportamiento gregario en aguas poco profundas; los adultos casi nunca resultan afectados en estos brotes. Es posible que la temperatura ambiental sea el factor que desencadena brotes, puesto que los juveniles se alimentan en aguas cálidas poco profundas de fauna del plancton, mientras que los adultos se alimentan de invertebrados bentónicos y de presas más grandes en aguas más frías y profundas (Whittington y Reddacliff, 1995). Experimentalmente, el periodo de incubación osciló entre los 10 y los 28 días a 12-18°C en comparación con los 10-11 días a 19-21°C, y las percas adultas fueron refractarias a la infección a temperaturas de menos de 12°C (Whittington y Reddacliff, 1995). Poblaciones europeas de perca también presentaron susceptibilidad dependiente de la temperatura (Ariel y Bang Jensen, 2009).

2.4. Control y prevención

2.4.1. Vacunación

Ninguna disponible.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

Ninguno disponible.

2.4.3. Inmunoestimulación

No se ha utilizado.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

No se ha utilizado.

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

No se ha utilizado.

2.4.6. Agentes bloqueantes

No se ha utilizado

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

No se ha utilizado

2.4.8. Prácticas generales de manejo

El control de la enfermedad en la trucha arco iris a nivel de la piscifactoría se basa en reducir el impacto de la infección manteniendo bajos porcentajes de repoblación y una suficiente calidad del agua. El mecanismo de protección puede ser el mantenimiento de un integumento sano.

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

Se ha validado un método sencillo de preparación de tejidos de peces para el cultivo celular y en enzimoinmunoanálisis (ELISA) (Whittington y Steiner, 1993).

Se bañan peces grandes durante 30 segundos en etanol al 70%; se bañan alevines durante 5 segundos en etanol al 70% y a continuación se lavan en agua estéril. Se diseccionan peces asépticamente en una cabina de bioseguridad de Clase II.

Peces grandes (>60 mm de longitud de la horquilla): se retira 0,1 g de hígado, riñón, bazo (± otros órganos en situaciones específicas) y se introducen en tubos estériles de 1,5 ml. Existen tubos adecuados para este fin con morteros para triturar los tejidos (véase abajo), pero también pueden servir tubos estándar de 1,5 ml. En ciertas situaciones pueden juntarse el hígado, el riñón y el bazo en un solo tubo (véase el apartado 3.3).

Peces medianos (30-60 mm de longitud de la horquilla): se raspan todas las vísceras y se depositan en el tubo.

Peces pequeños (<30 mm de longitud de la horquilla): se retira la cabeza y la cola, y se deposita el resto del pez en el tubo.

3.2. Conservación de muestras para su envío

Para el cultivo celular y ELISA, se congelan los tubos con los tejidos a -20°C a -80°C hasta que se utilicen.

Para el examen mediante microscopía óptica, se fijan tejidos en formalina neutra tamponada al 10%.

3.3. Combinación de varias muestras

No se ha determinado cuál es el efecto de combinar varios tejidos de distintos peces en la sensibilidad de las pruebas de diagnóstico. Sin embargo, es habitual combinar tejidos para el aislamiento del virus en lotes de 5 o 10 peces por prueba.

3.4. Órganos y tejidos de elección

Hígado, riñón anterior, bazo.

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

Los tejidos inadecuados son las gónadas, los líquidos gonadales, el líquido espermático y los huevos, puesto que no existen indicios de infección en el tracto reproductor y no se ha observado que los reproductores intervengan en el ciclo de la infección.

4. Métodos de diagnóstico

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

No existen signos clínicos específicos. Los peces son encontrados muertos. Puede haber signos clínicos de malas prácticas de manejo, como hacinamiento y una mala calidad del agua que se manifiesten en forma de lesiones en la piel, las aletas o las branquias (Reddacliff y Whittington, 1996).

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Los peces moribundos pueden presentar pérdida del equilibrio, opérculos brillantes y tal vez un color oscuro (Reddacliff y Whittington, 1996).

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

Es posible que no haya lesiones macroscópicas o que sean inespecíficas en la piel, las aletas y las branquias. Una pequeña parte de los peces puede presentar aumento de tamaño del riñón, el hígado o el bazo. Puede haber lesiones focales blancas a amarillas en el hígado que corresponderán a zonas de necrosis (Reddacliff y Whittington, 1996).

4.2.2. Bioquímica clínica

No es aplicable.

4.2.3. Anatomopatología microscópica

En cortes de material fijado en formalina y teñidos con hematoxilina y eosina (H/E) sistemática a menudo se observan necrosis agudas coagulantes o licuefactivas focales, multifocales o localmente extensas del hígado, riñón y bazo hematopoyético. Es posible observar un pequeño número de cuerpos de inclusión basófilos intracitoplasmáticos, en concreto en zonas inmediatamente circundantes a las zonas necróticas del hígado y el riñón. También puede haber lesiones necróticas en el corazón, el páncreas, el tracto gastrointestinal, las branquias y las pseudobranquias (Reddacliff y Whittington, 1996).

4.2.4. Preparaciones húmedas

No es aplicable.

4.2.5. Frotis

No se han utilizado.

4.2.6. Microscopía electrónica/citopatología

Los tejidos afectados (como el riñón, el hígado y el bazo) contienen células que presentan necrosis. Las células contienen inclusiones citoplasmáticas llamativas que son zonas enrarecidas del citoplasma en las que congregan los virus. Dentro del citoplasma, se observan agregados (disposiciones paracristalinas) de grandes (175 nm ± 6 nm) virus icosaédricos sin envoltura; también hay virus aislados. Virus completos (que contienen centros electrodensos) entran/salen de las células infectadas por la membrana citoplasmática. Los núcleos de células infectadas a menudo se localizan en la periferia y están distorsionados.

4.3. Métodos de detección e identificación del agente

4.3.1. Métodos directos de detección

4.3.1.1. Métodos microscópicos

Microscopía óptica: pueden utilizarse métodos sistemáticos para la fijación del tejido, por ejemplo en formalina neutra tamponada al 10%, inclusión en parafina, preparación de cortes de 10 µm y tinción con H/E para poner de manifiesto necrosis tisular y cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos. Estos cuerpos de inclusión son indicativos pero no confirmatorios de NHE. Los cortes incluidos en parafina y fijados con formalina también puede teñirse utilizando un método de inmunoperoxidasa (véase abajo) para identificar el VNHE asociado a las lesiones necróticas.

Microscopía electrónica: Pueden utilizarse métodos de corte ultrafino sistemáticos para la preparación de tejidos y cultivos celulares (Eaton *et al.,* 1991) con el fin de poner de manifiesto necrosis tisular, la presencia de virus y cuerpos de inclusión víricos. Pueden utilizarse tejidos y células fijados con otro fijador y otra pauta de inclusión para la detección del antígeno (Hyatt, 1991).

Microscopía electrónica de contraste negativo: pueden utilizarse sobrenadantes de tejidos homogeneizados (al 10% [p/v]). Los ranavirus tienen un aspecto distintivo. Su diámetro (150–180 nm) varía y tienen una envoltura derivada de la célula (membrana plasmática) limitante que envuelve una cápsida de simetría distorsionada. La cápsida subyacente es una membrana sintetizada *de novo* que por si misma envuelve un centro que contiene un ADN bicatenario (ds) y proteínas menores. Estas

preparaciones también pueden utilizarse para confirmar la antigenicidad del ranavirus (Eaton *et al.,* 1991).

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

Véase el apartado 4.3.1.1 sobre métodos microscópicos.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

Preparación de tejidos de peces para el aislamiento del virus y ELISA

Se ha validado un método sencillo de preparación de tejidos de peces para el cultivo celular y ELISA (Whittington y Steiner, 1993) (véase el apartado 3.1 sobre toma de muestras).

i) Se congelan los tubos con tejidos a –80°C hasta que se utilicen.

ii) Se añaden 0,5 ml de medio homogeneizado (medio mínimo esencial de Eagle [MEM], con sales de Earle con glutamina con 200 Unidades Internacionales [UI] ml^{-1} de penicilina, 200 µg ml^{-1} de estreptomicina y 4 µg ml^{-1} de amfotericina B) en cada tubo. Se tritura el tejido hasta conseguir una pasta fina con un émbolo adecuado estéril.

iii) Se añaden otros 0,5 ml de medio de homogeneización a cada tubo y se mezclan con el émbolo.

iv) Se añaden tres perlas de vidrio estéril a cada tubo (de 3 mm de diámetro) y se cierra la tapa del tupo.

v) Se somete la suspensión a vórtex enérgicamente durante 20-30 segundos y se deja a 4°C durante 2 horas.

vi) Se somete la suspensión a vórtex de nuevo como en el paso anterior y se centrifuga durante 10 minutos a 2.500 ***g*** en una centrífuga de sobremesa.

vii) Se transfiere el sobrenadante, ahora denominado homogenado de tejido clarificado, a un tubo limpio estéril. Los homogenados se pueden congelar a -80°C hasta que se utilicen para el aislamiento vírico y el ELISA.

Cultivo celular/Medios artificiales

El cultivo celular es la prueba de referencia, pero es cara y lenta. El VNHE crece bien en muchas líneas celulares de peces, como BF-2 (línea celular de alevín de mojarra de oreja azul; ATCC CCL 91), FHM (de carpita cabezona; ATCC CCL 42), EPC (epitelioma papuloso de la carpa [Cinkova *et al.,* 2010]), y CHSE-214 (línea celular de embrión del salmón real; ATCC CRL 1681) a temperaturas que oscilan entre los 15 y los 22 °C (Crane *et al.,* 2005). Las temperaturas de incubación de 20 o 24°C dan lugar a títulos más altos que las de 15°C; 22°C y células BF-2 EPC o CHSE-214 es lo que se recomienda para maximizar los títulos, lo cual podría ser importante para la detección de concentraciones bajas de virus en tejidos de peces (Ariel *et al.,* 2009). Las células BF-2 son las preferidas por parte del Laboratorio de Referencia de la OIE, para las cuales se ha recomendado durante muchos años una temperatura de incubación de 22°C tanto para antes como para después de la inoculación con virus. El procedimiento para las células BF-2 se indica más adelante. También se describe un procedimiento para las células CHSE-214 en el apartado sobre tinción con inmunoperoxidasa (apartado 4.3.1.2.2). La identidad de los virus del cultivo celular se determina mediante inmunotinción, ELISA, microscopía inmunoelectrónica, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otros métodos.

Muestras: homogenados de tejido.

Procedimiento técnico del cultivo celular: se cultivan células (en frascos, tubos o placas multipocillo) con medio de cultivo (MEM + 10% suero fetal bovino [FBS] con 100 IU ml^{-1} de penicilina, 100 µg ml^{-1} de estreptomicina y 2 µg ml^{-1} de amfotericina B). Las células se incuban hasta que casi confluyen a 22°C, lo cual puede llevar hasta 4 días, en función de la dosis de siembra. El medio se sustituye por un medio de mantenimiento (MEM con un 2% de FBS y 100 IU ml^{-1} de penicilina, 100 µg ml^{-1} de

estreptomicina y 2 µg ml^{-1} de amfotericina B) el día de la inoculación. Se prepara una dilución 1/10 utilizando medio de homogeneización a partir de homogenados combinados o por separado. Cada cultivo se inocula con 100 µl de muestra por ml de medio de cultivo. Esto representa una dilución final 1/100 de un homogenado de tejido de 0,1 mg ml^{-1}.Se prepara otra dilución 1/10 que representará una dilución final a 1/1000, y se inoculan dos cultivos. No se requiere paso de adsorción. Como alternativa, pueden inocularse dos a tres cultivos con 10 µl de homogenado no diluido por ml de medio de cultivo. Hay que tener en cuenta que la utilización de un inóculo no diluido grande a menudo a menudo conlleva con una alta probabilidad de toxicidad o contaminación celular. Los cultivos se incuban a 22°C en una incubadora durante 6 días. Los cultivos se leen el día 3 y el día 6. Los cultivos se comprueban al menos una vez para detectar muestras con niveles bajos de virus. El día 6, los cultivos primarios (P1) se congelan durante toda la noche a -20°C, se descongelan, se mezclan con cuidado y a continuación el sobrenadante se inocula en células frescas como antes (P2), es decir, 100 µl de sobrenadante de P1 por ml de medio de cultivo. Los sobrenadantes de P1 restantes se transfieren a tubos estériles de 5 ml y se dejan a 4°C para realizar el ELISA o la PCR u otras pruebas que permitan confirmar que la causa del efecto citopático (ECP) es el VNHE. P2 se incuba como anteriormente, y se lleva a cabo un tercer paso si es necesario.

Interpretación de los resultados

El ECP se desarrolla bien y consiste en una lisis focal envuelta por células granulosas redondeadas. Esta alteración se extiende rápidamente hasta afectar a toda la monocapa, que se desprende y se desintegra.

4.3.1.2.2. Métodos de detección de antígeno basados en anticuerpos

Hay que tener en cuenta que los anticuerpos policlonales utilizados en todos los métodos relacionados (inmunoperoxidasa, ELISA de captura de antígeno y microscopía inmunoelectrónica) presentan reacción cruzada con todos los ranavirus conocidos excepto los ranavirus Santee Cooper (Ahne *et al.,* 1998; Cinkova *et al.,* 2010; Hedrick *et al*., 1992; Hyatt *et al.*, 2000).

4.3.1.2.2.1. Detección del VNHE mediante tinción por inmunoperoxidasa de células del cultivo infectadas

Principio de la prueba: el VNHE se replica en el interior de células de cultivo. Al añadir un detergente suave se permeabilizan las células permitiendo que un anticuerpo de conejo purificado por afinidad se una a proteína víricas intracelulares. El VNHE se detecta mediante un anticuerpo anti-conejo biotinilado y un conjugado a base de estreptavidina-peroxidasa. Al añadir un sustrato se obtiene una coloración rojiza en las zonas marcadas con anticuerpos.

Muestras: homogenados de tejido.

Características de funcionamiento: Cuando se lleva a cabo como se ha descrito en este protocolo, la tinción es característica y específica. Sin embargo, la prueba no se ha validado respecto a la sensibilidad ni a la reproducibilidad.

Preparación de las células: el procedimiento descrito abajo es para células CHSE-214. También pueden utilizarse otras células recomendadas.

i) Se siembran placas de 24 pocillos con CHSE-214 el día antes de utilizarlas, con 250.000 células/pocillos (o 4 millones de células en 40 ml de medio de cultivo por placa) en 1,5 ml de medio de cultivo (medio MEM de Earle con aminoácidos no esenciales [EMEM], FBS al 10%, ácido N-2-hidroxiethil-piperazina-N-2-etanosulfónico [HEPES] 10 mM, glutamina 2 mM, 100 IU de penicilina y 100 µg de estreptomicina) y se incuban durante toda la noche en una atmósfera con un 5% de CO_2 a 22°C. (NOTA: los cultivos deben ser casi confluyentes y tener células sanas en división antes de ser utilizados).

ii) Se desecha el medio, se inocula cada pocillo con 150 µl de una suspensión de tejido triturado al 10% (por ejemplo, de hígado, riñón o bazo), se incuba durante 1 hora (22°C) y a continuación se añaden 1,5 ml de medio limpio de mantenimiento (como el de crecimiento excepto por el 2% de FBS) y se devuelve a la incubadora (22°C).

iii) Se observa si en los cultivos aparece ECP. Si no aparece ECP antes del día 10, se pasan los cultivos a células CHSE frescas recogiendo las células y el medio y añadiendo 150 µl a las células de la placa limpia; hay que tener en cuenta que las células no se congelan-descongelan. No es necesario desechar el medio existente, solo devolver la placa nueva a la incubadora (22°C). De nuevo, se observa a diario si aparece ECP.

iv) Se fijan células (se añaden 50 µl para cultivos de placas de 96 pocillos con 200 µl de medio de cultivo/pocillo o 400 µl (para cultivos de placas de 24 pocillos con 1,6 ml de medio de cultivo/pocillo) de una solución de formalina al 20% a cada pocillo), sin desechar el medio de cultivo cuando se observe ECP por primera vez. Tras la incubación (22°C) durante 1 hora a temperatura ambiente (RT), la mezcla medio/formalina se desecha y los pocillos se lavan dos veces con PBS-A (solución salina tamponada con fosfato, sin Ca^{++} ni Mg^{++}) para eliminar la formalina. Se añade más PBS-A si las placas no se guardan a 4°C.

Protocolo

i) Se diluye el anticuerpo anti-VNHE y el suero normal hasta la concentración de trabajo como se describe más adelante (protocolo de fijación para inmunocitoquímica) para el agente en cuestión en una solución de leche desnatada (SM) al 1% (PBS-A [SM]) hasta el volumen exigido para la prueba.

ii) Se retira la PBS-A de los pocillos (con cultivos celulares fijados) y se lavan los pocillos dos veces con PBS/Tween 20 (PBST) al 0,05% (v/v). Se añaden 50 µl de soluciones de anticuerpos primarios a cada pocillo de una placa de 96 pocillos o 200 µl a cada pocillo de una placa de 24 pocillos. Se incuban sobre un agitador de placa a 100-200 rpm a RT (22-24°C) durante 15-30 minutos o sin agitación a 37°C durante 1 hora.

iii) Se diluye suero anti-especie biotinilado (anticuerpo secundario) en una solución de SM al 0,1% como se ha descrito en el protocolo de fijación (más adelante) para el agente en cuestión hasta el volumen exigido para la prueba.

iv) Se retira la solución de anticuerpo primario y se lavan los pocillos tres veces con PBST. Se añade anticuerpo secundario a los pocillos. Se incuba sobre un agitador de placa a 100-200 rpm a RT durante 15-30 minutos o sin agitación a 37°C durante 1 hora.

v) Se diluye el conjugado estreptavidina-peroxidasa en una solución de SM al 0,1% para el agente en cuestión hasta el volumen exigido para la prueba.

vi) Se retira el anticuerpo secundario de los pocillos y se lavan los pocillos tres veces con PBST. Se añade conjugado a cada pocillo. Se incuba sobre un agitador de placa a 100-200 rpm a RT durante 15-30 minutos o sin agitación a 37°C durante 1 hora.

vii) Se prepara la solución madre del sustrato 3-amino-9-etilcarbazol (AEC): se disuelve un comprimido de AEC (20 mg) en 2,5 ml de dimetil formamida.

viii) Se retira el conjugado de los pocillos. Se lava (tres veces) con PBST.

ix) Se diluye el AEC disuelto en 47,5 ml de tampón acetato (4,1 ml de acetato de sodio anhidro en 1 litro de agua desionizada; el pH se ajusta a 5,0 con ácido acético glacial). Justo antes de utilizarlo, se añaden 25 µl de peroxide de hidrógeno al 30% a la solución de AEC y a continuación se añade a cada pocillo. Se incuba a RT durante 20 minutos.

x) Se retira la solución de sustrato y se lavan los pocillos dos veces con agua desionizada para detener la reacción.

xi) Para visualizar todas las células se tiñe con una tinción de contraste con hematoxilina de Mayer (50 µl/pocillo o 200 µl/pocillo) durante 1 minuto y se lavan con agua desionizada.

xii) Se añaden 50 µl de agua de grifo de Scott y se lava con agua desionizada y se seca al aire.

Interpretación de los resultados

Reacción positive: una tinción granular, focal y rojiza de las células indica la presencia de virus identificado por el anticuerpo de diagnóstico.

Reacción negativa: no aparece tinción roja - todas las células deben teñirse de color azul claro debido a la tinción de contraste.

Tinción de fondo: puede producirse una tinción no granular, no focal, más generalizada, clara y rosácea en todo el cultivo. Esta tinción de fondo puede estar causada por muchas razones, como una reacción de anticuerpos inespecífica con componentes no víricos, un lavado ineficaz o la caducidad de otros reactivos.

Reactivos para las pruebas de inmunocitoquímica

Solución salina de formaldehído al 20% (*PBS-A*)

Formalina (formaldehído al 36–38%)	54 ml
Agua destilada	36 ml
PBS-A 10×	10 ml

PBS-A 10×

Para preparar 1 litro de PBS-A 10× se utiliza:

NaCl	80.0 g
Na_2HPO_4	11,5 g
KCl	2,0 g
KH_2PO_4	2,0 g
Agua destilada	1,0 litros

NOTA: algunas sales se suministran con grupos extra de agua. Si se utilizan estos reactivos, se deben ajustar las masas para garantizar que se añade la masa adecuada de sal; por ejemplo, para $Na_2HPO_4.2H_2O$ se deben añadir 15 g en lugar de 11,5 g (156 mw/120 mw × 11,5 g = 14,95 g) para eliminar el efecto de las moléculas de agua.

4.3.1.2.2.2 Detección del VNHE mediante ELISA de captura de antígeno

La prueba ELISA de captura de antígeno ha sido validada para detectar VNHE en cultivos celulares y directamente en homogenados tisulares de peces. La sensibilidad analítica es 10^3–10^4 $DICT_{50}$/ml. La especificidad está próxima al 100% y la sensibilidad para la detección directa en tejidos de peces es del 60% respecto a la prueba de referencia de aislamiento de los virus en células BF-2 (Hyatt *et al.*, 1991; Whittington y Steiner, 1993 y datos no publicados). El ELISA se usa tanto para diagnóstico como para certificación. Las pruebas de neutralización no pueden emplearse para identificar el VNHE porque tras la inmunización de mamíferos o peces no se producen anticuerpos neutralizantes. Los anticuerpos monoclonales de ratón producidos contra el VNHE se dirigen contra epítopos de la proteína mayor de la cápsida (MCP) y son no neutralizantes (datos no publicados). Se han desarrollado anticuerpos de conejo anti-VNHE para uso en ELISA de captura de antígeno, tinción con inmunoperoxidasa y microscopía inmunoelectrónica (Hengstberger *et al.,* 1993; Hyatt *et al.*, 1991; Reddacliff y Whittington, 1996). Los reactivos y los protocolos están disponibles en el laboratorio de referencia.

Muestras: muestras de homogeneizados tisulares preparados según un protocolo validado (ver más adelante); cultivos celulares.

Principio de la prueba: las partículas de VNHE se capturan de la muestra mediante un anticuerpo de conejo purificado por afinidad que está unido a la placa. El VNHE se detecta con un segundo anticuerpo y un conjugado marcado con peroxidada empleando el cromógeno ABTS (ácido 2,2′-azino-di (3-etil-benzatiazolina)-6 sulfónico). La enzima se inactiva a los 20 minutos y los resultados de la densidad óptica (OD) se comparan con los estándares.

Características de funcionamiento: el protocolo se basa en procedimientos publicados (Hyatt *et al.*, 1991; Steiner *et al*., 1991; Whittington, 1992; Whittington y Steiner, 1993). Cuando se realiza como se describe en este protocolo, las características operativas de la prueba son las que se indican en la Tabla 4.1. Si se sigue el procedimiento de normalización recomendado, la precisión de la prueba tiene un CV (coeficiente de variación) <10% medido como variación en la OD de los controles entre placas a lo largo del tiempo.

Tabla 4.1. Características de funcionamiento del ELISA para el VNHE en comparación con el cultivo celular de células BF-2, la prueba de referencia

Muestra	Umbral de corte positivo-negativo**	Sensibilidad %	Especificidad %
Tejidos de pez*	OD 0,5	60	>99
Sobrenadantes de cultivos celulares con efecto citopático (células BF2)	OD 0,3	>99	>99

* solamente perca y trucha arco iris. Con la perca dorada aparece una OD de fondo más elevada. No hay datos para otras especies.

** estos cortes los determina el Laboratorio de Referencia de la OIE para el VNHE y variarán según el lote del antígeno control. Los valores indicados arriba corresponden al lote 86/8774-4-5-01.

Componentes de la prueba y preparación de reactivos

i) Se necesitan placas de microtitulación con fondo plano.

ii) La inmunoglobulina anti-VNHE de conejo purificada por afinidad y el antisuero anti-VNHE de oveja se suministran como reactivos en forma liofilizada. Se reconstituye con 1 ml de agua purificada y se deja el vial a temperatura ambiente durante 2 minutos. Se mezcla el contenido con suavidad. Estos reactivos son estables durante al menos 4 años cuando se mantienen a una temperatura de –20°C. Para uso sistemático en las pruebas de ELISA se recomienda que las soluciones madre de trabajo de ambos anticuerpos se preparen como una dilución 1/10 en TSGM (fórmula al final de este apartado). Son estables a –20°C durante al menos 5 años y no se solidifican a esta temperatura.

iii) El conjugado anti inmunoglobulina de oveja marcado con peroxidasa se suministra como un polvo liofilizado (reactivo comercial, KPL #14-23-06; 0,5 mg). Este reactivo ha mostrado una notable coherencia en cuanto a actividad entre lotes diferentes a lo largo de un período de 15 años. El producto debe reconstituirse con una solución estéril de glicerol al 50% en agua, repartirse en alícuotas de 150 µl y guardarse como solución no diluida a -20°C. Se prepara una solución de trabajo añadiendo 900 µl de TSGM a 100 µl de la solución no diluida. La solución de trabajo también se guarda a -20°C y es estable durante al menos 1 año. Los lotes nuevos de este conjugado deben titularse frente a un lote más antiguo utilizando protocolos estándar.

iv) El antígeno control del VNHE, inactivado por calor, se suministra como un polvo liofilizado. Se reconstituye en 1 ml de agua estéril y se guarda en pequeñas alícuotas a -20°C. En el mismo día en que se realizan las pruebas se preparan diluciones empleando PBSTG (PBS + Tween + gelatina). Las diluciones del antígeno control del VNHE (A, B, D y F) cubren el rango de la respuesta señal de la prueba y permiten realizar un procedimiento de normalización.

Equipo

Se recomienda un lavador automático de placas, aunque también pueden lavarse a mano. La prueba es sensible a las condiciones de lavado de la placa. Si la OD de los controles es inesperadamente baja, y el conjugado y otros reactivos no están caducados, el lavador de placas debe ajustarse de modo que la presión de lavado durante el llenado y aspiración de los pocillos se minimicen.

Se recomienda utilizan un lector automático de placas, aunque estas pueden leerse a simple vista.

Deben utilizarse pipetas calibradas de precisión (como las Gilson) para preparar las diluciones de todos los reactivos y para cargar reactivos en los pocillos de la placa de microtitulación.

i) Se recubre una placa de pocillos para ELISA (100 µl/pocillo) con el anti-VNHE de conejo purificado por afinidad diluido a 1/12.800 en tampón borato para recubrimiento. Se incuba durante toda la noche a 4°C.

ii) Se lava la placa cinco veces con tampón de lavado (agua purificada por Milli-Q (MQ) más Tween 20 al 0,05%). También puede utilizarse agua desionizada destilada en este y los demás pasos.

iii) Se prepara la solución bloqueadora: se calientan las soluciones en un horno microondas o en baño maría para disolver la gelatina, y después se enfrían a temperatura ambiente.

iv) Se bloquean los puntos de unión restantes mediante la solución bloqueadora (100 µl/pocillo) (gelatina al 1% [p/v] en PBSTG para dilución [PBS, Tween 20 al 0,05% [v/v], gelatina al 0,1% [p/v]). Se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos.

v) Se lava la placa cinco veces como antes.

vi) Se trabaja en una cabina de bioseguridad Clase II. Se diluye el antígeno control (véase abajo) en PBSTG y se añade a la esquina inferior derecha de la placa. Se añaden muestras de homogenado de tejido o de sobrenadante de cultivo y antígenos control a razón de 100 µl/pocillo. Todas las muestras y controles se añaden dos pocillos. Se incuba 90 minutos a temperatura ambiente.

Los antígenos control son diluciones de sobrenadante de cultivo celular de VNHE 86/8774 inactivado por calor. Lo esperable es que los controles den las siguientes OD, aunque habrá cierta variación entre laboratorios y, por tanto, se deberá permitir una variación del ±10%:

Control	Dilución en PBS*	OD (405 nm)*
A	1/5	>2,0
B	1/40	1,90
D	1/200	0,68
F	1/3000	0,16

*Estas diluciones y valores de DO están determinados por el Laboratorio de Referencia de la OIE para el VNHE y variarán en función del lote de antígeno control. Los valores indicados corresponden al lote 86/8774-4-5-01. El umbral positive-negativo para las muestras de homogenado de tejido clarificado de perca y de trucha arco iris en este ELISA es aproximado en función del valor de DO del control D de cada placa.

vii) Se lava la placa a mano para evitar contaminación del lavador de placas. Se trabaja en una cabina de Clase II. Se aspiran los pocillos mediante una pipeta multicanal. Se lava la placa dos veces.

viii) Se lava la placa cinco veces en el lavador de placas, como antes.

ix) Se añade el segundo anticuerpo anti VNHE de oveja diluido a 1/32.000 en PBSTG (100 µl/pocillo). Se incuba 90 minutos a temperatura ambiente.

x) Se lava la placa cinco veces en el lavador de placas.

xi) Se añade el conjugado diluido a 1/1.500 en PBSTG (100 µl/pocillo). Se incuba 90 minutos a temperatura ambiente.

xii) Se lava la placa cinco veces en el lavador de placas.

xiii) Se añade sustrato ABTS (22 ml de ABTS + 10 µl de H_2O_2) (100 µl/pocillo) y se sitúa la placa sobre un agitador de placas. Se controla el tiempo que dura este paso desde el momento en que se añade sustrato a los primeros pocillos de la placa 1. Se incuba 20 minutos.

xiv) Se añade de inmediato ABTS para detener la solución (50 µl/pocillo), se agita la placa brevemente y se lee la OD a 405 nm. Se calcula la media de la OD de ELISA de pocillos duplicados. Se calcula el coeficiente de variación de los duplicados: las muestras con un CV >15% debe volver a analizarse si la OD media cae muy cerca del umbral positivo-negativo.

Normalización de datos y control de calidad del límite de decisión

Si se desea normalizar los datos de placa a placa y a lo largo del tiempo, o realizar un control de calidad sobre el límite de la decisión, se puede seguir el siguiente procedimiento. Se usan los antígenos control en pruebas ELISA durante al menos cinco ocasiones en una período de 3 semanas (en total 20 placas de ELISA independientes). Se calcula la OD media para cada antígeno control. Luego, para cada placa que se utilice después, se calcula un factor de corrección de placa (PCF) del modo siguiente:

PCF = (OD media del control A/ OD real + OD media del control B/ OD real + OD media del control D/ OD real + OD media del control F/ OD real) /4. Se multiplica la OD media real de cada muestra por el PCF para esa placa y se reflejan estos valores en el informe.

Se permite que el PCF varíe entre 0,8 y 1,2, que corresponde a un coeficiente de variación de aproximadamente 10%. Los valores fuera de este margen sugieren que la placa tiene que analizarse de nuevo. La variación de PCF con el tiempo suministra un medio directo para realizar un seguimiento de la estabilidad de los reactivos, las variaciones del procedimiento y los errores del operario. Este método de control de calidad ha sido validado para el ELISA de captura de antígeno.

Tampones y otros reactivos

Tampón borato de recubrimiento

Ácido bórico	6,18 g
Tetraborato disódico ($Na_2B_4O_7.10H_2O$)	9,54 g
NaCl	4,38 g
Agua tratada con MQ, hasta	1 litro

Se esteriliza en autoclave

Solución salina tamponada con fosfato 10×

NaCl	80,00 g
KCl	2,00 g
Na_2HPO_4	11,50 g
KH_2PO_4	2,00 g
Agua tratada con MQ, hasta	900 ml

Se ajusta el pH a 7,2 con HCl o NaOH; se completa hasta 1 litro
Se esteriliza en autoclave

Para crear la solución de trabajo se diluye a 1/10 y se vuelve a comprobar el pH.
Para guardar en frascos las sales en polvo, se hace dos veces la cantidad arriba indicada; se guarda; para rehacer, se añaden 1,8 litros de agua MQ, se ajusta el pH y se completa hasta 2 litros.

ABTS

Tampón citrato fosfato	
Ácido cítrico	21,00 g
Na_2HPO_4	14,00 g

Agua tratada con MQ hasta 800 ml; ajustar pH a 4,2;
Se completa hasta 1 litro

ABTS	0,55 g
Tampón citrato fosfato, se completa hasta	1 litro

Se distribuye en alícuotas de 22-ml y se congela.
Inmediatamente antes de usar, se añaden 10 µl de H_2O_2 por cada alícuota de 22-ml.

Solución de ABTS de parada de la reacción (NaN_3 *al 0,01% en ácido cítrico 0,1 M)*

Ácido cítrico	10,5 g
Agua MQ, se completa hasta	500 ml

Se añaden 50 mg de azida sódica o 1 ml de una solución al 5%.

Conjugado KPL #14-23-06[1]

Crioprotector TSGM

Tris 10x/solución salina, pH 7,4	50 ml
Glicerol	250 ml
Agua purificada estéril hasta	500 ml

Se esteriliza en autoclave

Se añade mertiolato al 10%	1 ml

Se guarda en oscuridad a 4°C.

Tris 10x/solución salina (Tris 250 mM, NaCl 1,5 M)

Tris	15,14 g
NaCl	43,83 g
Agua purificada estéril	500 ml
Se ajusta el pH a	7,4

4.3.1.2.2.3. Microscopía inmunoelectrónica

Marcaje con oro de cortes que contengan tejidos o cultivos celulares

Principio de la prueba: pueden utilizarse cultivos celulares, tejidos y/o homogenados de tejidos para el examen mediante microscopía electrónica. La microscopía electrónica convencional (examen de cortes ultrafinos) generará datos sobre la estructura y la morfogénesis del virus. La microscopía electrónica de contraste negativo producirá imágenes que pueden utilizarse para examinar la estructura de partículas del virus. La utilización de anticuerpos específicos de ranavirus conjugados con oro en estas preparaciones permite examinar tanto la ultraestructura como la antigenicidad (Hyatt, 1991). Estos conjuntos de datos permiten clasificar el virus en el género Ranavirus.

1 Proveedor del reactivo: Bio-Mediq DPC Australia, P.O. Box 106, Doncaster, Victoria 3108, Australia; Tel.: (+61-3) 9840 2767; Fax: (+61-3) 9840 2767. Visite: www.kpl.com, donde encontrará enlaces a distribuidores de todo el mundo. Las referencias a productos comerciales específicos como ejemplos no implica que la OIE los apruebe. Esto es aplicable a todos los productos comerciales mencionados en este *Manual Acuático.*

Cultivos celulares y tejidos

i) Se fijan los tejidos o las células como se describe en Drury *et al.,* 2002. Brevemente, para fijar las células se usa glutaraldehído tamponado al 2,5% (v/v) (tampón cacodilato, o fosfato) durante 40 minutos. Después de la fijación primaria las células se lavan en el mismo tampón (3 × 20 minutos), se vuelven a fijar en tetróxido de osmio tamponado al 1% (p/v) durante 1 hora, se lavan (3 × 5 minutos) en agua doblemente destilada por ósmosis inversa, se deshidratan por pasos en escala ascendente de alcoholes (70-100%) y se infiltran e incluyen en una resina epoxídica (como Spurrs o epon). Para el marcaje con oro de los cortes de resina ultrafinos, se debe prestar atención a la fijación y la inclusión. Por ejemplo, las células deben fijarse en glutaraldehído al 0,25% (v/v) con 2–4% de paraformaldehído. No se emplea fijación secundaria y las células se infiltran e incluyen en una resina acrílica del tipo LR White.

ii) Tras la fijación y la inclusión, se realizan y transfieren cortes ultrafinos a rejillas niqueladas con una película de soporte.

iii) Se realizan cortes a partir de los bloques adecuados.

iv) Se bloquean en leche desnatada al 2% (p/v) en PBS-A (10 minutos).

v) Se bloquean los aldehídos libres con glicina 0,1 M en PBS-A (20 minutos).

vi) Se lavan con PBS-A (3x1 minutos). Este paso es opcional y se utiliza solo si hay un exceso de aldehídos libres (un alto de ruido de fondo puede ser indicativo de ello).

vii) Si no se está utilizando proteína A con oro, entonces se bloquea en el suero normal de la especie – este suero debe ser homólogo al que forma complejo con oro. La dilución recomendada es de aproximadamente 1/40 (10 minutos).

viii) Se incuba en anticuerpo primario. Si no se conocen los detalles de la incubación, se llevan a cabo reacciones iniciales con diluciones a 1/100 a 1/2700 (con diluciones a un tercio). Se diluyen los anticuerpos en gelatina de pescado de agua fría al 1% (v/v) en PBS-A, (60 minutos, temperatura ambiente).

ix) Se lava en gelatina de pescado de agua fría al 1% (v/v) en PBS-A (6x3 minutos).

x) Se incuba en anticuerpo secundario marcado con oro o proteína A con oro o proteína G con oro. La dilución sugerida es 1/40 en un PBS-A que contenga un 1% (p/v) de albúmina sérica bovina (BSA), un 0,1% (v/v) de Tween 20 y un 0,1% (v/V) de Triton X, 60 minutos a temperatura ambiente.

xi) Se lava en PBS-A (6 × 3 minutos, RT).

xii) Se vuelve a fijar en glutaraldehído al 2,5% (v/v) en PBS-A (5 minutos, RT).

xiii) Se lava en agua obtenida por ósmosis inversa (RO) (3 × 3 minutos, RT).

xiv) Se seca sobre papel de filtro (el tipo no es crucial).

xv) Se tiñe con acetato de uranilo y se acetato de plomo.

Interpretación de los resultados

Los virus del interior del citoplasma de células infectadas se marcarán específicamente con oro. Los virus se localizarán aisladamente, dentro de cuerpos de ensamblaje (cuerpos de inclusión) y en disposiciones paracristalinas.

Marcaje con oro de partículas víricas (virus adsorbidos a las rejillas)

i) Con un émbolo, se prepara un homogenado al 10% (p/v) de hígado, riñón o bazo y se clarifica (5 minutos, 2.500 ***g***).

ii) Se adsorbe el sobrenadante (del homogenado o de cultivos celulares) al sustrato de la rejilla.

iii) Se utilizan rejillas de oro de malla 200 recubiertas de carbono.

iv) Se fija la muestra con glutaraldehído al 0,1% (v/v) y Nonidet P40 (NP40) al 1% en PBS (2 minutos).

v) Se lava en PBS (3 × 3 minutos).

vi) Se bloquea con gelatina de pescado de agua fría al 5% (v/v) (Sigma) en PBS (10 minutos) y luego con tampón de incubación (PBS/ gelatina de pescado de agua fría al 0,1%).

vii) Se incuba con anticuerpo (anti-VNHE de conejo purificado por afinidad, Lote Nº M708; suministrado por el Laboratorio de Referencia de la OIE; dilución sugerida 1/500) durante 1 hora, a temperatura ambiente.

viii) Se lavan las rejillas (6 × 3 minutos) en tampón de incubación.

ix) Se incuban con 10 nm de proteína A con oro (consultar la recomendación de los proveedores relativa a la dilución) durante 1 hora, a temperatura ambiente.

x) Se lava (6 × 3 minutos).

xi) Se fija con glutaraldehído al 2,5% (5 minutos).

xii) Se lava con agua destilada (3x3 minutos) y se tiñe con ácido fosfotúngstico al 2% (pH 6,8) durante 1 minuto.

Interpretación de los resultados

La inclusión de NP40 permite que los anticuerpos y la proteína A-oro penetren por la membrana externa y reaccionen con la cápsida subyacente. El marcaje debe ser específico para el virus. Debe incluirse suero (1/500) de conejo inespecífico para VNHE purificado por afinidad como control negativo.

4.3.1.2.2.4. Inmunohistoquímica (tinción con inmunoperoxidasa)

Muestras: Cortes de tejido fijados con formalina e incluidos en parafina.

Procedimiento técnico

El siguiente protocolo pretende la demostración cualitativa de los antígenos del VNHE en cortes de tejidos fijados con formalina e incluidos en parafina (Reddacliff y Whittington, 1996). Se supone que el antígeno puede haber establecido uniones cruzadas y por tanto se incluye un paso de digestión por proteasa que puede omitirse si se examinan muestras que no han sido fijadas. Para la tinción se utiliza un kit comercial (DAKO® LSAB K0679) con estreptavidina marcada con peroxidasa y una mezcla de inmunoglobulinas biotiniladas anti-conejo/anti-ratón/anti-cabra como anticuerpos secundarios. También se utilizan otros reactivos comercializados. Para mayor comodidad, son suministrados igualmente por DAKO[2]. El anticuerpo primario anti-VNHE de conejo purificado por afinidad (Lote Nº M708) es suministrado liofilizado por el Laboratorio de Referencia de la OIE.

i) Se realizan cortes de 5 µm y se montan en portas SuperFrost® Plus G/Edge (Menzel-Glaser, HD Scientific Cat. No. HD 041300 72P3). Se realiza una marca alrededor del corte con un lápiz de diamante para reducir el esparcimiento de los reactivos.

ii) Se desparafina el corte del siguiente modo:

Se precalientan los portas en una estufa a 60°C durante 30 minutos.

Se colocan los portas en un baño de xileno y se incuban 5 minutos. Se repite una vez. Obsérvese los cambios de xileno no tienen efectos perjudiciales.

Se elimina el exceso de líquido y se colocan los portas en etanol absoluto 3 minutos. Se repite una vez.

Se elimina el exceso de líquido y se colocan los portas en etanol al 95% 3 minutos. Se repite una vez.

Se elimina el exceso de líquido y se colocan los portas en agua destilada o desionizada 30 segundos.

iii) Se exponen los antígenos utilizando un tratamiento con proteasa. Se cubren los portas con proteinasa K (5–7 µg ml^{-1}) y se incuban 20 minutos (solución lista para usar, DakoCytomation Cat. No. S3020). Se lava el porta sumergiéndolo tres veces en agua. Se coloca en un baño de PBST 5 minutos (PBS pH 7,2, Tween 20 al 0,05% [v/v]). Se elimina el exceso de solución de lavado y se seca cuidadosamente el alrededor del corte.

iv) Se ejecuta la reacción de inmunotinción mediante el kit Universal DAKO LSAB®+, Peroxidase (DakoCytomation Cat No. K0679). Tras asegurarse de que el corte de tejido está totalmente cubierto, se añaden los siguientes reactivos al porta. Debe evitarse que se seque.

2 Dako Cytomation California Inc., 6392 via Real, Carpinteria, CA 93013, USA, Tel.: (+1-805) 566 6655, Fax: (+1-805) 566 6688; Dako Cytomation Pty Ltd, Unit 4, 13 Lord Street, Botany, NSW 2019, Australia, Fax: (+61-2) 9316 4773; Visite www.dakocytomation.com para enlaces a otros países.

v) Peróxido de hidrógeno al 3%: se cubre el corte y se incuba 5 minutos. Se lava con cuidado con PBST y se coloca en un nuevo baño de lavado.

vi) Anticuerpo primario (anti-VNHE de conejo purificado por afinidad 1:/1500 Lote Nº M708) y reactivo control negativo (suero de conejo no immune a una dilución de 1/1500) sobre un segundo porta. Se cubre el corte y se incuba 15 minutos. Se lavan los portas.

vii) Puente: se cubre el corte y se incuba 15 minutos. Se lavan los portas.

viii) Estreptavidina peroxidada: se cubre el corte y se incuba 15 minutos. Se lavan los portas.

ix) Solución sustrato-cromógeno: se cubre el corte y se incuba 5 minutos. Se lavan los portas con cuidado con agua destilada.

x) Se aplica una tinción de contraste situando los portas en un baño de hematoxilina de Mayer de DAKO® durante 1 minuto (Modificación de Lillie, Cat. No. S3309). Se lava con cuidado con agua destilada. Se sumerge 10 veces en un baño de agua. Se coloca en agua destilada o desionizada 2 minutos.

xi) Se montan muestras con un cubreobjetos con un medio de montaje de base acuosa (DAKO® Faramount Aqueous Mounting Medium Cat. No. S3025) y se cubren con un cubreobjetos.

Interpretación de los resultados

El antígeno VNHE aparece en forma de tinción marrón en la zonas que envuelven partes degeneradas y necróticas de las áreas parenquimatosas. En la misma zona del corte no debe haber tinción con el suero de conejo que funciona como control negativo.

Disponibilidad de pruebas y reactivos: el Laboratorio de Referencia de la OIE es quien proporciona los anticuerpos que funcionan como reactivos y los protocolos de la prueba.

4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

Aunque se han descrito varias técnicas de PCR convencional o en tiempo real cuantitativa, ninguna se ha validado según las directrices de la OIE para la detección primaria del VNHE ni otros ranavirus en tejidos de peces. Sin embargo, se puede realizar la identificación de ranavirus a nivel de género y de especie mediante varias de las estrategias de PCR publicadas. En el primer método aquí descrito, se utilizan dos pruebas de PCR mediante cebadores MCP con análisis de restricción para detectar y diferenciar rápidamente el VNHE de los ranavirus de origen europeo (VB), norteamericano (VF3) y otros ranavirus australianos (IVB) (Marsh *et al*., 2002). Esto se puede llevar a cabo en menos de 24 horas a un coste relativamente bajo. En el segundo método aquí descrito, se utiliza una prueba de PCR MCP simple para generar un producto de 580 pb, que a continuación se secuencia para identificar el tipo de ranavirus. Como alternativa, puede utilizarse una PCR del gen de la ADN polimerasa y los genes de la proteína tipo H1 del triplete de neurofilamento (Holopainen *et al*., 2011) (este método no se describe en este capítulo).

Muestras: Virus de cultivo celular o análisis directo de homogenado de tejido.

4.3.1.2.3.1. PCR y análisis mediante endonucleasa de restricción (REA): procedimiento técnico

El producto amplificado en la reacción de PCR, MCP-1, se digiere con *Pfl*M I permitiendo diferenciar entre los iridovirus australianos (VNHE y IVB) y los no australianos (VF3 americano, y VB europeo). El producto amplificado por PCR en otra prueba, MCP-2, se digiere con *Hinc* II, *Acc* I y *Fnu*4H I (individualmente) posibilitando la diferenciación de VNHE y IVB (australianos) entre sí y del VF3 (americano) y el VB (europeo).

Preparación de reactivos

Los reactivos control de PCR, ADN purificado de VNHE, y ADN purificado de IVB, se suministran en forma liofilizada por el Laboratorio de Referencia. Se reconstituyen con 0,5 ml de tampón TE (Tris/HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) dejando reposar el vial a temperatura ambiente durante 2 minutos. Se mezcla el contenido muy suavemente. Para uso sistemático como control de PCR se recomienda que las soluciones de trabajo se preparen a una dilución 1/10 en tampón TE (pH 8,0). Se deben guardar a -20°C alícuotas de 125 µl. Cada alícuota es suficiente para al menos 50 reacciones (se añaden a la mezcla 5 µl) y tiene un periodo de validez de al menos 6 meses desde la fecha de la dilución.

Los cebadores M151 y M152 (MCP-1.321 pb), M153 y M154 (MCP-2, 625 pb) se suministran a la concentración de trabajo (100 ng μl^{-1}) y deben mantenerse a -20°C. Los cebadores también pueden obtenerse de proveedores comerciales. Las secuencias de los cebadores se indican en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Secuencias de los cebadores MCP-1 y MCP-2

Prueba PCR	Cebador	Secuencia	Tamaño del producto	Localización del gen
MCP-1	M151	AAC-CCG-GCT-TTC-GGG-CAG-CA	321 bp	266–586
	M152	CGG-GGC-GGG-GTT-GAT-GAG-AT		
MCP-2	M153	ATG-ACC-GTC-GCC-CTC-ATC-AC	625 bp	842–1466
	M154	CCA-TCG-AGC-CGT-TCA-TGA-TG		

Mezcla para PCR

En un volumen final de 50 µl (incluyendo los 5 µl de la muestra de ADN), las reacciones de amplificación contienen 2,5 µl (250 ng) de cada uno de los cebadores de trabajo, cada nucleótido dNTP, es decir, dATP, dTTP, dGTP y dCTP a una concentración 200 µM, 5 µl de tampón para PCR 10x (Tris/HCl 66,6 mM, $(NH_4)_2SO_4$ 16,6 mM, $MgCl_2$ 2,5 mM, 1,65 mg/ml de albúmina de suero bovino, beta-mercaptoetanol 10 mM) y 2 U de polimerasa Taq. En la Tabla 4.3 se indican instrucciones sobre la preparación del tampón PCR 10x.

Tabla 4.3. Preparación del tampón para PCR 10x

Ingredientes	Cantidad	Concentración final en 50 µl de mezcla para PCR
Tris	4,050 g	66,6 mM
Sulfato de amonio	1,100 g	16,6 mM
BSA (fracción V de albúmina de suero bovino libre de ácidos grasos)	0,825 g	1,65 mg ml^{-1}
Cloruro de magnesio	1,25 ml	2,5 mM
Tampón TE (estéril)	50 ml	

NOTA: también pueden utilizarse otros tampones comerciales

Se incluyen dos controles negativos, uno solo contiene mezcla para PCR y el segundo contiene 5 µl de tampón TE.

Las reacciones para MCP-1 y MCP-2 tienen el siguiente perfil: 1 ciclo de desnaturalización a 94°C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 50°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 1 minuto; una extensión final de 72°C durante 5 minutos y enfriado hasta 4°C.

NOTA: La temperatura de hibridación puede aumentarse a 60 o 62°C para reducir la amplificación inespecífica cuando la prueba se utiliza para analizar tejidos de peces.

Los resultados de la PCR se evalúan mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio. El ADN control para la PCR para VNHE (solución de trabajo a 1/10) debe dar un resultado similar en intensidad a la banda de 10^{-3} en ambos casos.

Análisis mediante endonucleasa de restricción (REA)

Los amplicones de la PCR se someten a REA con las enzimas descritas en la Tabla 4.4. Todas las endonucleasas se debe utilizar según las instrucciones de los fabricantes. Las reacciones de la REA se preparan añadiendo 1-4 µl del producto de la PCR, 2 U de la endonucleasa de restricción adecuada, 1,6 µl de tampón (suministrado con cada endonucleasa de restricción), 1,6 µl de BSA a

una concentración de 100 µg ml^{-1} (para Palm y Hinc II) y preparada hasta un volumen final de 16 µl con agua purificada estéril. Los digestos resultantes de la restricción se incuban 2 a 4 horas a las temperaturas recomendadas y se evalúan mediante electroforesis en geles de agarosa al 3%. En la Tabla 4.4. se muestran los tamaños de banda esperados tras la restricción.

Tabla 4.4. Análisis mediante endonucleasa de restricción de amplicones de MCP de ranavirus

Prueba PCR	Enzima de restricción	Tamaños de banda esperados tras la restricción (bp)	El patrón se aplica a
MCP-1 (321pb)	*Pfl*M I	321	VNHE, IVB
		131, 190	VF3, WV
MCP-2 (625pb)	*Hinc* II	100, 138, 387	VNHE
		100, 525	IVB, VF3
		100, 240, 285	WV
	Acc I	238, 387	VNHE
		625	IVB, VSE, VB, WV
		164, 461	VF3, GV
	*Fnu*4H I	33, 38, 44, 239, 271	VNHE
		3, 33, 38, 44, 108, 399	IVB
		3, 38, 44, 108, 432	VF3, GV
		3, 9, 38, 44, 108, 151, 272	VSE, VB
		3, 44, 71, 108, 399	WV

Se distribuyen en alícuotas de 500 µl y se guardan a –20°C. Para soluciones de trabajo, se añade 3,5 µl de beta-mercaptoetanol por cada 500 µl de tampón 10×. Todo el tampón sobrante después de preparar la mezcla para PCR debe desecharse.

La sensibilidad de la PCR para aplicaciones diagnósticas directas con tejidos de peces está siendo evaluada.

En el Laboratorio de Referencia de la OIE están disponibles protocolos detallados para facilitar la realización de la prueba, hojas de ejercicios y ADN control purificado del VNHE.

4.3.1.2.3.2. PCR alternativas y secuenciación para la identificación del virus

En esta prueba, para la amplificación de la secuencia diana de MCP (580 pares de bases [pb]) en el ADN del VNHE por PCR se emplean dos cebadores, un cebador inverso (5´-AAA-GAC-CCG-TTT-TGC-AGC-AGC-AAA-C-3´) y un cebador directo (5´-CGC-AGT-CAA-GGC-CTT-GAT-GT-3´). Este procedimiento de PCR puede emplearse para la detección específica de ranavirus de la perca, la trucha arco iris, el siluro, bagre, el gupi (*Poecilia reticulata*) el lábrido limpiador (*Labroides dimidatus*) y una amplia variedad de ranavirus de anfibios (Hyatt *et al.,* 2000). Se añade el ácido nucleico (1 µl) al tampón de la polimerasa Taq que contiene 0,1 µM de cada cebador, 2,5 U de polimerasa Taq (Promega) y $MgCl_2$ 2,5 mM. La mezcla se incuba en un termociclador automático programado para 35 ciclos a 95°C durante 60 segundos, a 55°C durante 60 segundos, y a 72°C durante 60 segundos, manteniéndose finalmente a 72°C durante 15 minutos. El ADN amplificado (580 pb) se analiza mediante electroforesis en gel de agarosa, se corta y se secuencia empleando distintas tecnologías estándar. Cada especie vírica se identifica por su secuencia única de ADN que está disponible en GenBank. Se pueden enviar muestras al Laboratorio de Referencia de la OIE para identificaciones específicas.

4.3.1.2.4. Purificación del agente

Se ha descrito la purificación del VNHE (Hyatt *et al.*, 1991; Steiner *et al*., 1991) y existe un protocolo disponible en el Laboratorio de Referencia.

4.3.2. Métodos serológicos

No se han detectado anticuerpos neutralizantes en peces ni mamíferos expuestos al VNHE. Se ha descrito un ELISA indirecto para la detección de anticuerpos inducidos tras por la exposición al VNHE en la trucha arco iris y la perca (Whittington *et al.*, 1994; 1999; Whittington y Reddacliff, 1995). La sensibilidad y la especificidad de estas pruebas respecto a una prueba de referencia no se conocen, y la interpretación de los resultados por el momento es difícil. En el Laboratorio de Referencia pueden obtenerse los protocolos y los reactivos anti-inmunoglobulina necesarios para llevar a cabo estas pruebas.

5. Clasificación de las pruebas según la finalidad de utilización

Los métodos actualmente disponibles para la vigilancia dirigida y el diagnóstico del VNHE 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; d= el método no se recomienda actualmente para este fin; y NA = no aplicable. 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 (véase el Capítulo 1.1.2. de este *Manual Acuático*), su naturaleza sistemática y el hecho de que se hayan usado generalmente sin resultados dudosos las hace aceptables.

Tabla 5.1. Métodos de vigilancia específica y diagnóstico

Método	Vigilancia dirigida				Diagnóstico preliminar	Diagnóstico confirmativo
	Huevos/esperma	Alevines	Juveniles	Adultos		
Signos macroscópicos	na	d	d	d	d	d
Histopatología	na	d	d	d	b	d
Tinción por inmunoperoxidasa	na	c	c	c	c	c
ME de transmisión	na	d	d	d	c	b
M inmunoelectrónica	na	d	d	d	c	b
Cultivo celular	na	a	a	a	a	b
ELISA de captura de antígeno	na	a	a	a	a	a
ELISA de captura de anticuerpo	na	d	d	c	c	d
PCR-REA	na	d	a	d	c	a
Secuenciación del producto de la PCR	na	d	d	d	c	a

ME = microscopía electrónica; ELISA = enzimoinmunoanálisis; PCR = reacción en cadena de la polimerasa; REA = análisis mediante endonucleasa de restricción; na = no aplicable.

6. Prueba(s) recomendadas(s) para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de necrosis hematopoyética epizoótica

Debe utilizarse un muestreo estadísticamente válido y deben recogerse los órganos/muestras adecuados.

Deben aplicarse pruebas con la sensibilidad y especificidad establecidas. Esto limita las pruebas de certificación al cultivo celular, que es la prueba de referencia, y el ELISA de captura de antígeno.

En truchas arco iris aparentemente sanas, la probabilidad de detectar una infección por VNHE es extremadamente baja, incluso cuando la enfermedad es activa en la misma población, debido a que la prevalencia de la infección es baja y hay una alta tasa de mortalidad. A efectos prácticos, el VNHE solo se puede detectar en peces que están clínicamente afectados o que han muerto por la infección. A partir de una muestra aleatoria de truchas arco iris vivas sería posible clasificar erróneamente una piscifactoría como libre de VNHE incluso durante un brote de la enfermedad porque la prevalencia de la infección es generalmente muy baja. Por tanto se recomienda el examen de las mortalidades "normales" (Whittington *et al.*, 1999).

Durante un brote de baja intensidad en la trucha arco iris, la prevalencia del VNHE entre las mortalidades puede ser del 60-80% y la contribución del VNHE a la mortalidad de "fondo" es suficiente para permitir la detección del virus en ausencia de enfermedad manifiesta en la población. Para la detección del VNHE y a efectos de la certificación, la población de interés es "la población de mortalidad" y se pueden calcular los números de muestras necesarias para detectar al menos un individuo infectado por el VNHE a un determinado nivel de confianza teniendo en cuenta el nivel de prevalencia de la infección y la sensibilidad de la prueba (Cannon y Roe, 1982; Simon y Schill, 1984). Durante un brote de VNHE el virus se detectó en al menos el 2% de los peces muertos (Whittington *et al.*, 1999). Por este motivo se asume una prevalencia del 2% para el muestreo del VNHE a efectos de certificación. La prueba ELISA de captura de antígeno, utilizada para determinar si los homogenados titulares están infectados por el VNHE, tiene una sensibilidad de por lo menos el 60% de la sensibilidad de la prueba del cultivo celular (Whittington y Steiner, 1993). El tamaño de muestra necesario en una población muy grande con mortalidades "normales" (Whittington *et al.*, 1999) para poder tener un 95% de confianza al detectar al menos un individuo infectado mediante una prueba con un 60% de sensibilidad es aproximadamente de 250. En la práctica, deben recogerse diariamente peces muertos en contextos de mortalidades "normales" y guardarse en grupos de 20 en bolsas de plástico a -20°C hasta que se hayan recogido los 250 ejemplares de muestra. Cuando sea posible, se deben escoger ejemplares jóvenes para facilitar las disecciones y el tratamiento de los tejidos. Los homogenados clarificados individuales que sean positivos según el ELISA de captura de antígeno deben someterse luego a la prueba del cultivo celular para confirmar la presencia del VNHE. Esta es una estrategia económica, ya que reduce mucho el número de cultivos celulares necesarios. Como alternativa, se pueden utilizar cultivos celulares y agrupar las muestras formando una a partir de cada cinco para reducir costes.

La serología también podría tener utilidad en las inspecciones para identificar poblaciones de truchas infectadas. Suponiendo un 1% de prevalencia de seropositividad en peces cultivados en una piscifactoría con infección endémica, se necesitaría una muestra de 300 peces para tener un 95% de seguridad en detectar al menos un individuo infectado (Cannon y Roe, 1982). Se precisa más investigación para confirmar la validez de esta propuesta.

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

Se sospecha de la enfermedad cuando se observan peces con aletas aparentemente sanos, moribundos o muertos cuyos tejidos parenquimatosos presentan signos histológicos de necrosis licuefactiva o coagulante focal multifocal o localmente extensa con o sin cuerpos de inclusión basófilos intracitoplasmáticos.

7.2. Definición de caso confirmado

Se confirma la enfermedad cuando se observan peces con aletas aparentemente sanos, moribundos o muertos cuyos tejidos parenquimatosos presentan signos histológicos de necrosis licuefactiva o coagulante focal multifocal o localmente extensa con o sin cuerpos de inclusión basófilos intracitoplasmáticos y/o en los cuales se ha puesto de manifiesto el VNHE mediante uno de los siguientes métodos:

1. ECP característico en cultivo celular y cultivo celular positive al VNHE en la prueba de la inmunoperoxidasa, el ELISA de captura de antígeno o la PCR,

   o

2. Tejidos positivos en el ELISA de captura de antígeno o la tinción por inmunoperoxidasa o la microsocopía inmunoelectrónica o la PCR

   Y tanto en el punto 1 como en el 2,

3. Demostración mediante PCR-REA o secuenciación del producto de la PCR que concuerde con el VNHE

8. Bibliografía

AHNE W., BEARZOTTI M., BREMONT M. &ESSBAUER S. (1998).Comparison of European systemic piscine and amphibian iridoviruses with epizootic haematopoietic necrosis virus and frog virus 3. *J. Vet. Med.* [*B*],**45**, 373–383.

AHNE W., OGAWA M. &SCHLOTFELDT H.J. (1990). Fish viruses: transmission and pathogenicity of an icosahedral cytoplasmic deoxyribovirus isolated from sheatfish*Silurusglanis*. *J. Vet. Med*. [*B*], **37**, 187–190.

AHNE W., SCHLOTFELDTH.J. & THOMSENI. (1989). Fish viruses: isolation of an icosahedral cytoplasmic deoxyribovirus from sheatfish(*Silurusglanis*).*J. Vet. Med.* [*B*],**36**, 333–336.

ARIEL E.& BANG JENSEN B. (2009). Challenge studies of European stocks of redfin perch, *Perca fluviatilis* L., and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with epizootic haematopoietic necrosis virus. *J. Fish Dis.,***32**, 1017–1025.

ARIEL E., NICOLAJSEN N., CHRISTOPHERSEN M.-B., HOLOPAINEN R., TAPIOVAARA H.& BANG JENSEN B. (2009). Propagation and isolation of ranaviruses in cell culture. *Aquaculture,***294**, 159–164.

ARIEL E., TAPIOVAARA H. & OLESEN N.J. (1999).Comparison of Pike-perch (*Stizostedionlucioperca*), Cod (*Gadusmorhua*) and turbot (*Scophthalmusmaximus*) iridovirus isolates with reference to other piscine and amphibian iridovirus isolates. European Association of Fish Pathologists, VIII.International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, Rhodes, Greece, 20–24 September.

BANG JENSEN B., ERSBOLL A.K.& ARIEL E. (2009). Susceptibility of pike *Esox lucius* to a panel of ranavirus isolates. *Dis. Aquat. Org*., **83**, 169–179.

BLOCH B. & LARSEN J.L. (1993). An iridovirus-like agent associated with systemic infection in cultured turbot *Scophthalmusmaximus* fry in Denmark. *Dis. Aquat. Org*., **15**, 235–240.

BRYANL.K., BALDWINC.A., GRAYM.J.& MILLERD.L. (2009). Efficacy of select disinfectants at inactivating Ranavirus. *Dis. Aquat. Org.,***84**, 89–94.

CANNON R.M. & ROE R.T. (1982). Livestock Disease Surveys: A Field Manual for Veterinarians. Australian Government Publishing Service, Canberra.

CHINCHAR G., ESSBAUER S., HE J.G., HYATT A., MIYAZAKI T., SELIGY V. & WILLIAMS T. (2005).Family Iridoviridae.*In:* Virus Taxonomy. Classification and Nomeclature of Viruses. Eight Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses, Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U. & Ball L.A., eds. Academic Press, San Diego, California, USA, 145–161.

CHINCHAR V.G. (2002). Ranaviruses (family Iridoviridae): emerging cold-blooded killers – brief review. *Arch. Virol.*, **147**, 447–470.

CINKOVAK., RESCHOVA S., KULICH P.& VESELY T. (2010). Evaluation of a polyclonal antibody for the detection and identification of ranaviruses from freshwater fish and amphibians. *Dis. Aquat. Org.,***89**, 191–198.

CRANE M.S.J., YOUNG J. & WILLIAMS L. (2005). Epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV): growth in fish cell lines at different temperatures. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol*.,**25**, 228–231.

DRURYS.E.N., GOUGHR.E.& CALVERTI. (2002). Detection and isolation of an iridovirus from chameleons (*Chamaeleo quadricornis* and *Chamaeleo hoehnelli*) in the United Kingdom. *Vet. Rec.,***150**, 451–452.

EATON B.T., HYATT A.D. &HENGSTBERGER S. (1991). Epizootic haematopoietic necrosis virus: purification and classification. *J. Fish Dis.,***14**, 157–169.

FIJAN N., MATASIN Z., PETRINEC Z., VALPOTICI.&ZWILLENBERG L.O. (1991).Isolation of an iridovirus-like agent from the green frog (*Ranaesculenta*L.).*VeterinarskiArhiv,***61**, 151–158.

GOBBO F., CAPPELLOZZA E., PASTORE M.R.& BOVO G. (2010). Susceptibility of black bullhead *Ameiurus melas* to a panel of ranavirus isolates. *Dis. Aquat. Org.,* **90**, 167–174.

HEDRICK R.P., MCDOWELL T.S., AHNE W., TORHY C.&DE KINKELIN P. (1992). Properties of three iridovirus-like agents associated with systemic infections of fish. *Dis. Aquat. Org.,* **13**, 203–209.

HENGSTBERGER S.G., HYATT A.D., SPEARE R. &COUPAR B.E.H.(1993). Comparison of epizootic haematopoietic necrosis and Bohleiridoviruses, recently isolated Australian iridoviruses. *Dis. Aquat. Org.*, **15**, 93–107.

HOLOPAINEN R., HONKANEN J., JENSEN B.B., ARIEL E.& TAPIOVAARA H. (2011). Quantitation of ranaviruses in cell culture and tissue samples. *J. Virol. Methods,***171**, 225–233.

HOLOPAINEN R., OHLEMEYER S., SCHÜTZE H., BERGMANNS.M.& TAPIOVAARA H. (2009). Ranavirus phylogeny and differentiation based on major capsid protein, DNA polymerase and neurofilament triplet H1-like protein genes. *Dis. Aquat. Org.,***85**, 81–91.

HYATT A.D. (1991).Immunogold labelling techniques, *In:* Electron Microscopy in Biology: a Practical Approach, Harris R., ed. IRL Press, Oxford, UK, 59–81.

HYATT A.D., EATON B.T., HENGSTBERGER S. &RUSSEL G. (1991). Epizootic hematopoietic necrosis virus: detection by ELISA, immuno-histochemistry and electron microscopy. *J. Fish Dis.*, **14**, 605–617.

HYATT A.D., GOULD A.R., ZUPANOVIC Z., CUNNINGHAM A.A., HENGSTBERGER S., WHITTINGTON R.J., KATTENBELT J. &COUPARB.E.H. (2000). Comparative studies of piscine and amphibian iridoviruses.*Arch. Virol.,* **145**, 301–331.

HYATT A.D., WILLIAMSON M., COUPAR B.E.H., MIDDLETON D., HENGSTBERGER S.G., GOULD A.R., SELLECK P., WISE T.G., KATTENBELT J., CUNNINGHAM A.A.& LEE J.(2002). First identification of a ranavirus from green pythons (*Chondropythonviridis*). *J. Wildl. Dis.,***38**, 239–252.

LANGDON J.S. (1989). Experimental transmission and pathogenicity of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) in redfin perch, *Percafluviatilis* L., and 11 other teleosts. *J. Fish Dis.*, **12**, 295–310.

LANGDON J.S. & HUMPHREY J.D. (1987).Epizootic Hematopoietic Necrosis a New Viral Disease in Redfin Perch *Percafluviatilis*L. in Australia.*J. Fish Dis.*, **10**, 289–298.

LANGDON J.S., HUMPHREY J.D. & WILLIAMS L.M. (1988).Outbreaks of an EHNV-like iridovirus in cultured rainbow trout, *Salmogairdneri*Richardson, in Australia.*J. Fish Dis.*, **11**, 93–96.

LANGDON J.S., HUMPHREY J.D., WILLIAMS L.M., HYATT A.D. & WESTBURY H.A. (1986). First virus isolation from Australian fish: an iridovirus-like pathogen from redfin perch, *Percafluviatilis* L. *J. Fish Dis.*, **9**, 263–268.

MAO J., THAM T.N., GENTRY G.A., AUBERTIN A. &CHINCHAR V.G.(1996). Cloning, sequence analysis, and expression of the major capsid protein of the iridovirus frog virus 3. *Virology*, **216**, 431–436.

MAO J.H., HEDRICK R.P. &CHINCHAR V.G. (1997). Molecular characterisation, sequence analysis and taxonomic position of newly isolated fish iridoviruses. *Virology*, **229**, 212–220.

MARSH I.B., WHITTINGTON R.J., O'ROURKE B., HYATT A.D. & CHISHOLM O. (2002).Rapid differentiation of Australian, European and American ranaviruses based on variation in major capsid protein gene sequence.*Molec.Cell. Probes*, **16**, 137–151.

POZET F., MORAND M., MOUSSA A., TORHY C. & DE KINKELIN P. (1992). Isolation and preliminary characterization of a pathogenic icosahedral deoxyribovirus from the catfish (*Ictalurusmelas*).*Dis. Aquat. Org.,***14**, 35–42.

REDDACLIFF L.A. & WHITTINGTON R.J. (1996). Pathology of epizootic haematopoeitic necrosis virus (EHNV) infection in rainbow trout (*Oncorhynchusmykiss*Walbaum)and redfin perch (*Percafluviatilis* L.).*J. Comp. Pathol.,***115**, 103–115.

SIMON R.C. &SCHILL W.B. (1984). Tables of sample size requirements for detection of fish infected by pathogens: three confidence levels for different infection prevalence and various population sizes. *J. Fish Dis*., **7**, 515–520.

SPEARE R. & SMITH J.R.(1992). An iridovirus-like agent isolated from the ornate burrowing frog *Limnodynastesornatus* in northern Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **14**, 51–57.

STEINER K.A., WHITTINGTON R.J., PETERSEN R.K., HORNITZKY C. & GARNETT H. (1991).Purification of epizootic haematopoietic necrosis virus and its detection using ELISA.*J. Virol. Methods,***33**, 199–210.

WHITTINGTON R.J. (1992).Evaluation of a simple method for improving the precision of an ELISA detecting antibody in serum.*J. Immunol. Methods*, **148**, 57–64.

WHITTINGTONR.J., BECKERJ.A.& DENNIS M.M. (2010). Iridovirus infections in finfish – critical review with emphasis on ranaviruses. *J. Fish Dis.,***33**, 95–122.

WHITTINGTON R.J., KEARNS C., HYATT A.D., HENGSTBERGER S. &RUTZOU T. (1996). Spread of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) in redfin perch (*Percafluviatilis*) in southern Australia. *Aust. Vet. J.*, **73**, 112–114.

WHITTINGTON R.J., PHILBEY A., REDDACLIFF G.L. &MACGOWN A.R. (1994). Epidemiology of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) infection in farmed rainbow trout, *Oncorhynchusmykiss* (Walbaum): findings based on virus isolation, antigen capture ELISA and serology. *J. Fish Dis.*, **17**, 205–218.

WHITTINGTON R.J. &REDDACLIFF G.L. (1995). Influence of environmental temperature on experimental infection of redfin perch (*Percafluviatilis*) and rainbow trout (*Oncorhynchusmykiss*) with epizootic haematopoietic necrosis virus, an Australian iridovirus. *Aust. Vet. J.,***72**, 421–424.

WHITTINGTON R.J., REDDACLIFF L.A., MARSHI., KEARNS C., ZUPANOVIC Z. &CALLINAN R.B. (1999).Further observations on the epidemiology and spread of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) in farmed rainbow trout *Oncorhynchusmykiss* in southeasternAustralia and a recommended sampling strategy for surveillance.*Dis. Aquat. Org.,* **35**, 125–130.

WHITTINGTONR. J.& STEINERK. A. (1993). Epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV): improved ELISA for detection in fish tissues and cell cultures and an efficient method for release of antigen from tissues. *J. Virol. Methods,***43**, 205–220.

WOLF K., BULLOCK G.L., DUNBAR C.E. &QUIMBY M.C. (1968). Tadpole edema virus: a viscerotrophic pathogen for anuran amphibians. *J. Infect. Dis.,***118**, 253–262.

ZUPANOVIC Z., MUSSO C., LOPEZ G., LOURIERO C.L., HYATT A.D., HENGSTBERGER S. & ROBINSON A.J.(1998).Isolation and characterisation of iridoviruses from the giant toad *Bufomarinus* in Venezuela.*Dis. Aquat. Org.,***33**, 1–9.

*

**

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la Necrosis hematopoyética epizoótica (puede consultarse en la Tabla del final de este *Manual Acuático* o en la página web de la OIE: www.oie.int). El Laboratorio de Referencia de la OIE puede suministrar ADN purificado del VNHE, antígeno de VNHE inactivado por calor y anticuerpos policlonales contra el VNHE junto con los métodos técnicos. Se cobra una tarifa por los reactivos para cubrir los costes de funcionamiento del laboratorio.

CAPÍTULO 2.3.2.

INFECCIÓN POR *APHANOMYCES INVADANS* SÍNDROME ULCERANTE EPIZOÓTICO

1. Ámbito de aplicación

A los efectos de este capítulo, la infección por *Aphanomyces invadans* engloba todas las infecciones causadas por el hongo oomiceto *A. invadans* (sinónimo de *A. piscicida*).

2. Información sobre la enfermedad

2.1. Factores del agente

2.1.1. El agente patógeno, cepas del agente

La infección por *A. invadans* es un trastorno epizoótico estacional de gran importancia en peces de agua dulce y de estuarios tanto salvajes como de piscifactorías. Tiene una compleja etiología infecciosa y clínicamente se caracteriza por la presencia de una infección invasiva por *A. invadans* y lesiones ulcerantes necrotizantes, que suelen conllevar una respuesta granulomatosa. La infección por *A. invadans* se conoce más como síndrome ulcerante epizoótico (SUE). El SUE también se denomina enfermedad de las manchas rojas (EMR), granulomatosis micótica (GM) y micosis ulcerante (MU). En 2005, unos científicos propusieron que la enfermedad se denominara afanomicosis granulomatosa epizoótica (Baldock *et al.*, 2005); no obstante, la mayoría de científicos sigue utilizando el término SUE. La enfermedad está causada por el hongo oomiceto *A. invadans.* La infección por *Aphanomyces invadans* se ha propagado mucho desde el primer brote, que tuvo lugar en 1971 en Japón, y hasta ahora solo se ha documentado un genotipo. También se han asociado parásitos y rabdovirus a brotes concretos, y las lesiones causadas por *A. invadans* siempre presentan infección secundaria por bacterias gramnegativas.

El género *Aphanomyces* forma parte de un grupo de organismos comúnmente conocidos como hongos acuáticos. Aunque durante mucho tiempo se ha visto como un hongo debido a su característico crecimiento filamentoso, este grupo, el de los Oomicetida, no forma parte de los Eumycota, sino que se clasifican con las diatomeas y las algas marrones en un grupo denominado Stramenopiles o Chromista.

2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

Todavía no está claro cómo *A. invadans* sobrevive fuera del hospedador. Si la zoospora móvil no puede hallar sustratos adecuados, se enquista. No existe ningún método adecuado para recuperar ni aislar la zoospora enquistada de estanques de peces afectados. Todavía no se sabe cuánto tiempo puede sobrevivir la espora enquistada en agua o en un sustrato distinto de los peces. En una prueba *in-vitro,* la zoospora enquistada sobrevivió al menos 19 días (Lilley *et al.*, 2001).

2.1.3. Estabilidad del agente patógeno (métodos eficaces de inactivación)

Aphanomyces invadans crece mejor a 20-30°C; no crece *in-vitro* a 37°C. Una salinidad del agua superior a las 2 partes por mil (ppmil) puede detener la transmisión del agente. La preparación de estanques de peces mediante el secado al sol y la aplicación de cal constituyen métodos eficaces de desinfección frente a *A. invadans*. Como ocurre con otros oomicetos u hongos acuáticos, las sustancias químicas habitualmente utilizadas para la desinfección destruyen eficazmente todo *A. invadans* que pudiera contaminar piscifactorías, estanques o equipo de pesca.

2.1.4. Ciclo de vida

Aphanomyces invadans (Saprolegniales, Oomicetos) tiene una estructura miceliar de tipo hongo no septado. Este oomiceto tiene dos formas de zoospora típicas. La zoospora primaria consiste en células redondas que se desarrollan dentro del esporangio. La zoospora primaria se libera a la punta del esporangio, donde forma una agrupación de esporas. Rápidamente se transforma en la zoospora secundaria, que es reniforme con células biflageladas lateralmente y puede nadar libremente en el agua. La zoospora secundaria permanece móvil durante un periodo que depende de las condiciones

ambientales y la presencia del pez hospedador o sustrato. Lo habitual es que la zoospora se enquiste y germine produciendo nuevas hifas, aunque los quistes pueden liberar generaciones terciarias de zoosporas (poliplanetismo) (Lilley *et al.*, 1998).

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Aphanomyces invadans causa enfermedad y mortalidad en peces salvajes y de piscifactoría de todo el mundo. En unas 94 especies de peces se ha confirmado mediante diagnóstico histológico que están afectadas de forma natural por *A. invadans*, como se muestra en la Tabla 2.1. Los casos sospechosos de infección natural por *A. invadans* en especies distintas de las de la lista deben notificarse de inmediato al Laboratorio de Referencia pertinente de la OIE, tanto si los signos clínicos se asocian a los hallazgos como si no. Algunos peces, como la carpa común (*Cyprinus carpio*), la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) y el sabalote (*Chanos chanos*), se han considerado resistentes naturales a la infección por *A. invadans* (Lilley *et al.*, 1998).

Tabla 2.1. *Especies de peces susceptibles a la infección por A. invadans*

Nombre científico	Nombre común	Nombre científico	Nombre común
Acanthopagrus australis	-	*Macquariaambigua*	perca dorada
Acanthopagrus berda	chopa	*Macquarianovemaculeata*	-
Alosa sapidissima	sábalo americano	*Marcusenius macrolepidotus*	-
Ambassis agassiz	-	*Melanotaenia splendida*	-
Ameiurus melas	bagre negro	*Micralestes acutidens*	-
Ameiurus nebulosus	bagre pardo	*Micropterus salmoides*	perca atruchada/perca americana
Amniataba percoides	-	*Mugil cephalus*	múgil
Anabas testudineus	-	*Mugil curema*	lisa criolla
Archosargus probatocephalus	sargo chopa	*Mugilidae*(*Mugil*spp.*; Liza* spp.)	lisas
Arius sp.	-	*Myxus petard*	-
Aseraggodes macleayanus	-	*Nematalosa erebi*	-
Bairdiellachrysoura	-	*Oncorhynchusmykiss*	trucha arco iris
Barbus peludinosus	-	*Oreochromis andersoni*	-
Barbus poechii	-	*Oreochromis machrochir*	-
Barbus thamalakanensis	-	*Osphronemus goramy*	gurami gigante
Barbus unitaeniatus	-	*Oxyeleotris lineolatus*	-
Bidyanus bidyanus	perca plateada	*Oxyeleotris marmoratus*	-
Brevoortia tyrannus	lacha tirana	*Petrocephalus catostoma*	-
Brycinus lateralis	-	*Platycephalus fuscus*	-
Carassiusauratusauratus	pez rojo	*Plecoglossus altivelis*	ayu
Catla catla	-	*Pogoniascromis*	cortinón negro
Channa marulius	-	*Psettodes*sp.	lenguados
Channa striatus	-	*Puntius gonionotus*	barbo plateado de Tailandia
Cirrhinus mrigala	-	*Puntius sophore*	-
Clarias gariepinus	pez gato africano	*Rohtee*sp.	-
Clarias ngamensis	-	*Sargochromis carlottae*	-
Clarius batrachus	-	*Sargochromis codringtonii*	-
Colisa lalia	-	*Sargochromis giardi*	-
Esomus sp.	-	*Scatophagus argus*	-
Fluta alba	anguila blanca	*Schilbe intermedius*	-
Glossamia aprion	-	*Schilbe mystus*	-

Nombre científico	Nombre común	Nombre científico	Nombre común
Glossogobius giuris	-	*Scleropages jardini*	saratoga
Glossogobius sp.	gobios	*Scortum barcoo*	-
Helostomatemmincki	gurami besador	*Selenotoca multifasciata*	striped scat
Hepsetus odoe	African pike	*Serranochromis angusticeps*	thinface largemouth
Hydrocynus vittatus	-	*Serranochromis robustus*	-
Ictalurus punctatus	bagre del canal	*Sillago ciliata*	-
Kurtus gulliveri	-	*Siluridae* (*genus*)	-
Labeo cylindricus	-	*Strongylura kreffti*	-
Labeo lunatus	-	*Therapon* sp.	-
Labeo rohita	-	*Tilapia rendalli*	-
Lates calcarifer	perca gigante	*Tilapia sparrmanii*	-
Leiopotherapon unicolor	-	*Toxotes chatareus*	-
Lepomis macrochirus	-	*Toxotes lorentzi*	-
Lutjanus argentimaculatus	-	*Trichogaster pectoralis*	-
Macchullochellapeelii	bacalao de Murray	*Trichogaster trichopterus*	-
Maccullochelaikei	-	*Tridentiger obscures obscures*	-

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

Los estadios susceptibles de la vida de los peces en general son el juvenil y el adulto joven. No se ha notificado infección por *A. invadans* ni en alevines ni en larvas.

Una inyección experimental de *A. invadans* en ejemplares de un año de carpas mayores de la India, *Catla catla*, rohus y mrigales, presentaron resistencia a *A. invadans* (Pradhan *et al.*, 2007), aunque son especies susceptibles por naturaleza. En infecciones experimentales se ha observado que el pez rojo es susceptible (Hatai *et al.*, 1977; 1994), pero que la carpa (Wada *et al.*, 1996), la tilapia (Khan *et al.*, 1998) y la anguila, *Anguilla anguilla* (Oidtmann *et al*., 2008) son resistentes.

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

Aphanomyces invadans puede detectarse con facilidad mediante técnicas histológicas en ejemplares de peces enfermos que se extraigan de zonas afectadas. Sin embargo, *A. invadans* se puede aislar solo de peces con signos clínicos leves o moderados de infección por *A. invadans*, que presenten puntos rojos o pequeñas úlceras. Los peces con signos clínicos graves o grandes úlceras no son adecuados para el aislamiento.

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

La zoospora móvil desempeña un importante papel en la transmisión de la enfermedad. Una vez la espora móvil se adhiere a la piel del pez, germina en condiciones estables y sus hifas invaden la piel del pez y el tejido muscular, hasta llegar a los órganos internos. El músculo esquelético es el órgano diana y presenta signos clínicos importantes de infección por *A. invadans* con granulomas micóticos.

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

No se dispone de información que indique que los peces pueden ser portadores de por vida de *A. invadans.* En general, la mayoría de peces infectados mueren durante los brotes. Aunque algunos peces con infecciones leves o moderadas pueden recuperarse, es improbable que sean portadores de *A. invadans* por vida.

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

2.3.1. Mecanismos de transmisión

El SUE se transmite horizontalmente. Las zoosporas de *A. invadans* se pueden transmitir horizontalmente entre peces por el suministro de agua. Se considera que solo las zoosporas secundarias o las zoosporas en fase de natación libre son capaces de adherirse a la piel dañada de los peces y germinar formando hifas. Si las zoosporas secundarias no hallan la especie susceptible o se encuentran con condiciones desfavorables, pueden enquistarse en el ambiente del estanque. Los quistes pueden esperar las condiciones que favorezcan su transformación en generaciones terciarias de zoosporas que también están en la fase de natación libre. La propiedad de *A. invadans* de enquistarse puede desempeñar un importante papel en el ciclo de brotes en zonas endémicas.

2.3.2. Prevalencia

La prevalencia de la infección por *A. invadans* en la naturaleza y en las piscifactorías puede ser alta en las zonas endémicas cuando se observan altos niveles de mortalidad, pero puede variar considerablemente. Se dispone de muy pocos datos sobre la prevalencia de la enfermedad o la infección en otros momentos. El intercambio de agua no controlado entre piscifactorías de zonas endémicas dará lugar a brotes de infección por *A. invadans* en la mayoría de las piscifactorías que crían especies de peces susceptibles.

2.3.3. Distribución geográfica

La infección por *A. invadans* se notificó por primera vez en ayu (*Plecoglossus altivelis*) de piscifactoría en la Prefactura de Oita, isla de Kyushu, Japón en 1971 (Egusa y Masuda, 1971). Más adelante se notificó en peces de estuario, en concreto en múgiles (*Mugil cephalus*) en el este de Australia en 1972 (Fraser *et al.*, 1992; McKenzie y Hall, 1976). La infección por *A. invadans* se ha extendido mucho por Nueva Guinea de Papua hacia el sureste y el sur de Asia, y hacia el oeste de Asia, donde ha llegado a Pakistán (Lilley *et al.*, 1998; Tonguthai, 1985). Los brotes de la enfermedad ulcerante en lacha tirana (*Brevoortia tyrannus*) en EE.UU. estuvieron causados por el mismo agente etiológico que la enfermedad observada de Asia (Blazer *et al.*, 1999; Lilley *et al.*, 1997a; Vandersea *et al.*, 2006). Los primeros brotes confirmados de infección por *A. invadans* en África tuvieron lugar en 2007 en Botswana, Namibia y Zambia, y estaban conectados al sistema fluvial Zambezi-Chobe (FAO, 2009). En 2010 y en 2011, la infección por *A. invadans* ha aparecido en peces de agua dulce salvajes de la Provincia del Cabo Oeste, en Sudáfrica y en bagres pardos salvajes en el Lago de Ontario, en Canadá. La infección por *A. invadans* se ha notificado en más de 20 países de cuatro continentes: Norteamérica, el sur de África, Asia y Australia.

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

Cuando la infección por *A. invadans* se transmite a un estanque de piscifactoría, como un estanque de ofiocéfalos, pueden observarse una alta morbilidad (>50%) y mortalidad (>50%) en los años de largas estaciones frías, con temperaturas de entre 18 y 22°C. No obstante, la mortalidad y la morbilidad pueden variar en gran medida en función de las especies de peces. Algunos peces infectados se pueden recuperar cuando termina la estación fría.

2.3.5. Factores ambientales

La infección por *A. invadans* tiene lugar principalmente a temperaturas del agua de entre los 18°C y los 22°C y tras periodos intensamente lluviosos (Bondad-Reantaso *et al.*, 1992). Estas condiciones favorecen la esporulación de *A. invadans* (Lumanlan-Mayo *et al.*, 1997), y se ha observado que las temperaturas de 17-19°C retrasan la respuesta inflamatoria de los peces ante la infección por oomicetos (Catap y Munday, 1998; Chinabut *et al.*, 1995). En algunos países, aparecen brotes en peces salvajes en primer lugar y a continuación se transmiten a estanques de piscifactorías. Normalmente, una infección por baño de *A. invadans* en especies de peces susceptibles no da lugar a signos clínicos de la enfermedad. El oomiceto *de A. invadans* necesita factores predisponentes que conlleven lesiones cutáneas, como infecciones parasitarias, bacterianas o víricas o agua ácida, para iniciar los signos clínicos de la enfermedad (Lilley *et al.*, 1998).

La infección por *A. invadans* se ha notificado en más de 20 países de cuatro continentes. Los desplazamientos de peces ornamentales vivos procedentes de países infectados por la infección por *A. invadans* podrían extender la enfermedad, como ocurrió con el brote de Sri Lanka (Balasuriya, 1994). Las inundaciones también causaron la diseminación del la infección por *A. invadans* en Bangladesh y en Pakistán (Lilley *et al.*, 1998). Una vez aparece un brote en ríos/canales, la enfermedad se puede extender tanto río abajo como río arriba a donde haya especies de peces susceptibles. Garantizar que el agua de

ríos infectados no entre en contacto con los estanques de las piscifactorías podría prevenir la transmisión de la enfermedad.

2.4. Control y prevención

2.4.1. Vacunación

No se dispone de ninguna vacuna protectora. Sin embargo, los ofiocéfalos que han sido inmunizados con un extracto crudo de *A. invadans* desarrollan una respuesta inmunitaria humoral, según se ha detectado mediante SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) y análisis mediante inmunoelectrotransferencia (Thompson *et al.*, 1997).

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

No existe ningún tratamiento eficaz para los peces infectados por *A. invadans* en la naturaleza o en estanques de piscifactoría. Para minimizar las pérdidas de peces en estanques de peces infectados, debe detenerse el intercambio de agua y aplicarse un tratamiento con cal o cal deshidratada y/o sal (Lilley *et al.*, 1998). Los intentos de utilizar agua verde, cenizas, cal y semillas o ramas de margosa (*Azadirachta indica*) para los tratamientos profilácticos de peces infectados por *A. invadans* en estanques de piscifactorías han dado varios resultados (*Inland Aquatic Animal Health Research Institute* [AAHRI], Tailandia, informe interno, 2001).

2.4.3. Inmunoestimulación

En pruebas preliminares se ha observado que la inyección intraperitoneal del inmunoestimulante, Salar-bec (que contiene 300 g kg^{-1} de vitamina C, 150 g kg^{-1} de vitamina B y cantidades muy pequeñas de las vitaminas B1, B2, B6 y B12), en peces ofiocéfalos puede aumentar la inhibición sérica tanto de la germinación como del crecimiento de la zoospora *in vitro.* Peces ofiocéfalos alimentados con un alimento granulado normal y alimento suplementado con Salar-bec siguieron presentando signos clínicos de infección por *A. invadans* tras exponerlos a *A. invadans.* Sin embargo, los peces ofiocéfalos que recibieron el inmunoestimulante, Salar-bec, presentaron un porcentaje de supervivencia de un 59,2% más alto que el del grupo control, alimentado con alimento normal (Miles *et al.*, 2001).

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

No se dispone de datos.

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

Se ha observado que algunas especies de piscifactoría importantes, como la tilapia del Nilo, el sabalote y la carpa china son resistentes a la infección por *A. invadans* y podrían criarse en zonas endémicas. Se recomienda la introducción de especies de peces autóctonas resistentes.

2.4.6. Agentes bloqueantes

No se dispone de datos.

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

La desinfección sistemática de huevos y larvas de peces como medida contra los hongos acuáticos es eficaz contra *A. invadans.* Hay que tener en cuenta que no existe ningún informe de la presencia de *A. invadans* en huevos ni larvas de peces.

2.4.8. Prácticas generales de manejo

El control de *A. invadans* en aguas naturales es probablemente imposible. En brotes que tienen lugar en masas de agua pequeñas y cerradas o en estanques de piscifactorías, la aplicación de cal agrícola al aguay la mejora de la calidad del agua, junto con la retirada de los peces infectados, a menudo es eficaz para reducir las mortalidades y controlar la enfermedad. Garantizar que no se produzcan fugas de agua de zonas infectadas por *A. invadans* hacia estanques de piscifactorías es una práctica normal que previene fácilmente la transmisión de la enfermedad a las piscifactorías. El cloruro de sodio o sal, y la cal agrícola son sustancias químicas seguras y eficaces para tratar o prevenir la transmisión de *A. invadans*.

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

La red de copo, el esparavel o el aparejo de cerca son las mejores opciones para la captura de peces enfermos en aguas naturales o estanques de piscifactorías. A efectos de investigación de los brotes, deben obtenerse peces enfermos con lesiones ulcerantes o puntos rojos en el cuerpo.

3.2. Conservación de las muestras para su envío

Los peces obtenidos deben transportarse al laboratorio vivos o en cajas enfriadas con hielo, con vistas a ser analizados. Los peces obtenidos de zonas alejadas deben anestesiarse y pueden fijarse en formalina normal al 10% o en formalina tamponada con fosfato al 10% durante al menos 1-2 días. Los ejemplares fijados se transfieren a continuación a bolsas de plástico de doble capa con papel de cocina humedecido con formalina. Las bolsas con los ejemplares húmedos se sellan y se envían al laboratorio.

3.3. Combinación de varias muestras

Se obtienen diez peces enfermos del lugar afectado por infección por *A. invadans*. El diagnóstico se lleva a cabo mediante la técnica histológica y el aislamiento del oomiceto en un solo pez o en un grupo de unos pocos peces.

3.4. Órganos y tejidos de elección

Lo recomendable es escoger peces con signos clínicos menores, y el tejido muscular adyacente o situado bajo la úlcera es el mejor para el aislamiento del oomiceto. El mejor tejido para el examen histopatológico es el tejido muscular situado en el borde de las úlceras.

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

Los peces gravemente enfermos o muertos no son adecuados para el aislamiento de oomicetos.

4. Métodos de diagnóstico

El diagnóstico de la infección por *A. invadans* en peces clínicamente afectados puede lograrse mediante histopatología, mediante el aislamiento de oomicetos o mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa.

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

Los brotes de infección por *A. invadans* se han asociado a mortalidad masiva de distintas especies de peces de agua dulce en la naturaleza (incluidos campos de arroz, estuarios, lagos y ríos) y de piscifactoría durante periodos de bajas temperaturas y tras periodos de intensas lluvias.

4.1.1. Signos clínicos

Los peces suelen desarrollar puntos rojos o lesiones ulcerantes pequeñas a grandes en el cuerpo.

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Los primeros signos de la enfermedad son una pérdida del apetito y un color oscuro que adquieren los peces. Los peces infectados pueden flotar cerca de la superficie del agua, y volverse hiperactivos con un patrón de movimiento muy entrecortado.

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

Pueden observarse puntos rojos en la superficie corporal, la cabeza, el opérculo o el pedúnculo caudal. Se observan úlceras grandes y poco profundas de color rojo o gris, a menudo con una necrosis marrón, en las fases más tardías. Aparecen lesiones superficiales grandes en el flanco o el dorso. La mayoría de especies distintas de *Channa striata* o lisas mueren en esta fase. En especies muy susceptibles, como los oficéfalos, las lesiones son más extensas y pueden conllevar una erosión completa de la parte

posterior del cuerpo, o la necrosis de tejidos tanto blandos como duros del cráneo, de modo que el encéfalo está expuesto en el animal vivo.

4.2.2. Bioquímica clínica

No se dispone de información.

4.2.3. Anatomopatología microscópica

Las primeras lesiones están causadas por una dermatitis eritematosa sin intervención evidente de oomicetos. Se observan hifas de *Aphanomyces invadans* creciendo en el músculo esquelético a medida que la lesión avanza pasando de ser una dermatitis activa crónica leve a una dermatitis granulomatosa necrotizante grave localmente extensa con grave degeneración flocular del músculo. El oomiceto desencadena una fuerte respuesta inflamatoria y se forman granulomas alrededor de las hifas penetrantes. Los raspados de lesiones del cuerpo del pez o de las úlceras en general ponen de manifiesto infección fúngicas, bacterianas y/o parasitarias secundarias.

4.2.4. Preparaciones húmedas

No son adecuadas para el diagnóstico de infección por *A. invadans*.

4.2.5. Frotis

No son adecuados para el diagnóstico de infección por *A. invadans*.

4.2.6. Microscopía electrónica/citopatología

No son adecuadas para el diagnóstico de infección por *A. invadans*.

4.3. Métodos de detección e identificación del agente

4.3.1. Métodos directos de detección

4.3.1.1. Métodos microscópicos

La preparación de aplastamiento puede llevarse a cabo del siguiente modo:

i) Se retira la superficie de la úlcera mediante una hoja de bisturí.

ii) Se corta el tejido muscular del borde de la úlcera.

iii) Se colocan los trozos de tejido sobre una tabla de cortar y a continuación se realizan cortes mediante una hoja de bisturí.

iv) Se colocan los finos cortes de tejido entre dos portas y se presionan suavemente con los dedos.

v) Se retira uno de los portas y se cubre el tejido con un cubreobjetos. Se observa al microscopio óptico para hallar las hifas no septadas de *A. invadans* (de 12-25 µm de diámetro).

4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

No son adecuadas para el diagnóstico de infección por *A. invadans*.

4.3.1.1.2. Frotis

No son adecuados para el diagnóstico de infección por *A. invadans*.

4.3.1.1.3. Cortes fijados

Procedimiento de la toma de muestras

i) Se escogen solo ejemplares vivos o moribundos de peces con lesiones clínicas.

ii) Se toman muestras de piel/músculo (<1 cm^3), incluido el borde de la lesión más cercano a la misma y el tejido circundante.

iii) Se fijan los tejidos de inmediato en formalina al 10%. La cantidad de formalina debe ser 10 veces el volumen del tejido a fijar.

Procedimiento histológico

El procesado del tejido fijado consiste en la deshidratación mediante disoluciones ascendentes de alcohol, lavado en un agente miscible en cera e impregnación con cera. Se realizan cortes de los

bloques de tejido de pez de unos 5 µm de espesor y se montan sobre un porta de vidrio. Antes de teñirlo, el corte debe estar completamente desprovisto de cera, y a continuación se tiñe con hematoxilina y eosina (H/E) (Chinabut y Roberts, 1999). La tinción H/E y las tinciones fúngicas generales (como la de Grocott) ponen de manifiesto los típicos granulomas e tifas invasivas.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

4.3.1.2.1 Aislamiento de Aphanomyces invadans *de tejidos internos*

A continuación se describen dos métodos de aislamiento de *A. invadans* o *A. piscicida* adaptados de Lilley *et al.*, 1998 y Willoughby y Roberts, 1994.

Método 1: Las lesiones dérmicas moderadas, de color claro y con relieve son las más adecuadas para los intentos de aislamiento de oomicetos. Se retiran las escamas de la periferia de la lesión y se quema la piel subyacente con una espátula al rojo vivo como si se quisiera esterilizar la superficie. Mediante una hoja de bisturí y unas pinzas de punta fina estériles, se corta la capa subyacente a la zona quemada y, cortando horizontalmente y apartando los tejidos superficiales, se expone el músculo subyacente. Es necesario asegurarse de que los instrumentos no entren en contacto con la superficie externa contaminada, para evitar que se contamine el músculo subyacente. Mediante técnicas asépticas, se toman cuidadosamente trozos de músculo afectado, de unos 2 mm^3, y se depositan en una placa de Petri que contenga agar de glucosa/pectosa (GP) (véase la Tabla 4.1) con penicilina (100 unidades ml^{-1}) y estreptomicina (100 µg ml^{-1}). Se sellan las placas, se incuban a temperatura ambiente o a 25°C y se examinan a diario. Se repite la transferencia de puntas de hifas emergentes a placas limpias de agar GP con antibióticos hasta que los cultivos estén libres de contaminación.

Método 2: Las lesiones situadas en el flanco o la cola del pez <20 cm de longitud se pueden muestrear cortando e pez en dos con un bisturí, y realizando un corte transversal del pez a la altura del borde de la lesión. Se aplica llama al bisturí hasta que esté al rojo vivo y se utiliza para esterilizar la superficie de músculo expuesta. Se utiliza una hoja de bisturí pequeña estéril para cortar un bloque circular de músculo (de 2–4 mm^3) desde debajo de la lesión y se coloca en una placa de Petri con medio GP (véase la Tabla 4.1) con 100 unidades ml^{-1} de penicilina G y 100 µg ml^{-1} de estreptomicina. Los instrumentos no pueden contactar con la superficie externa contaminada del pez. Se incuban los medios inoculados a unos 25°C y se examinan al microscopio (preferiblemente un microscopio invertido) en un plazo de 12 horas. Se repite la transferencia de puntas de hifas emergentes a placas de medio GP con 12 g/litro de agar técnico, 100 unidades/ml de penicilina G y 100 µg/ml de estreptomicina hasta que se obtengan cultivos axénicos. La cepa de oomiceto también se puede mantener a 25°C en agar GY (véase la Tabla 4.1) y transferirse a un tubo nuevo de agar GY una vez cada 1-2 semanas (Hatai y Egusa, 1979).

4.3.1.2.2. Identificación de Aphanomyces invadans

Aphanomyces invadans no produce estructuras sexuales y, por tanto, no debe diagnosticarse por meros criterios morfológicos. Sin embargo, los oomicetos se pueden identificar hasta nivel de género induciendo esporogénesis y poniendo de manifiesto las características asexuales típicas de *Aphanomyces* spp., como describen Lilley *et al.*, 1998. *A. invadans* tiene un crecimiento característicamente lento en cultivo y no crece a 37°C en agar GPY (Tabla 4.1). Los datos sobre los perfiles de temperatura-crecimiento son los indicados por Lilley y Roberts, 1997. Para confirmar *A. invadans* existen dos posibles procedimientos, el bioanálisis y la amplificación del ADNr de *A. invadans* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

4.3.1.2.3 Inducción de la esporulación en cultivos de Aphanomyces invadans

La inducción de estructuras reproductivas asexuales es necesaria para identificar cultivos con oomicetos como miembros del género *Aphanomyces.* Para inducir esporulación, se coloca un tapón de agar (de 3-4 mm de diámetro) de micelio en crecimiento activo en una placa de Petri que contenga caldo GPY y se incuba 4 días a unos 20°C. Se lava para retirar el agar de la alfombra resultante mediante una transferencia secuencial por cinco placas de Petri que contengan agua de estanque esterilizada en autoclave (Tabla 4.1), y se deja toda la noche a 20°C en agua de estanque esterilizada en autoclave. Tras unas 12 horas, al microscopio debería observarse la formación de agrupaciones aclioides de quistes primarios y la liberación de zoosporas secundarias móviles.

4.3.1.2.4. Bioanálisis

Los peces se pueden infectar experimentalmente mediante la inyección intramuscular de una suspensión de 0,1 ml de zoosporas móviles 100+ en peces susceptibles a la infección por *A. invadans* (preferiblemente *Channa striata* u otras especies de peces susceptibles) a 20°C, y revelando el crecimiento histológicos de hifas no septadas, de 12-25 µm de diámetro en el músculo

de peces obtenidos 7 días después, y de granulomas micóticos típicos en el músculo de peces obtenidos 10-14 días después.

4.3.1.2.5. Métodos de detección de antígeno basados en anticuerpos

Los anticuerpos policlonales contra *A. invadans* o *Aphanomyces* saprófitos presentaron reactividad cruzada entre ellos al utilizar electroforesis en gel de proteína y análisis mediante inmunoelectrotransferencia e inmunohistoquímica (Lilley *et al.*, 1997b). Sin embargo, los anticuerpos monoclonales específicos contra *A. invadans* desarrollados más tarde se observó que tenían una alta especificidad y sensibilidad a *A. invadans* al utilizar inmunofluorescencia. Este anticuerpo monoclonal permitía detectar las hifas de *A. invadans* en el primer estadio de la infección (Miles *et al.*, 2003).

4.3.1.2.6. Técnicas moleculares

4.3.1.2.6.1. Amplificación del ADN de A. invadans *mediante la reacción en cadena de la polimerasa*

Preparación del ADN de la cepa de A. invadans

Se extrae ADN de una colonia en crecimiento activo de un cultivo de *A. invadans* en caldo GY aproximadamente a los 4 días o cuando los micelios jóvenes alcancen los 0,5-1,0 cm de diámetro. Los micelios se transfieren a placas de Petri estériles de unos 100 mm, se lavan dos veces con PBS y a continuación se colocan sobre papel de cocina para retirar el líquido. Las puntas de las hifas (~50–250 mg) se parten con una hoja de bisturí y se transfieren a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml para la extracción del ADN. Se han utilizado kits comerciales de extracción de ADN con éxito (Phadee *et al.*, 2004b; Vandersea *et al.*, 2006).

Preparación de ADN a partir de tejido infectado por A. invadans

Trozos pequeños de tejido infectado por *A. invadans* de 25-50 mg son adecuados para las extracciones de ADN (Phadee *et al.*, 2004a).

Técnica de diagnóstico mediante PCR

Dos técnicas recientemente publicadas son más específicas para *A. invadans*. En la reacción PCR se recomienda utilizar agua ultrapura para todas las diluciones químicas.

Método 1: El cebador directo específico de especie está situado cerca del extremo 3' del gen de la SSU (subunidad pequeña) y un cebador inverso específico de especie está situado en la región ITS1 para Ainvad-2F (5'-TCA-TTG-TGA-GTG-AAA-CGG-TG-3') e Ainvad-ITSR1 (5'-GGC-TAA-GGT-TTC-AGT-ATG-TAG-3'). La mezcla para la PCR contenía cada cebador a una concentración 25 pM, cada desocinucleósido trifosfato a una concentración 2,5 mM, 0,5 U de ADN polimerasa *Taq* Platinum y 20 ng de ADN genómico (de una cepa de *Aphanomyces* o de tejido infectado) hasta un volumen total de 50 µl. El ADN se amplifica que un termociclador en las siguientes condiciones de ciclado: 2 minutos a 95°C; 35 ciclos, cada uno de 30 segundos a 95°C, 45 segundos a 56°C, 2,5 minutos a 72°C, y una extensión final de 5 minutos a 72°C. El producto de la PCR se analiza mediante electroforesis en gel de agarosa y el producto diana es de 234 pb (Vandersea *et al.*, 2006).

Método 2: Los lugares de los cebadores específicos de especie se sitúan en las regiones ITS1 e ITS2. El cebador directo es ITS11 (5'-GCC-GAA-GTT-TCG-CAA-GAA-AC-3') y el inverso es ITS23 (5'-CGT-ATA-GAC-ACA-AGC-ACA-CCA-3'). La mezcla para PCR contiene cada cebador a una concentración 0,5 µM, cada desoxinucleósido trifosfato a una concentración 0,2 mM, $MgCl_2$ 1,5 mM, 0,6 U de ADN polimerasa *Taq* y 20 ng de ADN genómico (de la cepa de *Aphanomyces*) para un volumen total de 25 µl. El ADN se amplifica en las siguientes condiciones de ciclado: 5 minutos a 94°C; 25 ciclos, cada uno de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 65°C, 1 minuto a 72°C; y una extensión final de 5 minutos a 72°C. El producto de la PCR se analiza mediante electroforesis en gel de agarosa y el producto diana es de 550 pb. La amplificación mediante PCR utilizando ADN molde del tejido infectado es similar al protocolo anterior excepto por el hecho de que se utiliza 5 ng de ADN molde para 35 ciclos (Phadee *et al.*, 2004b).

Método 3: Los cebadores específicos de especie están situados en las regiones ITS1 e ITS2. El cebador directo es BO73 (5'-CTT-GTG-CTG-AGC-TCA-CAC-TC-3') and the reverse is BO639 (5'-ACA-CCA-GAT-TAC-ACT-ATC-TC-3'). La mezcla para PCR contiene 0,6 µM de cada cebador, desoxinucleósido trifosfato 0,2 mM, $MgCl_2$ 1,5 mM, 0,625 unidades de ADN polimerasa Taq y unos 5 ng de ADN genómico (o 2,5 µl de ADN molde extraído de 25 mg de tejido infectado y suspendido en 100 µl de tampón) en un volumen de reacción de 50 µl (Oidtmann *et al.*, 2008). El ADN se amplifica en las siguientes condiciones de ciclado: 96°C durante 5 minutos; 35 ciclos de 1 minuto a 96°C, 1 minuto a 58°C y 1 minuto a 72°C; seguido de una extensión final a 72°C

durante 5 minutos (Oidtmann, comunicación personal). El producto de la PCR se analiza mediante electroforesis en gel de agarosa y el producto diana es de 564 pb.

Todas las cepas de *A. invadans* halladas hasta ahora corresponden a un solo genotipo, y esto facilita la identificación. Como alternativa, puede llevarse a cabo la secuenciación de los productos de la PCR y los resultados se pueden comparar con la secuencia depositada en los bancos públicos de datos de genes. Ambos oomicetos patógenos se pueden diferenciar mediante técnicas moleculares (Diéguez-Uribeondo *et al.*, 2009; Lilley *et al.*, 2003; Phadee *et al.*, 2004b; Vandersea *et al.*, 2006).

4.3.1.2.6.2. Hibridación in-situ *fluorescente de péptido de ácido nucleico (FISH)*

Una técnica de hibridación fluorescente *in-situ* de péptido de ácido nucleico (FISH) ha demostrado una alta especificidad por *A. invadans.* La técnica permite detectar directamente la estructura tipo miceliar de los oomicetos en cortes finos de tejidos de órganos afectados de peces susceptibles. La sonda de fluoresceína (FLU) diseñada para hibridar la subunidad pequeña del ARNr de *A. invadans* (pb del 621 al 635; código de acceso al GenBank AF396684) es 5'-FLU-GTA-CTG-ACA-TTT-CGT-3' o Ainv-FLU3.

El tejido afectado por *A. invadans* se fija e hibrida cuanto antes una vez obtenidos los peces, con el fin de minimizar la degradación del ARN. El tejido (de unos 20 mg) se disecciona desde la periferia de las lesiones con hojas de bisturí estériles y se coloca en pocillos individuales de una placa de microtitulación de 24 pocillos. Se añade 1 ml de fijador salino con etanol (44 ml de etanol al 95%, 10 ml de H_2O, y 6 ml de tampón SET 25× [NaCl 3,75 M, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 25 mM, Tris/HCl 0,5 M, pH 7,8]) que contiene Monolaurato de sorbitán polioxietilenado (Tween 20) al 3% para potenciar la permeabilización del tejido. La placa de microtitulación se agita suavemente a temperatura ambiente en un agitador de placas (a 30 rpm) durante 1 hora y media. Los tejidos fijados se lavan (dos veces 15 minutos cada vez) con 0,5 ml de tampón de hibridación (SET 5x, Igepal-CA630 al 0,1% [v/v] y poly[A] a razón de 25 µg ml^{-1}) que contenga Tween 20 al 3%. El tampón de hibridación se retira, y los tejidos se vuelven a suspender en 0,5 ml de tampón de hibridación que contenga Tween 20 al 3% y sonda Ainv-FLU3 100 nM. Se incuban muestras control "sin sonda" con 0,5 ml de tampón de hibridación/ Tween 20 al 3%. Todos los tejidos se incuban a 60°C 1 hora en oscuridad. Tras la incubación, los tejidos se lavan dos veces con 1 ml de tampón SET 5x precalentado (a 60°C) que contenga un 3% de Tween 20 para eliminar la sonda residual. Las muestras de tejido se montan sobre portas de microscopio recubiertos de poli-L-lisina. Se instila una gota de la solución Antifade para microscopía óptica sobre las muestras, que a continuación se cubren con un cubreobjetos. Los análisis se llevan a cabo mediante microscopía óptica y de epifluorescencia. Los ajustes de la cámara y del microscopio se mantienen constantes para que puedan realizarse análisis comparativos de la intensidad de la fluorescencia entre muestras con sonda y muestras sin sonda. Las hifas de los oomicetos fluorescentes emiten una fluorescencia verde sobre el fondo de tejido oscuro. Los protocolos explicados son los publicados por Vandersea *et al*. (2006). Utilizando la técnica de FISH, *A. invadans* se visualiza mucho mejor en cortes finos de tejido que en los aplastamientos recientes de tejido.

Tabla 4.1. *Medios para el aislamiento, crecimiento y esporulación en cultivos de* Aphanomyces invadans

Medio de GP (glucosa/peptona)	**Caldo GPY (glucosa/peptona/ levadura)**	**Agar GPY**	**Agar GY**	**Agua de estanque esterilizada en autoclave**
glucosa 3 g $litro^{-1}$ peptona 1 g $litro^{-1}$ $MgSO_4.7H_2O$ 0,128 g $litro^{-1}$ $KH_2PO_4$0,014 g $litro^{-1}$ $CaCl_2.2H_2O$ 0,029 g $litro^{-1}$ $FeCl_3.6H_2O$ 2,4 mg $litro^{-1}$ $MnCl_2.4H_2O$ 1,8 mg $litro^{-1}$ $CuSO_4.5H_2O$ 3,9 mg $litro^{-1}$ $ZnSO_4.7H_2O$ 0,4 mg $litro^{-1}$	Caldo GP + extracto de levadura 0,5 g $litro^{-1}$	Caldo GPY + agar técnico 12 g $litro^{-1}$	Glucosa 1%, extracto de levadura 0,25%, agar 1,5%	Muestra de agua de estanque o lago que se sepa que es adecuada para el crecimiento de oomicetos. Se filtra por un papel de filtro Whatman 541. Se mezcla una parte de agua de estanque con dos partes de agua destilada y se esteriliza en autoclave. pH a 6–7.

4.3.1.2.7. Purificación del agente

Es necesario mantener *A. invadans* en el cultivo axénico. Dado que se caracteriza por un crecimiento lento, resulta fácilmente contaminado por otros microorganismos, como bacterias y otros oomicetos de crecimiento rápido y hongos. Los intentos de purificar o aislar *A. invadans* de cultivos contaminados suelen fracasar.

4.3.2. Métodos serológicos

Los métodos serológicos para la detección e identificación de *A. invadans* en ejemplares enfermos no son prácticos. Si es necesario se puede recurrir a los anticuerpos monoclonales, que ofrecen una mejor especificidad y sensibilidad que los policlonales para la detección serológica o identificación de *A. invadans* en muestras de ejemplares enfermos o en cepas patógenas.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

Los métodos actualmente disponibles para la vigilancia dirigida, la detección y el diagnóstico de la infección por *A. invadans* 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	c	c	c	b	c
MO directa; observación de las hifas de los oomicetos en aplastamientos de tejidos frescos	d	d	d	b	b
FISH; observación de las hifas de los oomicetos en tejidos	d	d	d	a	a
Histopatología	c	c	c	a	a
Aislamiento de *A. invadans* e identificación confirmativa mediante bioanálisis o PCR	d	d	d	a	a
PCR de extractos de tejido	d	d	d	a	a
Análisis de la secuencia	d	d	d	d	a
Observación de tejidos mediante ME de transmisión	d	d	d	d	d

MO = microscopía óptica; FISH = hibridación fluorescente *in-situ* de péptido de ácido nucleico; PCR = reacción en cadena de la polimerasa; ME = microscopía electrónica.

6. Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia del síndrome ulcerante epizoótico

La prueba de vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de infección por *A. invadans* es el examen de los signos macroscópicos. La vigilancia dirigida se lleva a cabo dos veces al año para cubrir determinadas variaciones estacionales, al menos una vez durante la estación que favorece la infección por *A. invadans*, o cuando las

temperaturas del agua son de entre 18 y 25°C. Deben implementarse medidas de bioseguridad para mantener un estatus libre de enfermedad en instalaciones o compartimientos de acuicultura controlados.

Mediante la observación de los signos macroscópicos como método de vigilancia dirigida, debe examinarse un gran número de peces sin matarlos. Deben tomarse muestras de peces de piscifactorías, de compartimientos o de masas naturales de agua cuidadosamente con equipo de pesca o redes adecuadas. Los tamaños de muestra apropiados se basarán en los datos descritos en la *Guía de la* OIE *para la Vigilancia Sanitaria de los Animales Acuáticos* (2009).

Una vez los peces presentan signos macroscópicos similares a los de la infección por *A. invadans*, deben clasificarse como peces sospechosos, y el lugar/piscifactoría/compartimiento/zona deberá considerarse sospechoso. Las muestras sospechosas deben analizarse en mayor detalle mediante los métodos mencionados en el apartado sobre diagnóstico provisional, y a continuación el diagnóstico se confirmará como se describe en la Tabla 5.1.

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

Un resultado positivo obtenido en cualquiera de las técnicas de diagnóstico descritas en el apartado 4 debe considerarse sospechoso.

7.2. Definición de caso confirmado

En las especies susceptibles de la zona geográfica en la que se sabe que existe infección por *A. invadans,* un caso confirmado de la infección por *A. invadans* es todo aquel en el que se observen granulomas micóticos en la histopatología.

En otras especies hospedadoras o fuera de la zona en la que se sepa que existe infección por *A. invadans,* se recomienda contar con la confirmación mediante histopatología y PCR.

8. Bibliografía

BALDOCK F.C., BLAZER V., CALLINAN R., HATAI K., KARUNASAGAR I., MOHAN C.V. & BONDAD-REANTASO M.G. (2005). Outcomes of a short expert consultation on epizootic ulcerative syndrome (EUS): Re-examination of causal factors, case definition and nomenclature. *In:* Diseases in Asian Aquaculture V, Walker P., Laster R. & Bondad-Reantaso M.G., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, 555–585.

BALASURIYA L.K.S.W. (1994). Epizootic ulcerative syndrome in fish in Sri Lanka, country status report. *In:* Proceeding of the ODA Regional Seminar on Epizootic Ulcerative, Robert R.J., Campbell B. & MacRae I.H., eds. Aquatic Animal Health Research Institute, Bangkok, Thailand, pp 39–47.

BLAZER V.S., VOGELBEIN W.K., DENSMORE C.L., MAY E.B., LILLEY J.H. & ZWERNER D.E. (1999). Aphanomyces as a cause of ulcerative skin lesions of menhaden from Chesapeake Bay tributaries. *J. Aquat. Anim. Health,* **11**, 340–349.

BONDAD-REANTASO M.G., LUMANLAN S.C., NATIVIDAD J.M. & PHILLIPS M.J. (1992). Environmental monitoring of the epizootic ulcerative syndrome (EUS) in fish from Munoz, Nueva Ecija in the Philippines. *In:* Diseases in Asian Aquaculture 1, Shariff M., Subasinghe R.P. & Arthur J.R., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 475–490.

CATAP E.S. & MUNDAY B.L. (1998). Effects of variations of water temperature and dietary lipids on the expression of experimental epizootic ulcerative syndrome (EUS) in sand whiting, Sillago ciliata. *Fish Pathol.,* **33**, 327–335.

CHINABUT S. & ROBERTS R.J. (1999). Pathology and Histopathology of Epizootic Ulcerative Syndrome (EUS). Aquatic Animal Health Research Institute, Department of Fisheries, Royal Thai Government, Bangkok, Thailand, 33 pp. ISBN 974-7604-55-8.

CHINABUT S., ROBERTS R.J., WILLOUGHBY G.R. & PEARSON M.D. (1995) Histopathology of snakehead, *Channa striatus* (Bloch), experimentally infected with the specific *Aphanomyces* fungus associated with epizootic ulcerative syndrome (EUS) at different temperatures. *J. Fish Dis.*, **18**, 41–47.

DIÉGUEZ-URIBEONDO J., GARCIA M.A., CERENIUS L., KOZUBÍKOVÁ E., BALLESTEROS I., WINDELS C., WEILAND J., KATOR H., SÖDERHÄLL K. & MARTÍN M.P. (2009). Phylogenetic relationships among plant and animal parasites, and saprotrophs in *Aphanomyces* (Oomycetes). *Fungal Genetics and Biology*, **46**, 365–376.

EGUSA S. & MASUDA N. (1971). A new fungal disease of Plecoglossus altivelis. *Fish Pathol.,* **6**, 41–46.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) (2009). Report of the international emergency disease investigation task force on a serious fish disease in Southern Africa, 18-26 May 2007, FAO, Rome, Italy, 70 pp.

FRASER G.C., CALLINAN R.B. & CALDER L.M. (1992). *Aphanomyces* species associated with red spot disease: an ulcerative disease of estuarine fish from eastern Australia. *J. Fish Dis.*, **15**, 173–181.

HATAI K. & EGUSA S. (1979). Studies on pathogenic fungus of mycotic granulomatosis III. Development of the medium for MG-fungus. *Fish Pathol.,* **13**, 147–152.

HATAI K., EGUSA S., TAKAHASHI S. & OOE K. (1977). Study on the pathogenic fungus of mycotic granulomatosis – I. Isolation and pathogenicity of the fungus from cultured-ayu infected with the disease. *Fish Pathol.,* **12**, 129–133.

HATAI K., NAKAMURA K., AN RHA S., YUASA K. & WADA S. (1994). *Aphanomyces* infection in dwarf gourami (*Colisa lalia*). *Fish Pathol.,* **29**, 95–99.

KHAN M.H., MARSHALL L., THOMPSON K.D., CAMPBELL R.E. & LILLEY J.H. (1998). Susceptibility of five fish species (Nile tilapia, rosy barb, rainbow trout, stickleback and roach) to intramuscular injection with the *Oomycete* fish pathogen, *Aphanomyces invadans*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.,* **18**, 192–197.

LILLEY J.H., CALLINAN R.B., CHINABUT S., KANCHANAKHAN S., MACRAE I.H. & PHILLIPS M.J. (1998). Epizootic ulcerative syndrome (EUS) technical handbook. Aquatic Animal Health Research Institute, Bangkok, Thailand.

LILLEY J.H., HART D., PANYAWACHIRA V., KANCHANAKHAN S., CHINABUT S., SÖDERHÄLL K. & CERENIUS L. (2003). Molecular characterization of the fish-pathogenic fungus Aphanomyces invadans. *J. Fish Dis.,* **26**, 263–275.

LILLEY J.H., HART D., RICHARDS R.H., ROBERTS R.J., CERENIUS L. & SODERHALL K. (1997a). Pan-Asian spread of single fungal clone results in large scale fish kills. *Vet. Rec.*, **140**, 653–654.

LILLEY J.H., PETCHINDA T. & PANYAWACHIRA V. (2001). *Aphanomyces invadans* zoospore physiology: 4. *In vitro* viability of cysts. *The AAHRI Newsletter*, **10**, 1–4.

LILLEY J.H. & ROBERTS R.J. (1997). Pathogenicity and culture studies comparing the *Aphanomyces* involved in epizootic ulcerative syndrome (EUS) with other similar fungi. *J. Fish Dis.*, **20**, 135–144.

LILLEY J.H., THOMPSON K.D. & ADAMS A. (1997b). Characterization of *Aphanomyces invadans* by electrophoretic and Western blot analysis. *Dis. Aquat. Org*., **30**, 187–197.

LUMANLAN-MAYO S.C., CALLINAN R.B., PACLIBARE J.O., CATAP E.S. & FRASER G.C. (1997). Epizootic ulcerative syndrome (EUS) in rice-fish culture systems: an overview of field experiments 1993-1995. *In:* Diseases in Asian Aquaculture III, Flegel T.W. & MacRae I.H., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 129–138.

MCKENZIE R.A. & HALL W.T.K. (1976). Dermal ulceration of mullet (*Mugil cephalus*). *Aust. Vet. J.,* **52**, 230–231.

MILES D.J.V., POLCHANA J., LILLEY J.H., KANCHANAKHAN S., THOMPSON K.D. & ADAMS A. (2001). Immunostimulation of striped snakehead *Channa striata* against epizootic ulcerative syndrome. *Aquaculture*, **195**, 1–15.

MILES D.J.C., THOMPSON K.D., LILLEY J.H. & ADAMS A. (2003). Immunofluorescence of the epizootic ulcerative syndrome pathogen, *Aphanomyces invadans*, using a monoclonal antibody. *Dis. Aqaut. Org*., **55**, 77–84.

OIDTMANN B., STEINBAUER GEIGER S. & HOFFMANN R.W. (2008). Experimental infection and detection of *Aphanomyces invadans* in European catfish, rainbow trout and European eel. *Dis. Aquat. Org*., **82**, 185–207.

PHADEE P., KURATA O. & HATAI K. (2004a). A PCR method for the detection of *Aphanomyces piscicida*. *Fish Pathol.,* **39**, 25–31.

PHADEE, P., KURATA, O., HATAI K., HIRONO I. & AOKI T. (2004b). Detection and identification of fish-pathogenic *Aphanomyces piscicida* using polymerase chain reaction (PCR) with species-specific primers. *J. Aquat. Anim. Health*, **16**, 220–230.

PRADHAN P.K., MOHAN C.V., SHANKAR K.M., KUMAR B.M. & DEVARAJA G. (2007). Yearlings of Indian major carps resist infection against the epizootic ulcerative syndrome pathogen, *Aphanomyces invadans*. *Current Science*, **92**, 1430–1434.

THOMPSON K.D., LILLEY J.H., CHINABUT S. & ADAMS A. (1997). The antibody response of snakehad, *Channa striata* Bloch, to Aphanomyces invadans. Fish & Shellfish Immunology, **7**, 349-353.

TONGUTHAI K. (1985). A preliminary account of ulcerative fish diseases in the Indo-Pacific region (a comprehensive study based on Thai experiences). National Inland Fisheries Institute, Bangkok, Thailand, 39 pp.

VANDERSEA M.W., LITAKER R.W., YONNISH B., SOSA E., LANDSBERG J.H., PULLINGER C., MOON-BUTZIN P., GREEN J., MORRIS J.A., KATOR H., NOGA E.J. & TESTER P.A. (2006). Molecular assays for detecting *Aphanomyces invadans* in ulcerative mycotic fish lesions. *Appl. Environ. Microbiol.,* **72**, 1551–1557.

WADA S., AN RHA S., KONDOH T., SUDA H., HATAI K. & ISHII H. (1996). Histopathological comparison between ayu and carp artificially infected with *Aphanomyces piscicida. Fish Pathol.,* **31**, 71–80.

WILLOUGHBY L.G. & ROBERTS R.J. (1994). Improved methodology for isolation of the Aphanomyces fungal pathogen of epizootic ulcerative syndrome (EUS) in Asian fish. *J. Fish Dis.,* **17**, 541–543.

*
* *

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la infección por *Aphanomyces invadans* (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/).
Por favor, contacte con el Laboratorio de Referencia de la OIE para más información sobre la infección por *Aphanomyces invadans*

CAPÍTULO 2.3.3

INFECCIÓN POR *Gyrodactylus salaris*

1. Ámbito de aplicación

Gyrodactylus salaris (Platyhelminthes; Monogenea) es un parásito vivíparo de agua dulce que podría causar Infección en el salmón del Atlántico (*Salmo salar*).

2. Información de enfermedad

2.1. Factores del agente

2.1.1. El agente patógeno, cepas del agente

Se han identificado varias cepas o clados de *Gyrodactylus salaris* mediante la genotipificación del marcador de la citocromo oxidasa I (CO1) mitocondrial (Hansen *et al*., 2003; 2007b; Meinilä *et al.,* 2002; 2004). Aunque no parece haber ninguna correspondencia entre las cepas identificadas mediante la CO1 y la patogenicidad (Hansen *et al*., 2007a), todas las cepas encontradas en el salmón del Atlántico que se han estudiado hasta la fecha en pruebas de laboratorio son muy patógenas para el salmón del Atlántico. Recientemente, se han encontrado cepas que no son patógenas para el salmón en la trucha alpina no migratoria (*Salvelinus alpinus*) en Noruega (Olstad *et al*., 2007a; Robertsen *et al*., 2007), y en la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en Dinamarca (Jørgensen *et a*l., 2007; Lindenstrøm *et al*., 2003).

2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

La supervivencia de parásitos fuera del hospedador depende de la temperatura; así, sobreviven unas 24 horas a 19°C, 54 horas a 13°C, 96 horas a 7°C y 132 horas a 3°C (Olstad *et al*., 2006). De igual forma, la supervivencia en un hospedador muerto también depende de la temperatura: *G. salaris* puede sobrevivir en ejemplares muertos de salmón del Atlántico 72, 142 y 365 horas a 18, 12 y 3°C, respectivamente (Olstad *et al*., 2006).

2.1.3. Estabilidad del agente (métodos eficaces de inactivación)

Gyrodactylus salaris sobrevive a cualquier temperatura de entre 0 y 25°C. No se sabe cuál es la tolerancia a temperaturas superiores a los 25°C. No es resistente a la congelación. *Gyrodactylus salaries* no es resistente a la sequía y debe estar envuelto de agua para sobrevivir. *Gyrodactylus salaries* muere tras pocos días a un pH $\leq$5. Es más sensible a un pH bajo (5,1<pH<6,4) asociado a aluminio y zinc que el hospedador salmón del Atlántico (Poléo *et al.*, 2004; Soleng *et al*., 2000) (véase también el apartado 2.4.2).

2.1.4. Ciclo de vida

Gyrodactylus salaries es un parasite estricto con un ciclo de vida directo. Estos parásitos tienen cinco ejemplares de descendencia y no hay huevos, estadios de reposo, estadios de transmisión especializados ni hospedadores intermediarios.

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Gyrodactylus salaris es un ectoparásito principalmente del salmón del Atlántico (*Salmo salar*), pero puede sobrevivir y reproducirse en varios salmónidos, como la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), la trucha alpina (*Salvelinus alpinus*), el salvelino (*Salvelinus fontinalis*), el tímalo (*Thymallus thymallus*), la trucha lacustre (*Salvelinus namaycush*) y la trucha común (*Salmo trutta*) (en orden decreciente de susceptibilidad).

En el salmón del Atlántico se ha observado una susceptibilidad variable a *G. salaris* (Bakke *et al.,* 2002). Las cepas bálticas se han considerado resistentes. Sin embargo, esto solo se ha observado en el salmón procedente del río ruso Neva, del río sueco Torneälven y del lago finlandés sin litoral Saima. El salmón

báltico del río sueco Indalsälven es casi tan susceptible como el salmón noruego o el del río escocés Conon (Bakke *et al.,* 2004). El salmón de otros ríos bálticos muestra una susceptibilidad intermedia.

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

Todos los estadios de la vida del hospedador son susceptibles, pero solo se ha observado mortalidad en alevines y en pintos.

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

No es aplicable.

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

Gyrodactylus salaries aparece en las aletas de la mayoría de ejemplares de salmón del Atlántico, pero la preferencia anatómica depende de la intensidad de la infección (Jensen y Johnsen, 1992; Mo, 1992). También se hallan parásitos con frecuencia en el cuerpo y menos a menudo en las branquias. En otros hospedadores, la distribución puede ser diferente, pero en algunas especies hospedadoras el parásito es relativamente menos abundante en las aletas y relativamente más frecuente en el cuerpo en comparación con el salmón.

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

No es aplicable.

2.2.6. Vectores

No es aplicable.

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

Todas las especies hospedadoras susceptibles mencionadas en el apartado 2.2.1 pueden llegar a actuar como portadoras del parásito. Todos los hospedadores salmónidos podrían ser sospechosos de actuar como posibles portadores. Los hospedadores más susceptibles serán portadores de parásitos durante periodos más largos que los menos susceptibles.

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mecanismos de transmisión

Gyrodactylus salaris se ha extendido entre ríos y piscifactorías principalmente por el transporte de peces vivos y la utilización de estos para las repoblaciones. Los peces migratorios que nadan por aguas salobres también pueden hacer que el parásito se transmita entre ríos (véase también el apartado 2.3.5). Si se introduce *G. salaris* en una piscifactoría/tanque donde haya salmón del Atlántico, que es susceptible, será muy probable que todos los peces de la piscifactoría resulten infectados, en función de la distribución de la piscifactoría. Los ríos con salmón del Atlántico susceptible situados cerca de ríos infectados presentan un gran riesgo de infección si estos ríos están situados dentro del mismo sistema de agua salobre.

2.3.2. Prevalencia

La prevalencia en cepas de salmón del Atlántico susceptibles en ríos y piscifactorías alcanza prácticamente el 100% en poco tiempo. La prevalencia en cepas resistentes en río y piscifactorías no se conoce. La prevalencia de otras especies susceptibles suele ser mucho más baja y puede ser inferior al 10% (por ejemplo, en trucha arco iris de piscifactoría).

2.3.3. Distribución geográfica

La distribución de *Gyrodactylus salaris* se limita a Europa. Se ha hallado en salmón del Atlántico o trucha arco iris de piscifactoría en varios países de Europa (principalmente del norte). En la naturaleza, el parásito se ha hallado en salmónidos salvajes, principalmente en pintos de salmón del Atlántico, en ríos de Rusia, Suecia y Noruega. *Gyrodactylus salaris* es más frecuente en trucha arco iris de piscifactoría de lo que se creía, y es probable que exista en más países de lo que se supone actualmente. En 2006, se notificó *G. salaris* en piscifactorías de peces de Italia (Paladini *et al.,* 2009) y, en 2007, en piscifactorías de peces de Polonia (Rokicka *et al*., 2007) y de Macedonia (Ziętara *et al.,* 2007). En 2009, el Laboratorio de Referencia de la OIE identificó *G. salaris* en piscifactorías de peces de Rumanía. Se ha observado que Gran Bretaña e Irlanda están libres del parásito.

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

La mortalidad puede alcanzar el 100% en el salmón del Atlántico de piscifactoría si no se trata. La mortalidad en ríos de Noruega puede ser de incluso el 98%, con una media de alrededor del 85%. La mortalidad en otras especies hospedadoras susceptibles suele ser baja o pasar desapercibida.

2.3.5. Factores ambientales

Aunque *G. salaries* vive principalmente en agua dulce, se reproduce normalmente en salinidades de hasta 5-6 ppmil. La supervivencia en salinidades superiores depende de la temperatura. Así, por ejemplo, a 1,4°C *G. salaris* puede sobrevivir 240 horas, 78 horas y 42 horas a salinidades de 10 ppmil, 15 ppmil y 20 ppmil, respectivamente, mientras que a 12°C puede sobrevivir 72 horas, 24 horas y 12 horas a las mismas salinidades, respectivamente (Soleng y Bakke, 1997).

2.4. Control y prevención

2.4.1. Vacunación

No se dispone de vacunas.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

Gyrodactylus salaris es sensible a los cambios en la composición química del agua. Es sensible a las sustancias químicas más habitualmente utilizadas para el tratamiento por baño de pintos y huevos de salmón de piscifactoría (por ejemplo, agua con alta salinidad, formaldehído y compuestos que contengan cloro y yodo). Además, *G. salaris* es sensible a soluciones ácidas (pH de 5,0–6,0) de sulfato de aluminio ($[Al_2(SO_4)_3]$; AIS) (Solenget *al.,* 1999). Dado que AIS es menos tóxico para los peces que para *G. salaris,* en aguas moderadamente acidificadas esta sustancia química puede utilizarse en los intentos de erradicación del parásito de los sistemas fluviales de Noruega.

2.4.3. Inmunoestimulación

No se dispone de inmunoestimulación.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

En pruebas de laboratorio, la selección genética ha dado lugar a una prolongación de la supervivencia de la descendencia (Salte *et al.,* 2010). Sin embargo, dicha selección no se ha aplicado a poblaciones salvajes de salmón, principalmente porque la población seguiría infectada y de esta forma el parásito se extendería a más ríos.

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

La repoblación con especies resistentes de salmón del Atlántico (como la cepa del río báltico Neva) en ríos afectados no es compatible con la gestión de las estirpes existentes de salmón del Atlántico.

2.4.6. Agentes bloqueadores

No son aplicables.

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

Los huevos procedentes de piscifactorías infectadas deben desinfectarse (se han utilizado compuestos yodados).

2.4.8. Prácticas generales de manejo

Las prácticas generales de manejo recomendadas para evitar la diseminación de los agentes infectivos entre unidades de piscifactorías de peces de agua dulce son aplicables a *G. salaris.* El equipo (como redes de pesca) utilizado en una unidad no se puede utilizar en otra sin una desinfección suficiente.

3. Toma de muestras

3.1. Cómo escoger los ejemplares

En los casos en los que se toman muestras y no se sospecha de infección, debe tomarse una muestra aleatoria con un número suficiente de peces, por ejemplo de un río. En las piscifactorías, si los peces

presentan signos clínicos de infección (como los descritos en el apartado 4.1.1), deben escogerse estos peces.

3.2. Conservación de muestras para su envío

Los peces deben sacrificarse de inmediato y no debe permitirse que se sequen antes de iniciar la conservación. Deben conservarse peces enteros en etanol al 96-100% en frascos lo bastante grandes como para que quede espacio de sobra y quepa el conservante. La concentración de etanol tras la conservación no debe ser inferior al 70%. Como norma general, esta concentración se obtiene si la proporción de peces respecto al etanol no es superior a 1:9. Si la concentración es inferior, el mucus y la epidermis se pueden desintegrar y las muestras de *Gyrodactylus,* incluso conservadas, pueden empeorar. Los frascos deben tener un orificio lo bastante ancho como para al introducir o extraer los peces no haya rozamiento y se pierda así muestra de *Gyrodatylus*. Los frascos se deben guardar en posición horizontal hasta que el tejido esté fijado/conservado, para impedir que los peces se curven. Esto facilitará el examen de los peces, puesto que se les podrá dar la vuelta fácilmente con unas pinzas bajo el microscopio. Cuando termina la conservación de los peces, los frascos se pueden guardar en posición vertical.

Dado que *G. salaris* es frecuente en las aletas de salmón del Atlántico, también pueden enviarse aletas cortadas del cuerpo y guardadas en etanol como se ha descrito anteriormente. Esto es especialmente adecuado para peces más grandes y en condiciones de campo donde, por ejemplo, haya limitaciones de transporte.

3.3. Combinación de varias muestras

Se pueden agrupar muestras de un río o una piscifactoría, aunque cada pez tendrá que examinarse y analizarse también por separado. Las aletas de peces de una piscifactoría o río pueden agruparse y examinarse y analizarse también por separado, pero en este caso cada aleta no puede estar relacionada con un pez hospedador específico.

3.4. Órganos y tejidos de elección

Los peces se pueden examinar como ejemplares enteros vivos anestesiados (por ejemplo, como MS222), como ejemplares acabados de sacrificar o como ejemplares conservados. Además, pueden examinarse aletas frescas o conservadas. Se utiliza el mismo método de examen (véase el apartado 4.3.1) en todos los casos. El examen de peces vivos anestesiados es muy lento y no se recomienda.

En lugar de examinar el pez entero, pueden examinarse las aletas (mediante el método descrito en el apartado 4.3.1). Cuando se infectan pintos de salmón noruego, casi todos los peces tienen al menos un ejemplar de *G. salaris* en una de las aletas. En algunos peces, pueden hallarse *G. salaris* en el cuerpo o la cabeza, incluidas las narinas, las branquias y la cavidad bucal. La distribución de *G. salaris* en la superficie de las aletas y otras partes del pez varía en función de la especie de pez y parece variar también en función de la estirpe de salmón.

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

Los peces muertos, conservados en hielo, no son aceptables para el examen destinado a hallar *Gyrodactylus,* ni siquiera si los peces se han conservado por separado en bolsas de plástico, etc. Los parásitos mueren enseguida si no están sumergidos en agua, y dado que estos parásitos no tienen exoesqueleto, los que mueren se desintegran rápidamente. Si este tipo de peces muertos se lavan en agua, pueden hallarse ejemplares de *Gyrodactylus* en el sedimento. Sin embargo, si no se hallan ejemplares en el sedimento, no puede concluirse que los peces no estuvieran infectados.

El examen de peces fijados en formaldehído no se recomienda por motivos de seguridad del operario. Las muestras de *Gyrodactylus* fijadas en formaldehído también son muy difíciles de identificar morfológicamente y no son adecuadas para el análisis del ADN.

4. Métodos de diagnóstico

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

Normalmente no hay signos clínicos en los peces con uno o hasta unas pocas decenas de ejemplares del parásito.

En la primera fase de la enfermedad, son característicos los movimientos fugaces (los peces se rascan más la piel sobre el sustrato). Más adelante, pueden volverse grisáceos por un aumento de la producción de mucus y las aletas pueden erosionarse. Los peces enfermos están aletargados y suelen hallarse en aguas de movimiento lento.

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Los movimientos fugaces son frecuentes en los peces de piscifactoría moderada a intensamente infectados porque se rascan la piel contra el fondo o las paredes del tanque o de los estanques. Los peces intensamente infectados pueden presentar una reducción de la actividad y permanecer en zonas de baja corriente.

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

Los peces intensamente infectados pueden volverse grisáceos como consecuencia de un aumento de la mucificación, y en un estadio posterior las aletas dorsales y pectorales pueden volverse blanquecinas como consecuencia de un aumento del espesor de la epidermis (principalmente hipertrofia).

Los peces intensamente infectados pueden tener aletas erosionadas, sobre todo la dorsal, la caudal y la pectoral, debido a que el parásito se alimenta en ellas.

En peces con infección por *G. salaris* es frecuente observar infecciones fúngicas secundarias (*Saprolegnia* spp.).

4.2.2. Bioquímica clínica

No es aplicable.

4.2.3. Anatomopatología microscópica

No es aplicable.

4.2.4. Preparaciones húmedas

Pueden utilizarse raspados (preparaciones húmedas) de piel o aletas para detectar ejemplares de *Gyrodactylus* en peces con infección. En estos casos, con una alta infestación, hay cientos o miles de ejemplares de *Gyrodactylus* por toda la superficie corporal y de las aletas. Las preparaciones húmedas no suelen ser adecuadas para la identificación de *Gyrodactylus* a nivel de especie, y para el análisis morfológico o del ADN deben realizarse otras preparaciones (véase abajo). Si el número de ejemplares de *Gyrodactylus* es bajo, la probabilidad de detectar el parásito mediante raspados también será baja.

4.2.5. Frotis

No son aplicables.

4.2.6. Cortes fijados

No es aplicable.

4.2.7. Microscopía electrónica/citopatología

No son aplicables.

4.3. Métodos de detección e identificación del agente

4.3.1. Métodos directos de detección

La detección de *Gyrodactylus* y la identificación de *G. salaris* es un proceso de dos pasos. En primer lugar, se observan ejemplares del parásito mediante equipo óptico y, a continuación, se identifican los parásitos, normalmente de manera individual mediante otro equipo y otros métodos.

Para detectar *Gyrodactylus* debe utilizarse equipo óptico. En el caso de un brote sospechoso de infección por *G. salaris* en el que solo se disponga de microscopía óptica, pueden utilizarse preparaciones húmedas para detectar ejemplares de *Gyrodactylus.* No obstante, es muy aconsejable no utilizar este método en un programa de vigilancia, puesto que la especificidad y la sensibilidad son muy bajas (no se conocen los valores) y, por tanto, el número de peces examinados tendría que ser exageradamente alto.

Los peces se pueden examinar como ejemplares enteros vivos (anestesiados), acabados de sacrificar o conservados/fijados. En todos los casos se aplica el mismo método de examen (véase abajo). El examen de peces vivos anestesiados es muy lento y no se recomienda. El examen de de peces fijados con formaldehído no se recomienda por motivos de seguridad del operario. Los ejemplares de *Gyrodactylus* fijados con formaldehído también son muy difíciles de identificar y no son adecuados para el análisis del ADN. En lugar de examinar los peces enteros, pueden examinarse las aletas (mediante el método descrito abajo). Cuando hay muchos pintos de salmón susceptibles infestados, casi todos los peces tienen al menos un *G. salaris* en una de las aletas. En algunos peces, pueden observarse ejemplares de *G. salaris* por el cuerpo o la cabeza, incluidas las narinas, las branquias y la cavidad bucal. La distribución de *G. salaris* sobre las aletas y otras partes del pez varía en función de la especie de pez y las distribuciones también parecen variar en función de la estirpe de salmón.

Los peces vivos anestesiados, aletas recién cortadas o peces o aletas conservados en etanol deben examinarse mediante microscopio de disección binocular con buena iluminación. Los peces deben colocarse en una caja y cubrirse por completo con agua dulce. Los peces conservados también pueden examinarse en etanol. Los parásitos vivos son más fáciles de detectar por sus movimientos, de modo que debe evitarse la perturbadora refracción de la luz sobre la piel de los peces. Los ejemplares vivos de *Gyrodactylus* son incoloros, mientras que los ejemplares de *Gyrodactylus* conservados en etanol suelen ser solo ligeramente opacos. Si el microscopio de disección está iluminado desde arriba, el fondo de la platina del microscopio debe ser negro. Esto aumentará el contraste y los parásitos se detectarán con mayor facilidad. Toda la superficie del pez, incluidas las branquias y la cavidad bucal, normalmente de menos de 10 cm, también pueden estudiarse utilizando iluminación desde la parte baja de la platina del microscopio. De esta forma, normalmente es más fácil observar ejemplares de *Gyrodactylus* sobre las aletas.

Si el examen se lleva a cabo en etanol, debe plantearse la utilización de guantes. A efectos de protección del operario, el microscopio de disección debe colocarse sobre una repisa de succión con una salida de gases hacia abajo para evitar la inhalación de conservante evaporado.

4.3.1.1. Métodos microscópicos

La identificación de *Gyrodactylus* a nivel de especie se basa en la morfología y la morfometría de las anclas de los ganchos marginales (hamuli) y las barras del opistaptor (el órgano de fijación). Una buena preparación de los ejemplares es un prerrequisito para la identificación a nivel de especie.

Cuando se requiere una morfometría de alta resolución para establecer un diagnóstico morfométrico fiable es preferible una digestión del tejido blando, dejando solo las partes duras. El tejido blando se puede digerir en una solución (de aproximadamente 1 µl) de Tris 75 mM, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 10 mM, un 5% de SDS (dodecilsulfato sódico) y 100 mg ml^{-1} de proteinasa K, pH 8,0. Tras añadir la solución de digestión, la reacción debe observarse al microscopio hasta que termine y a continuación terminarse añadiendo una solución de parada (glicerol y formalina neutra tamponada al 10% a razón de 1:1). El procedimiento para la digestión lo describen en detalle Harris *et al.,* 1999. La identificación de *G. salaris* debe realizarse según las siguientes referencias bibliográficas: Cunningham *et al.,* 2001; Malmberg *et al.,* 1957; 1970; McHugh *et al*., 2000; Olstad *et al*., 2007b; Shinn *et al.,* 2004.

El tamaño de las partes duras del opistaptor de *Gyrodactylus* depende en gran medida de, por ejemplo, la temperatura, mientras que la forma es más constante (Mo, 1991a; 1991b; 1991c). Por tanto, la capacidad de las mediciones lineales de capturar la morfología podría no siempre ser suficiente para establecer un diagnóstico fiable (Olstad *et al*., 2007b).

Gyrodactylus salaris es morfológicamente similar al *G. teuchis* de la trucha marina, del salmón del Atlántico y de la trucha arco iris, y al *G. thymalli* del tímalo (Figura 1). Los morfólogos expertos son capaces de reconocer cada una de estas especies en función de la forma de la hoz del gancho marginal. *Gyrodactylus teuchis* tiene una hoja de la hoz más larga y de curva más constante, mientras que *G. thymalli* tiene un pequeño ángulo en el tallo de la hoz (Cunningham *et al.,* 2001; McHugh *et al*., 2000; Shinn *et al.,* 2004).

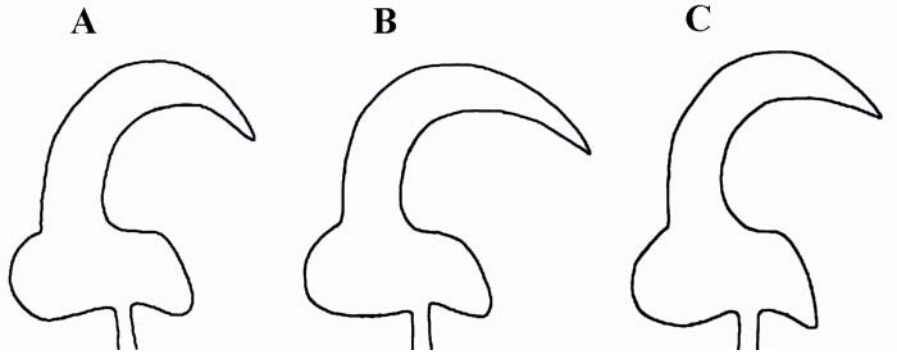

Figura 1. *Ganchos marginales de* (*A*) Gyrodactylus salaris, (*B*) G. teuchis *y* (*C*) G. thymalli. *Dibujos modificados por Cunningham* et al.*, 2001.*

4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

No son aplicables.

4.3.1.1.2. Frotis

No son aplicables.

4.3.1.1.3. Cortes fijados

No son aplicables.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

No son aplicables.

4.3.1.2.2. Métodos de detección de antígeno basados en anticuerpos

No son aplicables.

4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

Preparación de muestras

El ADN molde se debe preparar a partir de ejemplares vivos/frescos o bien conservados en etanol utilizando un protocolo adecuado de preparación de ADN. Puede utilizarse un kit de extracción de ADN siguiendo las recomendaciones del fabricante.

4.3.1.2.3.1. Análisis de la región de separación interna transcrita del gen del ARN ribosómico

i) Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la región de separación interna transcrita (ITS)

Para la amplificación de un producto de 1300 pares de bases de la región ITS, pueden utilizarse los cebadores como el 5'-TTT-CCG-TAG-GTG-AAC-CT-3' y 5'-TCC-TCC-GCT-TAG-TGA-TA-3'. Las condiciones de ciclado para la PCR son las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos; 30 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 50°C durante 1 minuto, 72°C durante 2 minutos; extensión final a 72°C durante 7 minutos (Cunningham, 1997). Si se analiza material parcialmente degradado, los espaciadores ITS1 e ITS2 pueden amplificarse en dos reacciones independientes utilizando los cebadores y las condiciones de la PCR descritos por Matejusova*et al*. (2001).

ii) Secuenciación de la región ITS y análisis de la secuencia

Deben secuenciarse fragmentos de ITS amplificados preparados como en el apartado 4.3.1.2.3.1.i anterior y secuenciarse, y las secuencias deben someterse a una búsqueda BLAST en el GenBank/EMBL para establecer la identidad con secuencias conocidas. Además de los cebadores para la PCR, deben utilizarse al menos dos cebadores internos; 5'-ATT-TGC-GTT-CGA-GAG-ACC-G y 5'-TGG-TGG-ATC-ACT-CGG-CTC-A (Zięłara y Lumme, 2003). En el GenBank/EMBL se dispone de varias secuencias de otras especies que infectan a los salmónidos, como *G. derjavini*, *G. derjavinoides*, *G. truttae*, *G. teuchis* y *G. thymalli*.

Gyrodactylus salaris y *G. thymalli* no se pueden diferenciar por este método, pero las secuencias de ITS permiten diferenciar *G. salaris* y *G. thymalli* de todas las demás especies conocidas

Nota: En el GenBank/EMBL se dispone de varias secuencias de *G. salaris* y de *G. thymalli*, todas las cuales difieren en solo unas pocas mutaciones puntuales, pero no contienen ninguna mutación que permita diferenciar *G. salaris* de *G. thymalli*.

4.3.1.2.3.2. Análisis del gen de la citocromo oxidasa I mitocondrial

i) Amplificación por PCR del gen de la citocromo oxidasa I mitocondrial

Para amplificar el gen se pueden usar los cebadores 5'-TAA-TCG-GCG-GGT-TCG-GTA-A-3' y 5'-GAA-CCA-TGT-ATC-GTG-TAG-CA-3') (Meinilä *et al.,* 2002). Las condiciones de ciclado para la PCR son las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos; 35 ciclos de 95°C durante 1 minuto, 50°C durante 1 minuto, 72°C durante 2 minutos; extensión final a 72°C durante 7 minutos. En la bibliografía pueden hallarse otros conjuntos de cebadores para la amplificación de la CO1: 4, Meinilä *et al.,* 2002; 2004.

ii) Secuenciación del CO1 y análisis de la secuencia

Deben secuenciarse fragmentos del CO1 amplificados preparados como se describe anteriormente, y compararse con otras secuencias mediante una búsqueda BLAST en el GenBank/EMBL. Además de los cebadores para la PCR, pueden utilizarse al menos dos cebadores internos, como 5'-CCA-AAG-AAC-CAA-AAT-AAG-TGT-TG-3') y 5'-TGT-CYC-TAC-CAG-TGC-TAG-CCG-CTG-G-3' (4).

Si la secuencia obtenida no tiene un 100% de coincidencia en el GenBank/EMBL, debe llevarse a cabo un análisis filogenético para establecer las relaciones con otras secuencias disponibles. Este método permite distinguir diferentes clados de *G. salaris* y *G. thymalli*.

NOTA: las secuencias del gen CO1 no permiten diferenciar claramente entre *G. salaris* y *G. thymalli* pero se pueden utilizar para asignar muestras a un clado. Los clados de *G. salaris* y de *G. thymalli* en general se asocian con claridad a preferencias por hospedador y/o a la distribución geográfica de los parásitos, con algunas excepciones. El CO1 no puede aplicarse como marcador de patogenicidad.

Hay que tener en cuenta que algunos investigadores han optado por enviar todas sus secuencias, tanto de salmón del Atlántico como de tímalo, como *G. salaris*, lo cual causa confusión cuando se comparan secuencias (tanto de la ITS como del CO1) con las del GenBank/EMBL al realizar una búsqueda BLAST. Así pues, siempre debe comprobarse la identidad del hospedador de las secuencias del GenBank/EMBL.

4.3.1.2.4. Purificación del agente

No es aplicable.

4.3.2. Métodos serológicos

No son aplicables.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

No es aplicable.

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

Los métodos de diagnóstico/detección para declarar la ausencia son los mismos que los descritos en el apartado 4.3.

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

La observación de ejemplares de *Gyrodactylus* en salmón del Atlántico o trucha arco iris (u otros hospedadores susceptibles) en raspados de piel examinados al microscopio óptico o en aletas o piel examinadas al microscopio estereoscópico.

7.2. Definición de caso confirmado

El método de elección es una identificación molecular de uno o más ejemplares de *Gyrodactylus* como *G. salaris* (o *G. thymalli*) secuenciando su ITS, seguida de una secuenciación y análisis filogenético de CO1 para asignar la secuencia a la especie conocida más cercana. Los morfólogos expertos pueden identificar morfológicamente ejemplares de *Gyrodactylus* como *G. salaris* en base a estructuras del órgano de fijación. Sin embargo, el diagnóstico morfológico debe confirmarse mediante métodos moleculares. Se recomienda una combinación de métodos morfológicos y moleculares como la descrita en este capítulo.

8. Bibliografía

BAKKE T.A., HARRIS P.D. & CABLE J. (2002). Host specificity dynamics: observations on gyrodactylid monogeneans. *Int. J. Parasitol.,* **32**, 281–308.

BAKKE T.A., HARRIS P.D., HANSEN H., CABLE J. & HANSEN L. P. (2004). Susceptibility of Baltic and East Atlantic salmon *Salmo salar* stocks to *Gyrodactylus salaris* (Monogenea). *Dis. Aquat. Org.,* **58**, 171–177.

CUNNINGHAM C.O. (1997). Species variation within the internal transcribed spacer (ITS) region of *Gyrodactylus* (Monogenea: Gyrodactylidae) ribosomal RNA genes. *J. Parasitol*., **83**, 215–219.

CUNNINGHAM C.O., MO T.A., COLLINS C.M., BUCHMANN K., THIERY R., BLANC G. & LAUTRAITE A. (2001). Redescription of *Gyrodactylus teuchis* Lautraite, Blanc, Thiery, Daniel & Vigneulle, 1999 (Monogenea: Gyrodactylidae), a species identified by ribosomal RNA sequence. *Syst. Parasitol*., **48**, 141–150.

HANSEN H., BACHMANN L. & BAKKE T.A. (2003). Mitochondrial DNA variation of *Gyrodactylus* spp. (Monogenea, Gyrodactylidae) populations infecting Atlantic salmon, grayling, and rainbow trout in Norway and Sweden. *Int. J. Parasitol.,* **33**, 1471–1478.

HANSEN H., BAKKE T.A. & BACHMANN L. (2007a). DNA taxonomy and barcoding of monogenean parasites: lessons from *Gyrodactylus*. *Trends Parasitol.*, **23** (8), 363-367.

HANSEN H., BAKKE T.A. & BACHMANN L. (2007b). Mitochondrial haplotype diversity of *Gyrodactylus thymalli* (Platyhelminthes; Monogenea): extended geographic sampling in United Kingdom, Poland, and Norway reveals further lineages. *Parasitol. Res.,* **100**, 1389–1394.

HARRIS P.D., CABLE J., TINSLEY R.C. & LAZARUS C.M. (1999). Combined ribosomal DNA and morphological analysis of individual gyrodactylid monogeneans.*J. Parasitol.,* **85**, 188–191.

JENSEN A.J. & JOHNSEN B.O. (1992).Site Specificity of *Gyrodactylus salaris*Malmberg, 1957 (Monogenea) on Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) in the River Lakselva, northern Norway. *Can. J. Zool.*, **41**, 264–267.

JØRGENSEN T.R., LARSEN T.B., JØRGENSEN L.G., BRESCIANI J., KANIA P. & BUCHMANN K. (2007). Characterisation of a low pathogenic strain of *Gyrodactylus salaris* from rainbow trout. *Dis. Aquat. Org.,* **73**, 235–244.

LINDENSTRØM T., COLLINS C.M., BRESCIANI J., CUNNINGHAM C.O. & BUCHMANN K. (2003). Characterization of a *Gyrodactylus salaris* variant: infection biology, morphology and molecular genetics. *Parasitology,* **127**, 165-177.

MALMBERG G. (1957). Om förekomsten av *Gyrodactylus* på svenska fiskar. *Skr. söd.Sver. Fisk För.,* (*Årsskr.*) 1956, 19–76. (In Swedish, species descriptions and summary in English).

MALMBERG G. (1970). The excretory systems and the marginal hooks as a basis for the systematics of *Gyrodactylus* (Trematoda, Monogenea).*Ark. Zool.* [*Ser. 2*], **23**, 1–235.

MCHUGH E.S., SHINN A.P. & KAY J.W. (2000). Discrimination of the notifiable pathogen *Gyrodactylus salaris* from *G. thymalli* (Monogenea) using statistical classifiers applied to morphometric data. *Parasitology,* **121**, 315–323.

MEINILÄ M., KUUSELA J., ZIĘTARA M. &LUMME J. (2002) Primers for amplifying approximately 820 bp of highly polymorphic mitochondrial COI gene of *Gyrodactylus salaris. Hereditas,* **137**, 72–74.

MEINILÄ M., KUUSELA J., ZIĘTARA M.S. & LUMME J. (2004). Initial steps of speciation by geographic isolation and host switch in salmonid pathogen *Gyrodactylus salaris* (Monogenea: Gyrodactylidae). *Int. J. Parasitol.,* **34**, 515–526.

MO T.A. (1991a). Seasonal variations of opisthaptoral hard parts of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Monogenea: Gyrodactylidae) on parr of Atlantic salmon *Salmo salar* L. in the River Batnfjordselva, Norway. *Syst. Parasitol.*, **19**, 231–240.

MO T.A. (1991b). Variations of opisthaptoral hard parts of *Gyrodactylussalaris*Malmberg, 1957 (Monogenea: Gyrodactylidae) on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) in a fish farm, with comments on the spreading of the parasite in south-eastern Norway. *Syst. Parasitol*., **20**, 1–9.

MO T.A. (1991c). Variations of opisthaptoral hard parts of *Gyrodactylussalaris*Malmberg, 1957 (Monogenea: Gyrodactylidae) on parr of Atlantic salmon *Salmo salar* L. in laboratory experiments. *Syst. Parasitol*., **20**, 11–19.

MO T.A. (1992). Seasonal variations in the prevalence and infestation intensity of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Monogenea: Gyrodactylidae) on Atlantic salmon parr, *Salmo salar* L., in the River Batnfjordselva, Norway. *J. Fish Biol.*, **41**, 697–707.

OLSTAD K., CABLE J., ROBERTSEN G. & BAKKE T. A. (2006). Unpredicted transmission strategy of *Gyrodactylus salaris* (Monogenea: Gyrodactylidae): survival and infectivity of parasites on dead hosts. *Parasitology,* **133**, 33–41.

OLSTAD K., ROBERTSEN G., BACHMANN L. & BAKKE T.A. (2007A).Variation in host preference within *Gyrodactylus salaris* (Monogenea): an experimental approach. *Parasitology,* **134**, 589–597.

OLSTAD K., SHINN A.P., BACHMANN L. & BAKKE T.A. (2007B).Host-based identification is not supported by morphometrics in natural populations of *Gyrodactylussalaris* and G. *thymalli* (Platyhelminthes, Monogenea). *Parasitology,* **134**, 2041–2052.

PALADINI G., GUSTINELLI A., FIORAVANTI M.L., HANSEN H. & SHINN A.P. (2009).The first report of *Gyrodactylus salaris*Malmberg 1957 (Platyhelminthes, Monogenea) on Italian cultured stocks of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*Walbaum).*Vet. Parasitol*., **165** (3–4), 290–297

POLÉO A.B.S., SCHJOLDEN J., HANSEN H., BAKKE T.A., MO T.A., ROSSELAND B.O. & LYDERSEN E. (2004). The effect of various metals on *Gyrodactylus salaris* (Platyhelminthes, Monogenea) infections in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Parasitology,* **128**, 169–177.

ROBERTSEN G., HANSEN H., BACHMANN L. & BAKKE T. A. (2007). Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) is a suitable host for *Gyrodactylus salaris* (Monogenea, Gyrodactylidae) in Norway. *Parasitology,* **134**, 257–267.

ROKICKA M., LUMME J. &ZIĘTARA M. (2007). Identification of *Gyrodactylus* ectoparasites in Polish salmonid farms by PCR-RFLP of the nuclear ITS segment of ribosomal DNA (Monogenea, Gyrodactylidae). *Acta Parasitologica,* **52**, 185–195.

SALTE R., BENTSEN H.B., MOEN T., TRIPATHY S., BAKKE T.A., ØDEGÅRD J., OMHOLT S. HANSEN L.P. (2010). Prospects for a genetic mangement strategy to control *Gyrodactylus salaris* infection in wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) stocks.*Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **67**, 121–129.

SHINN A.P., HANSEN H., OLSTAD K., BACHMANN L. & BAKKE T.A. (2004). The use of morphometric characters to discriminate specimens of laboratory-reared and wild populations of *Gyrodactylus salaris* and *G. thymalli* (Monogenea). *Folia Parasitol.,* **51**, 239–252.

SOLENG A. & BAKKE T.A. (1997). Salinity tolerance of *Gyrodactylus salaris* (Platyhelminthes, Monogenea): laboratory studies. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **55**, 1837–1845.

SOLENG A., POLEO A.B.S., ALSTAD N.E.W. & BAKKE T. A. (1999). Aqueous aluminium eliminates *Gyrodactylus salaris* (Platyhelminthes, Monogenea) infections in Atlantic salmon. *Parasitology,* **119**, 19–25.

ZIĘTARA M.S. & LUMME J. (2003). The crossroads of molecular, typological and biological species concepts: two new species of *Gyrodactylus*Nordmann, 1832 (Monogenea: Gyrodactylidae). *Syst. Parasitol.*, **55**, 39–52

ZIĘTARA M.S., ROKICKA, M., STOJANOVSKI S., SKORKOWSKI E.F. & LUMME J. (2007). Alien mitochondrial DNA in variant clones of *Gyrodactylus salaris* indicates a complex hybrid history in salmonid farms. 7th International Symposium on Fish Parasites, Viterbo, Italy. *Parassitologia*, **49**, 119.

*
* *

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

CAPÍTULO 2.3.4

NECROSIS HEMATOPOYÉTICA INFECCIOSA

1. Ámbito de aplicación

La necrosis hematopoyética infecciosa (NHI) es una enfermedad vírica que afecta a la mayoría de especies de salmónidos criadas en agua dulce o marina. Está causada por el rabdovirus denominado virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (VNHI), y las principales consecuencias clínicas y económicas tienen lugar en piscifactorías que crían trucha arco iris, donde los brotes pueden dar lugar a mortalidades muy altas. Sin embargo, tanto el salmón del Pacífico como el de Atlántico pueden resultar gravemente afectados. A efectos de este capítulo, la NHI se considera una infección por el VNHI.

2. Información sobre la enfermedad

Bootland y Leong (1999) y Wolf (1988) han publicado revisiones detalladas sobre la enfermedad.

2.1. Factores del agente

2.1.1. El agente patógeno, cepas del agente

El rabdovirus de los peces, el VNHI, tiene un virión con forma de bala que contiene un genoma de ARN monocatenario con polaridad negativa, no segmentado, de aproximadamente 11.000 nucleótidos que codifica seis proteínas en el siguiente orden: una nucleoproteína (N), una fosfoproteína (P), una proteína de matriz (M), una glucoproteína (G), una proteína no virión (NV), y una polimerasa (L). La presencia del gen único NV y la homología de secuencia con otros ciertos rabdovirus de peces, tales como el virus de la septicemia hemorrágica vírica, ha originado la creación del género *Novirhabdovirus* en la familia Rhabdoviridae, con el VNHI como especie tipo. La cepa tipo del VNHI es la del *Western Regional Aquaculture Center* (WRAC) disponible en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC VR-1392). El número de acceso en el GenBank para la secuencia genómica completa de la cepa WRAC es L40883 (Morzunov*et al*., 1995; Winton y Einer-Jensen, 2002).

Se ha utilizado el análisis de la secuencia para comparar cepas del VNHI de Norteamérica, Europa y Asia (Emmenegger *et al.,* 2000; Enzmann *et al.,* 2005; 2010; Johansson *et al*., 2009; Kim *et al.,* 2007; Kolodziejek*et al.,* 2008; Kurath *et al.,* 2003; Nishizawa *et al.,* 2006; Troyer y Kurath, 2003). Dentro de la variedad natural histórica de los virus de la parte occidental de Norteamérica, la mayoría de cepas del VNHI halladas en el salmón del Pacífico forman dos genogrupos que están relacionados con la ubicación geográfica y no con el año de aislamiento ni la especie hospedadora. Las cepas de estos dos genogrupos presentan un nivel relativamente bajo de diversidad de nucleótidos, lo cual sugiere estasis evolutiva o una relación hospedador-agente patógeno más antigua. Por el contrario, las cepas de OHNV halladas en trucha arco iris de piscifactoría en EE.UU. forman un tercer genogrupo con más diversidad genética y un patrón evolutivo que indica que actualmente se está adaptando a un nuevo hospedador o condiciones de cría. Las cepas de trucha arco iris de piscifactoría de Europa y Asia parecen proceder de Norteamérica, pero presentan una divergencia mayor e independiente dentro de sus nuevos límites geográficos (Enzmann *et al.,* 2010; Kim *et al.,* 2007; Nishizawa *et al.,* 2006).

Sobre la base de los estudios antigénicos llevados a cabo con antisueros neutralizantes policlonales de conejo, las cepas del VNHI forman un único serogrupo (Engelking *et al.,* 1991). Sin embargo, los anticuerpos monoclonales de ratón han revelado varios epítopos neutralizantes en la glucoproteína (*et al.,* 1994; Ristow y Arnzen De Avila, 1991; Winton *et al.,* 1988), así como la existencia de un grupo no neutralizante de epítopos ligados a la nucleoproteína (Ristow y Arnzen, 1989). No obstante, parece haber poca o ninguna correlación entre genotipos y serotipos (Johansson *et al.,* 2009). Se han registrado variaciones en la virulencia y la preferencia por hospedador en cepas de VNHI durante casos de enfermedad naturales y en infecciones experimentales (Garver *et al.,* 2006; LaPatra *et al.,* 1993a).

2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

El VNHI es lábil al calor, a la acidez y al éter. El virus sobrevive en agua dulce al menos 1 mes a bajas temperaturas, sobre todo en presencia de materia orgánica.

2.1.3. Estabilidad del agente (métodos eficaces de inactivación)

El VNHI se inactiva fácilmente en presencia de los desinfectantes de uso habitual y por desecación (Wolf, 1988).

2.1.4. Ciclo de vida

Los reservorios del VNHI son peces infectados clínicamente y portadores manifiestos entre peces de piscifactoría, asilvestrados o salvajes. El virus se excreta por vía urinaria, líquidos sexuales y mucus externo, mientras que el riñón, el bazo y otros órganos internos son los lugares en los que el virus es más abundante durante el curso de una infección manifiesta (Bootland y Leong, 1999; Wolf, 1988).

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Los principales hospedadores del VNHI son miembros de la familia Salmoniade. Las especies que se ha observado que se infectan de forma natural con el VNHI son: la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), el salmón real (*O. tshawytscha*), el salmón rojo (*O. nerka*), el salmón keta (*O. keta*), el amago (*O. rhodurus*), el salmón japonés (*O. masou*), el salmón plateado (*O. kisutch*) y también el salmón del Atlántico (*Salmo salar*). En ocasiones se han observado otros salmónidos infectados en la naturaleza o que presentan susceptibilidad en infecciones naturales, como la trucha común (*Salmo trutta*), y la trucha de garganta cortada (*O. clarki*), algunas truchas lacustres (*Salvelinus namaycush, S. alpinus, S. fontinalis,* y *S. leucomaenis*), el ayu (*Plecoglossus altivelis*) y especies no salmónidas, como la anguila (*Anguilla anguilla*), el arenque (*Clupea pallasi*), el bacalao (*Gadus morhua*), el esturión (*Acipenser transmontanus*), el lucio (*Esox lucius*), la mojarra brillosa (*Cymatogaster aggregata*) y el tube-snout (*Aulorhychus flavidus*) (Bootlandy Leong, 1999; European Food Safety Authority, 2008; Wolf, 1988).

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

La NHI tiene lugar en varias especies de salmónidos, y las larvas constituyen el estadio más susceptible. Los peces más viejos suelen ser más resistentes a la enfermedad clínica, pero se ha observado una gran variabilidad de la susceptibilidad al VNHI entre ejemplares. Como ocurre con el virus de la septicemia hemorrágica vírica, un buen estado sanitario de los peces parece disminuir la susceptibilidad a la NHI manifiesta, mientras que las coinfecciones con enfermedades bacterianas (como la enfermedad bacteriana del agua fría), la manipulación y otros factores estresantes pueden hacer que infecciones subclínicas lleguen a ser manifiestas. Los peces son cada vez más resistentes a la infección con la edad hasta el desove, momento en el que, una vez más, se vuelven muy susceptibles y pueden excretar grandes cantidades de virus en los productos sexuales. Los supervivientes de la NHI presentan una fuertes inmunidad protectora con la síntesis de anticuerpos circulantes contra el virus (LaPatra *et al.,* 1993b).

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

El VNHI presenta un claro perfil filogeográfico (Enzmann *et al.,* 2010; Kurath *et al.,* 2003; Nishizawa *et al.,* 2006) que refleja la susceptibilidad de la especie hospedadora de la que el virus se ha aislado con mayor frecuencia en distintas zonas geográficas (por ejemplo, el salmón rojo en el noreste del Pacífico – genogrupo U; el salmón real en California, EE.UU. – genogrupo L; y la trucha arco iris en Europea, Asia y Idazo, EE.UU. – genogrupos E, J y M, respectivamente).

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

Se supone que el virus entra por las branquias y las bases de las aletas, mientras que el riñón, el bazo y otros órganos internos son los lugares en los que el virus es más abundante durante el curso de la infección manifiesta (Bootland y Leong, 1999; Wolf, 1988).

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

Históricamente, la distribución geográfica de la NHI se ha limitado a la parte occidental de Norteamérica, pero la enfermedad se ha extendido a Europa y Asia mediante la importación de peces y huevos infectados. Una vez el VNHI se introduce en una población de piscifactoría, la enfermedad puede establecerse en las especies susceptibles de peces salvajes de las cuencas receptoras. El periodo durante el cual un pez está infectado por el VNHI depende de la temperatura; sin embargo, a diferencia del virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI) o el virus del bagre de canal (VBC), a temperaturas normales parece ser muy infrecuente la aparición de portadores del VNHI de por vida.

2.2.6. Vectores

La transmisión horizontal del VNHI suele tener lugar por exposición directa, pero se ha propuesto que en ciertos casos puedan intervenir vectores invertebrados (Bootland y Leong, 1999).

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

El VNHI es endémico en muchas poblaciones de salmónidos de vida libre. Se ha propuesto un reservorio marino, pero no está confirmado.

2.3. Patrón de la enfermedad

La infección por el VNHI a menudo conlleva mortalidad debida a la perturbación del equilibrio osmótico, y tiene lugar en un contexto clínico de edema y hemorragia. Los signos clínicos se deben a la multiplicación del virus en células endoteliales de capilares sanguíneos, tejidos hematopoyéticos y células del riñón.

2.3.1. Mecanismos de transmisión

La transmisión del VNHI entre peces es principalmente horizontal y los peces juveniles infectados excretan altos niveles del virus, pero se han registrado casos de transmisión vertical o asociada a los huevos. Aunque la transmisión asociada a los huevos ha disminuido mucho debido a la práctica, actualmente habitual, de desinfectar la superficie de los huevos con una solución de iodóforo, es el único mecanismo que explica la aparición de NHI en nuevos lugares geográficos entre alevines que salen de huevos que se han incubado y han eclosionado en aguas libres del virus (Winton, 1991).

2.3.2. Prevalencia

El VNHI es endémico y muy prevalente en poblaciones de salmónidos de vida libre de gran parte de su ámbito histórico, a lo largo de la costa oeste de Norteamérica. El virus también se ha establecido con alta prevalencia de infección en regiones importantes de cría de trucha de Norteamérica, Europa y Asia, donde el VNHI se ha introducido por los desplazamientos de peces o huevos infectados.

2.3.3. Distribución geográfica

El VNHI se ha detectado en Norteamérica, Asia y Europa, pero no en el Hemisferio Sur. Los países que han notificado casos confirmados o sospechosos de NHI a la OIE son los siguientes: Austria, Bélgica, Canadá, China, Croacia, República Checa, Francia, Alemania, Irán, Italia, Japón, Corea, Países Bajos, Polonia, Rusia, Eslovenia, España, Suiza y EE.UU. Se han notificado infecciones y enfermedad manifiesta en peces criados tanto en agua dulce como marina.

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

En función de la especie de pez, de las condiciones de cría, de la temperatura y, hasta cierto punto, de la cepa vírica, los brotes de NHI pueden oscilar entre explosivos y crónicos. Las pérdidas en brotes agudos supondrán un alto porcentaje de la población por día y la mortalidad acumulada puede alcanzar el 90-95% o más (Bootland y Leong, 1999). En los casos crónicos, las pérdidas se prolongan y en el estanque pueden observarse peces en distintos estadios de la enfermedad.

2.3.5. Factores ambientales

El factor ambiental que más afecta al avance de la NHI es la temperatura del agua. En pruebas experimentales se ha observado que el VNHI puede producir mortalidad entre los 3 y los 18 °C (Bootland y Leong, 1999); sin embargo, en condiciones naturales la enfermedad clínica suele tener lugar entre los 8 y los 15°C.

2.4. Control y prevención

Los métodos de control de la NHI actualmente se basan en evitar la exposición al virus mediante la implementación de políticas de control estricto y buenas prácticas de higiene (Winton, 1991). La profunda desinfección de huevos fecundados, la utilización de suministros de agua libre del virus para la incubación y la cría, y la utilización de instalaciones con medidas de bioseguridad establecidas son fundamentales para prevenir la NHI en cualquier piscifactoría.

2.4.1. Vacunación

Las vacunas experimentales para proteger a los salmónidos de la NHI han sido objeto de investigación durante más de 40 años, y se han obtenido resultados esperanzadores tanto en pruebas de laboratorio como de campo cuando se han administrado mediante inmersión o inyección (Kurath, 2008; Winton, 1991; Winton, 1997). Para la utilización comercial en la acuicultura de red de salmón del Atlántico en la costa oeste de Norteamérica, se han autorizado vacunas tanto autógenas como inactivadas, así como

una vacuna de ADN, en cuyo sistema estas vacunas pueden administrarse económicamente mediante inyección. No obstante, todavía no se han autorizado vacunas contra el VNHI en otros países en los que la aplicación de vacunas a millones de peces más pequeños requerirá más investigación sobre nuevos métodos de administración masiva.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

Aunque se han estudiado opciones de tratamiento con sustancias químicas para el control del VNHI, no se ha hallado utilización comercial en acuicultura contra el VNHI (Winton, 1991).

2.4.3. Inmunoestimulación

Los inmunoestimulantes constituyen un campo activo de investigación, pero no se ha hallado utilidad comercial en la acuicultura contra el VNHI.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

Pruebas experimentales de híbridos triploides o inter-especie han dado resultados prometedores (Barroso*et al*., 2008; Winton, 1991) y la base genética de la resistencia al VNHI ha constituido un campo activo de investigación reciente (Miller *et al*., 2004; Purcell *et al*., 2010)..

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

En zonas endémicas, se han utilizado especies menos susceptibles para reducir el impacto del INHV en la acuicultura.

2.4.6. Agentes bloqueantes

Se han identificado componentes naturales de microbios acuáticos que tienen actividad antivírica, aunque no se ha encontrado utilidad comercial en la acuicultura contra el VNHI (Winton, 1991).

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

La desinfección de huevos es un método muy eficaz para bloquear la transmisión del VNHI asociada a los huevos en contextos de acuicultura (Bovo*et al.*, 2005). Es un método muy utilizado en zonas donde el virus es endémico.

2.4.8. Prácticas generales de manejo

Se ha observado que, además de la desinfección de huevos, la utilización de un suministro de agua libre del virus es un factor crucial en la gestión del VNHI en zonas endémicas. Algunos de los métodos consisten en utilizar pozos o arroyos sin peces ni otras fuentes del VNHI, así como la desinfección de fuentes de agua superficiales con luz UV u ozono (Winton, 1991).

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

Las inspecciones clínicas se llevan mejor a cabo durante un periodo en que la temperatura del agua esté por debajo de los 14°C. Todas las unidades de producción (estanques, taques, jaulas de red, etc.) deben inspeccionarse para determinar si contienen peces muertos, débiles o que presenten comportamientos anómalos. Debe prestarse especial atención a la zona de salida de agua, donde tienden a acumularse peces débiles.

En las piscifactorías con salmónidos, si hay trucha arco iris solo se escogen peces de esta especie. Si no hay truchas arco iris, deben escogerse peces de otras especies susceptibles al VNHI, según la lista del apartado 2.2.1. Deben escogerse especies susceptibles proporcionalmente, o bien siguiendo criterios basados en el riesgo con el fin de escoger lotes o poblaciones con antecedentes de mortalidades anómalas o posibles episodios de exposición (por ejemplo, de aguas superficiales no tratadas, poblaciones salvajes o repoblaciones con poblaciones de estado de riesgo desconocido).

Si para la producción de peces se utiliza más de un origen de agua, deben tomarse ejemplares de todos ellos. Si hay peces débiles, que presenten un comportamiento anómalo o que acaben de morir (sin descomposición), este tipo de peces deben escogerse. Si no hay este tipo de peces, los peces escogidos deben presentar un aspecto normal y sano, de modo que todas las partes de la piscifactoría, así como todas las categorías de edad estén representadas proporcionalmente en la muestra.

3.2. Conservación de muestras para su envío

Antes del envío o transferencia al laboratorio, las partes de los órganos que deban examinarse deben separarse del cuerpo del pez mediante instrumental de disección estéril e introducirse en tubos de plástico estériles que contengan medio de transporte, es decir, medio de cultivo celular con un 10% de suero fetal bovino (FBS) y antibióticos. Se recomienda añadir 200 Unidades Internacionales (UI) de penicilina, 200 µg de estreptomicina y 200 µg de kanamicina por ml, aunque también pueden utilizarse otros antibióticos de probada eficacia.

3.3. Combinación de varias muestras

Puede introducirse líquido ovárico o bien trozos de órganos de un máximo de diez peces en un tubo estéril que contenga al menos 4 ml de medio de transporte, y esto constituirá una muestra compuesta. El tejido de cada muestra debe pesar al menos 0,5 g. Los tubos deben situarse en recipientes aislados (como cajas de poliestireno de pared gruesa) junto con suficiente hielo o "bloques de congelador" para garantizar que las muestras se mantengan refrigeradas durante el transporte al laboratorio. Debe evitarse la congelación. La temperatura de una muestra durante el transporte nunca debe superar los 10°C y debe quedar hielo en la caja de transporte en el momento de la recepción, o bien uno o más bloques de hielo deben seguir parcial o totalmente congelados. Debe iniciarse el examen virológico 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 72 horas después de la obtención de las muestras, siempre que el material a examinar esté protegido por medio de transporte y que se hayan cumplido los requisitos de temperatura durante el transporte.

Pueden enviarse peces enteros al laboratorio si pueden cumplirse los requisitos de temperatura durante el transporte. Los peces enteros se pueden envolver en papel con capacidad absorbente y deben enviarse en una bolsa de plástico, refrigerados como se ha explicado anteriormente. También pueden enviarse peces vivos. Todo el embalaje y etiquetado deben realizarse de acuerdo con las actuales normas nacionales e internacionales de transporte, según corresponda.

3.4. Órganos y tejidos de elección

El tejido óptimo para el examen es el bazo, el riñón anterior y el corazón o el encéfalo. En algunos casos, pueden examinarse el líquido ovárico y el espermático.

En caso de alevines pequeños, pueden desmenuzarse peces enteros de menos de 4 cm de longitud con tijeras estériles o un bisturí tras eliminar la parte del cuerpo situada detrás de la cloaca. Si una muestra consiste en un pez entero con una longitud de entre 4 y 6 cm, deben extraerse las vísceras, incluido el riñón. Si una muestra consiste en un pez entero de menos de 4 cm de longitud, debe trocearse finamente con tijeras o una hoja de bisturí estériles, tras retirar la parte del cuerpo situada por detrás de la apertura del intestino al exterior. Si una muestra consiste en un pez entero con una longitud corporal de entre 4 y 6 cm, deben extraerse las vísceras, incluido el riñón. Si una muestra consiste en un pez entero de más de 6 cm de longitud, debe obtenerse muestras de tejido como se describe arriba. Las muestras de tejido deben trocearse finamente con tijeras o una hoja de bisturí estériles, homegeneizarse y suspenderse en medios de transporte.

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

El INHV es muy sensible a la degradación, por tanto, siempre que sea posible debe evitarse tomar tejidos con altas actividades enzimáticas o con grandes cantidades de bacterias contaminantes, como el intestino o la piel. El tejido muscular también es menos útil, puesto que suele contener una menor carga vírica.

4. Métodos de diagnóstico

El método de referencia para la detección del VNHI es el aislamiento del virus en cultivos celulares seguido de su identificación inmunológica o molecular. Aunque para la confirmación de la identidad del virus aislado en el cultivo celular o para la confirmación de infecciones manifiestas en peces pueden utilizarse otros métodos de diagnóstico mencionados más adelante, no están autorizados para su uso como métodos primarios de vigilancia para obtener ni mantener el estatus aprobado de ausencia de la NHI.

Debido a la considerable variación en la intensidad y la duración de las respuestas serológicas de los peces a las infecciones por este virus, la detección de anticuerpos contra el virus en los peces hasta ahora no se ha aceptado como método de diagnóstico sistemático para evaluar el estado vírico de poblaciones de peces. En el futuro, la validación de técnicas serológicas para el diagnóstico de infecciones víricas en peces podría hacer que la serología de los peces tuviera más aceptación como método de diagnóstico. No obstante, cuando la hay, una respuesta serológica positiva se considera un indicio presuntivo de una exposición pasada al VNHI

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

La enfermedad suele caracterizarse por signos macroscópicos que consisten en un letargo que se intercala con rachas de una anómala actividad frenética, oscurecimiento de la piel, palidez en las branquias, distensión abdominal, exoftalmia y hemorragias petequiales interna y externamente.

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Durante los brotes, los peces suelen estar aletargados, con rachas de una anómala actividad frenética, como natación en espiral y movimientos fugaces. En algunas especies se observa que arrastran un cilindro fecal. En algunos de los peces supervivientes se observan deformidades raquídeas (Bootland y Leong, 1999).

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

Los peces afectados presentan un oscurecimiento de la piel, palidez de branquias, distensión abdominal, exoftalmia y hemorragias petequiales interna y externamente. Internamente, los peces parecen anémicos y falta alimento en el intestino. El hígado, el riñón y el bazo están pálidos. Hay líquido ascítico y se observan petequias en los órganos de la cavidad corporal.

4.2.2. Bioquímica clínica

La sangre de alevines afectados presenta un hematocrito bajo, leucopenia, degeneración de leucocitos y trombocitos, y grandes cantidades de detritos celulares. Como ocurre en otras viremias hemorrágicas de los peces, la bioquímica clínica está alterada en los casos graves (Bootland y Leong, 1999).

4.2.3. Anatomopatología microscópica

Los hallazgos histopatológicos ponen de manifiesto necrosis degenerativa en tejidos hematopoyéticos, riñones, bazo, hígado, páncreas y el tracto digestivo. La necrosis de células granulares eosinófilas en la pared intestinal es patognomónica de infección por el VNHI (Bootland y Leong, 1999).

4.2.4. Preparaciones húmedas

Las preparaciones húmedas tienen poco valor diagnóstico.

4.2.5. Improntas y frotis de tejido

La mejor forma de observar cuerpos necrobióticos y macrófagos espumosos, que constituyen un indicador clínico de NHI, son las improntas de tejido obtenidas del riñón anterior y del bazo, más que los frotis.

4.2.6. Microscopía electrónica/citopatología

La microscopía electrónica de células infectadas por el virus pone de manifiesto viriones en forma de bala de unos 150-190 nm de longitud y de 65-75 nm de anchura (Wolf, 1988). Los viriones son visibles en la superficie celular o en el interior de vacuolas o de espacios intracelulares tras la gemación a través de las membranas celulares. El virión posee una envoltura externa que contiene lípidos del hospedador y las espículas glucoproteicas víricas sobre la superficie del virión que reaccionan con la inmunotinción con oro.

4.3. Métodos de detección e identificación del agente

El procedimiento tradicional para la detección del VNHI se basa en el aislamiento del virus en cultivo celular. La identificación confirmativa se puede lograr mediante métodos inmunológicos (neutralización, prueba de la inmunofluorescencia indirecta o enzimoinmunoanálisis) o moleculares (reacción en cadena de la polimerasa, sonda de ADN o secuenciación) (Arakawa *et al.,* 1990; Arnzen *et al.,* 1991; Deering *et al.,* 1991; Dixon y Hill, 1984; Jorgensen *et al.,* 1991; LaPatra *et al.,* 1989; Purcell *et al.* 2006; Winton y Einer-Jensen, 2002).

4.3.1. Métodos directos de detección

4.3.1.1. Métodos microscópicos

4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

Las preparaciones húmedas no son adecuadas para la detección ni la identificación del VNHI.

4.3.1.1.2. Frotis

Los frotis no son adecuados para la detección ni la identificación del VNHI

4.3.1.1.3. Cortes fijados

Se ha utilizado la inmunohistoquímica y la hibridación *in-situ* (ISH) en aplicaciones de investigación, pero no son adecuadas para la detección ni la identificación del VNHI en contextos de diagnóstico.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

Líneas celulares que se utilizan: EPC o FHM.

La detección del virus por el desarrollo de efecto citopático (ECP) vírico en el cultivo celular iría seguida de la identificación del virus mediante pruebas basadas en anticuerpos o pruebas basadas en ácido nucleico. Toda prueba basada en anticuerpos requeriría la utilización de anticuerpos validados en cuanto a sensibilidad y especificidad.

4.3.1.2.1.1 Extracción del virus

En el laboratorio, el tejido de los tubos debe homogeneizarse por completo (mediante una licuadora, un mortero mezclador con arena o cualquier otro homogenizador adecuado y validado) y a continuación suspenderse en el medio de transporte original. La proporción final entre tejido y 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*** 15 minutos y el sobrenadante se recoge y se trata durante cuatro horas a 15°C o bien durante toda la noche a 4°C con antibióticos (por ejemplo, 1 mg/ml de gentamicina puede ser útil en esta fase). Si el envío de la muestra se ha realizado en un medio de transporte (es decir, con exposición a antibióticos) el tratamiento del sobrenadante con antibióticos puede omitirse. El tratamiento con antibióticos se realiza para controlar la contaminación bacteriana en las muestras y hace que no sea necesaria la filtración por filtros de membrana.

Cuando surgen dificultades prácticas (como la rotura de la incubadora, problemas con los cultivos celulares, etc.) que imposibiliten inocular 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 un examen virológico en un plazo de 14 días. 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.

Tratamiento opcional del homogenado para inactivar virus competentes: el tratamiento de inóculos con antisuero contra el VNPI (que en algunas partes del mundo aparece en el 50% de las muestras de peces) va destinado a evitar que el ECP debido al VNPI impida la detección del VNHI en el cultivo celular. Cuando las muestras proceden de unidades de producción que se consideran libres de la NPI, el tratamiento de inóculos con antisuero anti VNPI debe omitirse. Antes de inocular las células, los sobrenadantes se mezclan con partes iguales de una combinación adecuadamente diluida de antisueros frente a los serotipos locales del VNPI y se incuban con esta durante un mínimo de una hora a 15°C o durante 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%.

4.3.1.2.1.2 Inoculación de monocapas celulares

Se cultivan células EPC o FHM a 20-30°C en un medio adecuado, como el MEM de Eagle (o modificaciones del mismo) con un suplemento de un 10% de suero fetal bovino (FBS) y antibióticos en 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). El pH debe ser de 7,6 ± 0,2. Los cultivos celulares que se vayan a utilizar par la inoculación con

tejido deben ser jóvenes (de 4-48 horas) y encontrarse en crecimiento activo (no concluyente) en el momento de la inoculación.

Se inocula suspensión de órganos tratada con antibiótico en cultivos celulares a por lo menos dos diluciones, es decir, la dilución primaria y, además, una dilución a 1:10 de la misma, obteniendo unas diluciones finales de tejido en medio de cultivo celular de 1:100 y 1:1000, respectivamente, (para prevenir la interferencia homóloga). La proporción entre el tamaño del inóculo y el volumen de medio de cultivo celular debe ser de más o menos 1:10. Para cada dilución y cada línea celular, debe utilizarse un área mínima de unos 2 cm^2, que corresponde 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 de 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 7 a 10 días. Si el color del medio de cultivo celular pasa de rojo a amarillo, indicando acidificación del medio, debe realizarse un ajuste del pH con solución estéril de bicarbonato o sustancias equivalentes para mantener la susceptibilidad de las células a la infección vírica.

Se realiza una valoración de las diluciones madre congeladas de VNHI al menos cada seis meses, o siempre que se sospeche de disminución de la susceptibilidad celular, para verificar la susceptibilidad de los cultivos celulares a la infección.

4.3.1.2.1.4 Microscopía

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

4.3.1.2.1.5 Subcultivos

Si no se observa ECP tras la incubación primaria durante 7 a 10 días, se realiza un subcultivo a cultivos celulares nuevos utilizando un área celular similar a la del cultivo primario.

Se combinan varias alícuotas de medio (sobrenadante) de todos los cultivos/pocillos que constituyen el cultivo primario, según la línea celular 7 a 10 días después de la inoculación. A continuación, dichas alícuotas combinadas se inoculan en cultivos celulares homólogos no diluidos y diluidos a 1:10 (obteniendo diluciones finales de 1:10 y 1:100, respectivamente, del sobrenadante) según se describe en el apartado 4.3.1.2.1.2 anterior.

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 el antisuero contra el VNPI a una dilución adecuada, como se ha descrito anteriormente.

A continuación, los cultivos inoculados se incuban 7 a 10 días a 15°C con observación, como se explica en el apartado 4.3.1.2.1.4. Si aparece ECP en los primeros tres días tras la incubación, puede realizarse un subcultivo en esa fase, pero después hay que incubar las células siete días y realizar otro subcultivo con siete días más de incubación. Cuando aparece ECP pasados tres días, las células pueden pasarse una vez e incubarse para lograr el total de 14 días desde la inoculación primaria. A lo largo de los siete últimos días de incubación no debe haber indicios de toxicidad.

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

Si no aparece ECP, la prueba puede declararse negativa.

4.3.1.2.2. Métodos de detección de antígeno basados en anticuerpos

4.3.1.2.2.1 Prueba de neutralización (identificación en cultivo celular)

i) Se recoge medio de cultivo de las monocapas celulares que presenten ECP y se centrifuga una alícuota a 2.000 ***g*** durante 15 minutos a 4°C, o se filtra por una membrana de 0,45 µm (o 450 nm) de poro para eliminar los detritos celulares.

ii) Se diluye medio con virus a 10^2–10^4.

iii) Se mezclan alícuotas (por ejemplo, de 200 µl) de cada dilución con volúmenes iguales de una solución de anticuerpos anti VNHI. (La solución de anticuerpos neutralizantes (NAb) debe tener un título de reducción en placa al 50% de al menos 2000). De igual forma, se trata un conjunto de alícuotas de cada dilución vírica con medio de cultivo celular para disponer de un control no neutralizado.

iv) Simultáneamente, debe realizarse otra prueba de neutralización contra una cepa homóloga de VNHI (prueba de neutralización positiva) para confirmar la reactividad del antisuero.

v) Se incuban todas las mezclas a 15°C 1 hora.

vi) Se transfieren las alícuotas de cada una de las mezclas anteriores a monocapas de 24 horas de edad recubiertas con medio de cultivo celular que contenga un 10% de FBS (se inoculan dos pocillos por dilución) y se incuban a 15°C; para este fin son adecuadas placas de cultivo celular de 24 o 12 pocillos, utilizando un inóculo de 50 µl.

vii) Se comprueba si en los cultivos celulares aparece ECP y se leen los resultados para cada muestra sospechosa de contener el VNHI en cuanto este ECP aparece en controles no neutralizados. Los resultados se registran tras un simple examen microscópico (preferible con 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%.

viii) El virus analizado se identifica como VNHI cuando el ECP se ha prevenido o se ha retrasado considerablemente en los cultivos celulares que han recibido la suspensión vírica tratada con el anticuerpo específico contra el VNHI, habiendo observado un evidente ECP en todos los demás cultivos celulares.

Como alternativa pueden utilizarse otras pruebas de neutralización de probada eficacia.

4.3.1.2.2.2 Prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFAT)

A lo largo de los años se han desarrollado métodos de detección de antígenos basados en anticuerpos, como la IFAT, el ELISA y distintos procedimientos inmunohistoquímicos para la detección del VNHI. Estas técnicas pueden aportar detección e identificación de manera relativamente rápida en comparación con el aislamiento del virus en cultivo celular. No obstante, distintos parámetros, como la sensibilidad y la especificidad de anticuerpo y la preparación de la muestra pueden influir en los resultados; un resultado negativo debe interpretarse con cautela. Estas técnicas no deben utilizarse en intentos de detectar peces portadores.

a) Prueba de inmunofluorescencia indirecta en cultivos celulares

i) Se preparan monocapas de células en pocillos de 2 cm^2 de placas de plástico de cultivo celular o en cubreobjetos, con el fin de alcanzar alrededor de un 80% de confluencia, que suele tener lugar en un plazo de 24 horas de incubación a 22 °C (se siembran seis monocapas celulares por cepa vírica que tenga que identificarse, más dos para los controles positivos y dos para los negativos). El contenido en FBS del medio de cultivo celular puede reducirse a un 2-4%. Si tienen que identificarse muchas cepas víricas, se recomienda utilizar placas de 96 pocillos negras para inmunofluorescencia.

ii) Cuando las monocapas celulares están listas para la infección (es decir, el mismo día o el día después de la siembra) se inoculan las suspensiones de virus a identificar creando pasos de dilución decimal directamente en los pocillos o frascos de cultivo celular.

iii) Se diluye la suspensión vírica control del VNHI de una forma similar, con el fin de obtener un título vírico de 5.000-10.000 unidades formadoras de placa (UFP)/ml en el medio de cultivo celular.

iv) Se incuba a 15°C durante 24 horas.

v) Se retira el medio de cultivo celular, se lava una vez con solución salina tamponada con fosfato (PBS) 0,01 M, a pH 7,2, y a continuación tres veces brevemente con una mezcla fría de acetona 30%/etanol 70% (v/v) (que se haya mantenido a -20°C).

vi) Se deja que el fijador actúe 15 minutos. Un volumen de 0,5 ml es suficiente para 2 cm^2 de una monocapa celular.

vii) Las monocapas celulares se dejan secar al aire al menos 30 minutos y se procesan de inmediato o se congelan a -20°C.

viii) Se prepara una solución o suero de anticuerpos contra el VNHI en PBS 0,01 M, pH 7,2, que contenga Tween-80 al 0,05% (PBST), a la dilución adecuada (que se habrá establecido previamente o vendrá dada por el proveedor del reactivo).

ix) Se rehidratan las monocapas celulares secadas mediante cuatro pasos de lavado con la solución de PBST, y se retira este tampón completamente tras el último lavado.

x) Se tratan las monocapas celulares con la solución de anticuerpos durante 1 hora a 37°C en una cámara con humedad y no se dejan evaporar (por ejemplo, introduciendo un trozo de algodón húmedo a la cámara con humedad). El volumen de solución que debe utilizarse es de 0,25 ml/pocillo de 2 cm^2.

xi) Se lavan cuatro veces con PBST, como antes.

xii) Se tratan las monocapas celulares 1 hora a 37°C con una solución de anticuerpo contra la inmunoglobulina utilizada en la primera capa conjugado con ITCF – o bien isotiocianato de tetrametilrodamina-5-(y -6-) (TRITC), y se preparan según las instrucciones del proveedor. Estos anticuerpos conjugados suelen ser de conejo o de cabra.

xiii) Se lavan cuatro veces con PBST.

xiv) Se examinan las monocapas celulares tratadas sobre placas de plástico de inmediato, o se montan los cubres 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 x10 y objetivos de x20-40 que tengan una apertura numérica >0,65 y >1,3, respectivamente. Antes de realizar ninguna otra observación, es necesario comprobar que los controles positivos y negativos dan los resultados esperados.

b) Prueba de inmunofluorescencia indirecta en preparaciones por impronta

i) Se sangran los peces por completo.

ii) Se realizan preparaciones por impronta 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 los trozos de riñón junto con los demás órganos necesarios para el aislamiento del virus por si más adelante se precisa llevarlo a cabo.

iv) Se dejan secar las improntas al aire durante 20 minutos.

v) Se fijan con acetona o etanol/acetona y se secan

vi) Se rehidratan las preparaciones anteriores y se bloquean con leche desnatada al 5% o albúmina sérica bovina al 1%, en PBST durante 30 minutos a 37°C.

vii) Se lavan cuatro veces con PBST.

viii) Se tratan las improntas con la solución de anticuerpos anti VNHI y se lavan.

ix) Se bloquean y se lavan.

x) Se revela la reacción con anticuerpos específicos conjugados con isotiocianato de fluoresceína (ITCF) adecuados, se lavan y se observan.

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 anteriormente.

Como alternativa se pueden utilizar otras IFAT o técnicas de inmunocitoquímica (fosfatasa alcalina o peroxidada) de probada eficiencia.

4.3.1.2.2.3 Enzimoinmunoanálisis (ELISA)

i) Se recubren los pocillos de las microplacas diseñados para los ELISA con diluciones adecuados de inmunoglobulinas (Ig) purificadas o suero específico del VNHI, en PBS 0,01 M, pH 7,2 (200 µl/pocillo).

ii) Se incuban toda la noche a 4°C.

iii) Se lavan cuatro veces con PBS 0,01 M que contenga 0,05% de Tween-20 (PBST).

iv) Se bloquean con leche desnatada (al 5% en PBST) u otra solución bloqueante durante 1 hora a 37°C (200 µl/pocillo).

v) Se lavan cuatro veces con PBST.

vi) Se añade un 2% de Triton X-100 a la suspensión vírica que se va a identificar.

vii) Se distribuyen 100 µl/pocillo de diluciones de dos o cuatro pasos del virus a identificar y del virus VNHI control, y un virus heterólogo control (por ejemplo, el virus de la septicemia hemorrágica

vírica). Se deja que las muestras reaccionen con el anticuerpo recubierto al VNHI durante 1 hora a 20°C.

viii) Se lavan cuatro veces con PBST.

ix) Se añade a los pocillos antisuero anti VNHI policlonal biotinilado o MAb anti proteína N específico de un dominio diferente del dominio del MAb de recubrimiento y previamente conjugado con biotina.

x) Se incuban 1 hora a 37°C.

xi) Se lavan cuatro veces con PBST.

xii) Se añade peroxidasa de rábano conjugada con estreptavidina a los pocillos que han recibido el anticuerpo conjugado con biotina, y se incuban 1 hora a 20°C.

xiii) Se lavan cuatro veces con PBST. Se añade el sustrato y el cromógeno. Se detiene el curso de la prueba cuando reaccionan controles positivos, y se leen los resultados.

xiv) Las interpretaciones de los resultados están en función de las absorbancias ópticas alcanzadas por los controles negativos y positivos y deben seguir las normas de cada prueba; por ejemplo, la absorbancia a 450 nm del control positivo debe ser al menos de 5-10 veces la absorbancia a 450 nm del control negativo.

La anterior versión de ELISA basado en biotina-avidina es solo un ejemplo; también pueden utilizarse otras versiones de ELISA de probada eficiencia.

4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

4.3.1.2.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa

Preparación del ARN vírico

i) Se extrae ARN total de células infectadas mediante un método de separación de fases (como el fenol-cloroformo o el Trizol) o bien utilizando un kit comercial de aislamiento del ARN siguiendo las instrucciones del fabricante. Aunque todos estos métodos funcionan bien para las monocapas celulares drenadas o precipitados celulares, el ARN ligado a columnas de afinidad puede resultar afectado por sales presentes en los medios de cultivo celular, y para la extracción de ARN de líquidos de cultivo celular deben utilizarse métodos de separación de fases.

Protocolo de la PCR con transcripción inversa (RT) y de la PCR estándar

i) Se prepara una mezcla madre para tantas muestras como vayan a analizarse. Se trabaja con campana extractora y guantes.

ii) La mezcla madre de 50 µl para una PCR con transcripción inversa se prepara del siguiente modo: 23,75 µl de agua libre de ribonucleasa (tratada con DEPC) o de grado para biología molecular; 5 µl de tampón 10×; 5 µl de $MgCl_2$ 25 mM; 5 µl de dNTP 2 mM; 2,5 µl (20 pmoles μl^{-1}) de cebador en dirección 5': 5'-AGA-GAT-CCC-TAC-ACC-AGA-GAC-3'; 2,5 µl (20 pmoles μl^{-1}) de cebador en dirección 3': 5'-GGT-GGT-GTT-GTT-TCC-GTG-CAA-3'; 0,5 µl de polimerasa Taq (5 U μl^{-1}); 0,5 µl de transcriptasa inversa AMV (9 U μl^{-1}); 0,25 µl de RNasin (39 U μl^{-1}).

iii) Se centrifugan los tubos brevemente (10 segundos) para garantizar que el contenido quede en el fondo.

iv) Se colocan los tubos en el termociclador y se empiezan los siguientes ciclos - 1 ciclo: 50°C durante 30 minutos; 1 ciclo: 95 °C durante 2 minutos; 30 ciclos: 95 °C durante 30 segundos, 50°C durante 30 segundos, 72°C durante 60 segundos; 1 ciclo: 72°C durante 7 minutos y se deja en remojo a 4°C.

vi) Se visualiza el amplicón de la PCR de 693 pb mediante electroforesis del producto en gel de agarosa al 1,5% con bromuro de etidio y se observa mediante transiluminación con luz UV.

NOTA: Estos cebadores de PCR tienen por Diana una región central del gen G del VNHI (Emmenegger *et al.,* 2000). Aunque para la amplificación de partes de los genes N o G del VNHI se pueden utilizar otros conjuntos de cebadores (Winton y Einer-Jensen, 2002), se ha observado que las secuencias de cebadores indicadas arriba se conservan en una gran variedad de cepas del VNHI y no están presentes en el gen G de rabdovirus de peces relacionados, el virus de la septicemia hemorrágica vírica ni el rabdovirus hirame. Además, los nuevos cebadores producen un amplicón que puede utilizarse como molde para el análisis de la secuencia de la región "medio-G" del genoma del VNHI para fines epidemiológicos (Emmenegger *et al.,* 2000; Kurath *et al.,* 2003).

4.3.1.2.3.2 Otras técnicas basadas en la amplificación

Se han desarrollado otros métodos para detectar el VNHI basados en la amplificación de secuencias diana del ARN genómico o mensajero, en las que se utiliza un método de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) (Gunimaladevi *et al.,* 2005) o una prueba de PCR con transcriptasa inversa cuantitativa (Overturf et al., 2001). Sin embargo, estas pruebas todavía no se han validado de forma definitiva en un laboratorio utilizando un conjunto de cepas de referencia que representen distintos genotipos del VNHI para que puedan considerarse adecuadas como método confirmativo.

4.3.1.2.3.3 Secuenciación

El análisis de la secuencia de amplicones de la PCR se ha vuelto mucho más rápido y barato en los últimos años y constituye un buen método de confirmación de las infecciones por el VNHI (Winton y Einer-Jensen, 2002). Además, el análisis de la secuencia es uno de los mejores sistemas de identificación de cepas genéticas y de trazabilidad epidemiológica de los desplazamientos del virus (Emmenegger *et al.,* 2000; Kim *et al.,* 2007; Kurath *et al.,* 2003; Nishizawa *et al.,* 2006).

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

Los métodos actualmente disponibles para la vigilancia, la detección y el diagnóstico del VNHI 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**
	Gametos	**Alevines**	**Juveniles**	**Adultos**		
Signos macroscópicos	d	c	c	d	b	d
Aislamiento del virus	a	a	a	a	a	c
MO directa	d	c	d	d	b	c
Histopatología	d	c	d	d	b	c
ME de transmisión	d	d	d	d	b	c
Pruebas basadas en anticuerpos	d	c	c	c	a	b
Pruebas de PCR	c	c	c	c	a	a
Secuenciación	d	d	d	d	c	a

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 necrosis hematopoyética infecciosa

El método de vigilancia dirigida destinado a declarar la ausencia de NHI es el aislamiento del virus en cultivo celular. Para este fin, deben examinarse las fases más susceptibles de las especies más susceptibles. En al menos uno de

los periodos de muestreo de cada año deben tomarse muestras de líquidos y tejidos reproductivos de peces adultos de una especie susceptible que se encuentre en desove.

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

Un casos sospechoso se define como la presencia de signos clínicos macroscópicos característicos de la enfermedad en una población de peces susceptibles, O BIEN una presentación histopatológica interna característica en especies susceptibles, O BIEN la detección de anticuerpos contra el VNHI en una especie susceptible, O BIEN un efecto citopático característico en el cultivo celular sin identificación del agente, O BIEN un resultado positivo en una sola de las pruebas diagnósticas clasificada como "a" o "b" en la Tabla 5.1.

7.2. Definición de caso confirmado

Un caso confirmado se define como un caso sospechoso que ha: 1) producido efecto citopático característico en cultivo celular con la subsiguiente identificación del agente mediante una de las pruebas basadas en anticuerpos o moleculares de la Tabla 5.1, O BIEN 2) dado un segundo resultado positivo en una prueba diagnóstica diferente clasificada como "a" o "b" en la última columna de la Tabla 5.1.

8. Bibliografía

ARAKAWA C.K., DEERING R.E., HIGMAN K.H., OSHIMA K.H., O'HARA P.J. & WINTON J.R. (1990). Polymerase chain reaction (PCR) amplification of a nucleoprotein gene sequence of infectious hematopoietic necrosis virus. *Dis. Aquat. Org*., **8**, 165–170.

ARNZEN J.M., RISTOW S.S., HESSON C.P. &LIENTZ J. (1991). Rapid fluorescent antibody tests for infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) utilizing monoclonal antibodies to the nucleoprotein and glycoprotein. *J. Aquat. Anim. Health*, **3**, 109–113.

BARROSO R.M., WHEELER P.A., LAPATRA S.E., DREW R.E. &THORGAARD G.H. (2008). QTL for IHNV resistance and growth identified in a rainbow trout (*Oncorhynchusmykiss*) X Yellowstone cutthroat (*Oncorhynchusclarkibouvieri*) trout cross. *Aquaculture,***277**, 156–163.

BOOTLAND L.M. & LEONG J.C. (1999). Infectious hematopoietic necrosis virus. *In:* Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections, Woo P.T.K. & Bruno D.W., eds. CAB International, Oxon, UK, 57–121.

BOVO G., HÅSTEIN T., HILL B., LAPATRA S., MICHEL C., OLESEN N.J., SHCHELKUNOV I., STORSET A., WOLLFROM T. &MIDTLYING P.J. (2005). Hazard identification for vertical transfer of fish disease agents. Available at: http://www.crl-fish.eu/upload/sites/crl-fish/reports/links/fisheggtrade%20wp1.pdf.

DEERING R.E., ARAKAWA C.K., OSHIMA K.H., O'HARA P.J., LANDOLT M.L. & WINTON J.R. (1991). Development of a biotinylated DNA probe for detection and identification of infectious hematopoietic necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.,***11**, 57–65.

DIXON P.F. & HILL B.J. (1984). Rapid detection of fish rhabdoviruses by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Aquaculture*, **42**, 1–12.

EMMENEGGER E.J., MEYERS T.R., BURTON T.O. &KURATH G. (2000). Genetic diversity and epidemiology of infectious hematopoietic necrosis virus in Alaska. *Dis. Aquat. Org.*, **40**, 163–176.

ENGELKING H.M., HARRY J.B. & LEONG J.C. (1991). Comparison of representative strains of infectious hematopoietic necrosis virus by serological neutralization and cross-protection assays. *Appl. Environ. Microbiol.,* **57**, 1372–1378.

ENZMANN P.-J., CASTRIC J., BOVO G., THIERY R., FICHTNER D., SCHÜTZE H. &WAHLI T. (2010). Evolution of infectioushematopoieticnecrosis virus (IHNV), a fishrhabdovirus, in Europe over 20 years: implications for control. *Dis. Aquat. Org.,***89**, 9–15.

ENZMANN P.J., KURATH G., FICHTNER D. & BERGMANN S.M. (2005). Infectious hematopoietic necrosis virus: Monophyletic origin of European IHNV isolates from North-American genogroup M.*Dis. Aquat. Org.*,**66**, 187–195.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (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. *EFSA J.*,**808**, 1–144. Available at: http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/ahaw_op_ej808_suscepspecies_opinion_en.pdf?ssbinary=true

GARVER, K.A., BATTS, W.N. &KURATH, G. (2006). Virulence comparisons of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) U and M genogroups in sockeye salmon and rainbow trout.*J. Aquat. Anim. Health*,**18**, 232–243.

GUNIMALADEVI I., KONO T., LAPATRA S.E. & SAKAI M. (2005). A loop mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in rainbow trout (*Oncorhynchusmykiss*). *Arch. Virol*., **150**, 899–909.

HUANG C., CHIEN M-S., LANDOLT M. & WINTON J.R. (1994). Characterization of the infectious hematopoietic necrosis virus glycoprotein using neutralizing monoclonal antibodies. *Dis. Aquat. Org.,* **18**, 29–35.

JOHANSSON T., EINER-JENSEN K., BATTS W., AHRENS P., BJÖRKBLOM C., KURATH G., BJÖRKLUND H. &LORENZEN N. (2009). Genetic and serological typing of European infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) isolates. *Dis. Aquat. Org*., **86**, 213–221.

JORGENSEN P.E.V., OLESEN N.J., LORENZEN N., WINTON J.R. &RISTOW S.S. (1991). Infectious hematopoietic necrosis (IHN) and viral hemorrhagic septicemia (VHS): detection of trout antibodies to the causative viruses by means of plaque neutralization, immunofluorescence, and enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Aquat. Anim. Health*, **3**, 100–108.

Kim W-S., Oh M-J., Nishizawa T., Park J-W., Kurath G. &Yoshimizu M. (2007). GENOTYPING OF KOREAN ISOLATES OF INFECTIOUS HEMATOPOIETIC NECROSIS VIRUS (IHNV) BASED ON THE GLYCOPROTEIN GENE. *ARCH. VIROL*.,**152**, 2119–2124.

KOLODZIEJEK J., SCHACHNER O., DÜRRWALD R., LATIF M. &NOWOTNY N. (2008). “Mid-G” region sequences of the glycoprotein gene of Austrian infectious hematopoietic necrosis virus isolates form two lineages within European isolates and are distinct from American and Asian lineages. *J. Clin. Microbiol*., **46**, 22–30.

KURATH G. (2008). Biotechnology and DNA vaccines for aquatic animals. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.***27**,175-196.

KURATH G., GARVER K.A., TROYER R.M., EMMENEGGGER E.J., EINER-JENSEN K. & ANDERSON E.D. (2003). Phylogeography of infectious haematopoietic necrosis virus in North America. *J. Gen. Virol.*, **84**, 803–814.

LAPATRA S.E., FRYER J.L. &ROHOVEC J.S. (1993a). Virulence comparison of different electropherotypes of infectious hematopoietic necrosis virus.*Dis. Aquat. Org.,***16**, 115–120.

LAPATRA S.E., ROBERTI K.A., ROHOVEC J.S. &FRYER J.L. (1989).Fluorescent antibody test for the rapid diagnosis of infectious hematopoietic necrosis virus. *J. Aquat. Anim. Health,* **1**, 29–36.

LAPATRA S.E., TURNER T., LAUDA K.A., JONES G.R. & WALKER S. (1993b). Characterization of the humoral response of rainbow trout to infectious hematopoietic necrosis virus. *J. Aquat. Anim. Health*, **5**, 165–171.

MILLER K.M., WINTON J.R., SCHULZE A.D., PURCELL M.K. & MING T.J. (2004). Major histocompatibility complex loci are associated with susceptibility of Atlantic salmon to infectious hematopoietic necrosis virus. *Environ. Biol. Fish*., **69**, 307–316.

MORZUNOV S.P., WINTON J.R. & NICHOL S.T. (1995). The complete genome structure and phylogenetic relationship of infectious hematopoietic necrosis virus. *Vir. Res*., **38**, 175–192.

Nishizawa T., Kinoshita S., Kim W-S., Higashi S. &Yoshimizu M. (2006). NUCLEOTIDEDIVERSITY OF JAPANESE ISOLATES OF INFECTIOUS HEMATOPOIETIC NECROSIS VIRUS (IHNV) BASED ON THE GLYCOPROTEIN GENE. *DIS. AQUAT. ORG*.,**71**, 267-272.

OVERTURF K., LAPATRA S. & POWELL M. (2001). Real-time PCR for the detection and quantitative analysis of IHNV in salmonids. *J. Fish Dis.,***24**, 325–333.

Purcell M.K., Hart S.A., Kurath G. & Winton J.R. (2006). STRAND-SPECIFIC, REAL-TIME RT-PCR ASSAYS FOR QUANTIFICATION OF GENOMIC AND POSITIVE-SENSE RNAS OF THE FISH RHABDOVIRUS, INFECTIOUS HEMATOPOIETIC NECROSIS VIRUS. *J. VIROL. METHODS*,**132**, 18–24.

PURCELL M.K., LAPATRA S.E., WOODSON J.C., KURATH G. & WINTON J.R. (2010). Early viral replication and induced or constitutive immunity in rainbow trout families with differential resistance to Infectious hematopieticnecrosis virus (IHNV). *Fish ShellfishImmunol*., **28**, 98–105.

RISTOW S.S. &ARNZEN J.M. (1989). Development of monoclonal antibodies that recognize a type 2 specific and a common epitope on the nucleoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus. *J. Aquat. Anim. Health*, **1**, 119–125.

RISTOW S.S. &ARNZEN DE AVILA J.M. (1991). Monoclonal antibodies to the glycoprotein and nucleoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) reveal differences among isolates of the virus by fluorescence, neutralization and electrophoresis. *Dis. Aquat. Org.*, **11**, 105–115.

WINTON J.R. (1991). Recent advances in the detection and control of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in aquaculture. *Ann. Rev. Fish Dis*., **1**, 83–93.

WINTON J.R. (1997). Immunization with viral antigens: Infectious haematopoietic necrosis. *Dev. Biol. Stand*., **90**, 211–220.

WINTON J.R., ARAKAWA C.K., LANNAN C.N. & FRYER J.L. (1988). Neutralizing monoclonal antibodies recognize antigenic variants among isolates of infectious hematopoietic necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.*, **4**, 199–204.

WINTON J.R. &EINER-JENSEN K. (2002). Molecular diagnosis of infectious hematopoietic necrosis and viral hemorrhagic septicemia. *In:* Molecular Diagnosis of Salmonid Diseases, Cunningham C.O., ed. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 49–79.

WOLF K. (1988). Infectious hematopoietic necrosis. *In:* Fish Viruses and Fish Viral Diseases. Cornell University Press, Ithaca, New York, USA, pp. 83–114

*
* *

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

CAPÍTULO 2.3.5.

INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA ANEMIA INFECCIOSA DEL SALMÓN

1. Ámbito de aplicación

A los efectos de este capítulo, la infección por el virus de la anemia infecciosa del salmón (VAIS) es una infección por un VAIS con supresión de la región altamente polimórfica HPR, o bien por un VAIS HPR0 (es decir, sin supresión de la HPR), perteneciente al género *Isavirus* de la familia *Orthomyxoviridae.*

La infección por el VAIS con supresión de HPR podría causar anemia infecciosa del salmón (AIS) en salmón del Atlántico (*Salmo salar*), que es un trastorno generalizado y letal caracterizado por una anemia grave y grados variables de hemorragias y necrosis en varios órganos. El curso de la enfermedad se prolonga y la mortalidad diaria es baja (0,05-0,1%), habitualmente solo en unas pocas jaulas. La mortalidad acumulada puede llegar a ser muy alta durante un periodo de varios meses si no se actúa para reducir la propagación de la enfermedad (Rimstad *et al.,* 2011).

La detección del VAIS HPR0 nunca se ha relacionado con la AIS en el salmón del Atlántico (Christiansen *et al.,* 2011). El genotipo de este virus se replica de forma transitoria y se ha localizado principalmente en las branquias. Se ha propuesto una relación entre el VAIS HPR0 no patógeno y el VAIS con supresión de HPR patógeno, y pueden producirse brotes como consecuencia del surgimiento de VAIS con supresión de HPR a partir de VAIS HPR0 (Cunningham *et al*., 2002; Mjaaland, *et al*., 2002).

2. Información sobre la enfermedad

2.1. Factores del agente

2.1.1. El agente patógeno, cepas del agente

El VAIS es un virus con envoltura, de 100-130 nm de diámetro, con un genoma formado por ocho segmentos de ARN monocatenario con polaridad negativa (Dannevig *et al.,* 1995). El virus tiene actividad hemaglutinante, destructora de receptores y de fusión (Falk *et al*., 1997; Mjaaland *et al*., 1997; Rimstad *et al*., 2011).

Las propiedades morfológicas, fisicoquímicas y genéticas del VAIS coinciden con las de los *Orthomyxoviridae* y se ha clasificado al VAIS como la especie tipo del nuevo género *Isavirus* (Kawaoka
et al., 2005) dentro de esta familia de virus. Se ha descrito la secuencia de nucleótidos de cada uno de los ocho segmentos genómicos, que codifican al menos diez proteínas (Clouthier *et al.,* 2002; Rimstad *et al*., 2011), incluidas las secuencias no codificantes 3' y 5' (Kulshreshtha*et al.,* 2010). Se han identificado cuatro proteínas estructurales principales, incluyendo una nucleoproteína de 68 kDa, una proteína
de la matriz de 22 kDa, una hemaglutinina-esterasa (HE) de 42 kDa responsable de la unión a receptor y de la actividad destructora de receptor, y una glucoproteína de superficie de 50 kDa con capacidad potencial de adsorción (F), que están codificadas en los segmentos genómicos 3, 8, 6, y 5, respectivamente. Los segmentos 1, 2 y 4 codifican las polimerasas víricas PB2, PB1 y PA. Los dos segmentos genómicos más pequeños, el 7 y el 8, contienen cada uno dos marcos abiertos de lectura (ORF). El ORF1 del segmento 7 codifica una proteína con propiedades de antagonización del interferón tipo I, mientras que se ha sugerido que el ORF2 codifica una proteína nuclear de exportación (NEP). Todavía no está claro si el producto del gen del ORF1 es un componente no estructural o estructural del virión. El ORF1 más pequeño del segmento 8 codifica la proteína de la matriz, mientras que el ORF2 más grande codifica una proteína estructural de unión al ARN que también tiene propiedades de antagonización del interferón tipo I.

El análisis de la secuencia de distintos segmentos de genes ha puesto de manifiesto diferencias entre cepas tanto dentro como entre zonas geográficas definidas. En función de diferencias en la secuencia de la región 5' del gen HE, las cepas del VAIS se han clasificado en dos grupos principales, el europeo y el norteamericano. En el gen HE, se ha identificado una pequeña HPR cerca del dominio transmembrana. Esta región se caracteriza por la presencia de huecos más que por sustituciones de un solo nucleótido (Cunningham *et al*., 2002; Mjaaland *et al*., 2002). Se ha sugerido que un gen de

longitud total (HPR0) constituye un precursor a partir del cual se originan todas las variantes patógenas del VAIS con HPR delecionada (patógenas). Se ha observado la presencia de genoma de VAIS HPR0 no patógeno tanto en salmón del Atlántico salvaje como en el de piscifactoría, ambos aparentemente sanos, pero no se ha detectado en peces con enfermedad clínica ni con signos anatomopatológicos compatibles con AIS (Christiansen *et al*., 2011; Cunningham *et al*., 2002; Lyngstad *et al*., 2012; Markussen *et al*., 2008; McBeath *et al*., 2009; Nylund *et al*., 2007). Se ha observado una infección mixta con variantes de HRP delecionada y de HRP0 (Kibenge *et al.,* 2009).En estudios recientes se ha observado que las variantes de VAIS HPR0 son frecuentes en el salmón del Atlántico criado en el mar. La cepa de VAIS HPR0 parece tener un perfil más estacional y transitorio y presentar un tropismo tisular con alta prevalencia en las branquias (Christiansen *et al.*, 2011; Lyngstad *et al*., 2011). Hasta ahora, no se ha redactado un verdadero informe que vincule una presencia inicial de virus HPR0 con un posterior brote clínico de AIS. De hecho, el riesgo de que surjan variantes patógenas del VAIS a partir de un reservorio de HPR0 se considera bajo (Christiansen *et al*., 2011). Hasta la fecha no se han hallado pruebas directas de relación entre la presencia del VAIS HPR0 y un posterior brote de AIS clínica. El riesgo de aparición de variantes patógenas del VAIS con HPR delecionada a partir de un reservorio de VAIS HPR0 se considera bajo pero no insignificante (Christiansen *et al*., 2011; EFSA, 2012; Lyngstad *et al.,* 2012).

Además e las variaciones observadas en la HPR del gen HE, otros segmentos génicos podrían ser también importantes para la aparición de la AIS. Se ha identificado un posible marcador de virulencia en la proteína de fusión (F). Aquí, se ha observado que la sustitución de un solo aminoácido, o bien la inserción de una secuencia, cerca del posible punto de segmentación de la proteína es un prerrequisito para la virulencia (Kibenge *et al.,* 2007; Markussen *et al*., 2008). Además de la inserción/recombinación, el VAIS también usa la recombinación de segmentos génicos en su evolución, con posibles vínculos con la virulencia. (Devold *et al*., 2006; Markussen *et al*., 2008; Mjaaland *et al*., 2005).

2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

Se ha detectado VAIS mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) en agua de mar muestreada en lugares de cría con salmones del Atlántico positivos al VAIS (Kibenge *et al.,* 2004). Es difícil realizar una estimación exacta del tiempo que el virus puede permanecer infeccioso en el medio natural, por varios motivos, como la presencia de partículas o sustancias que podrían ligar o inactivar el virus. La exposición de VAIS propagado en cultivo celular a 15°C durante 10 días o a 4°C durante 14 días no ejerció ningún efecto en la infectividad del virus (Falk *et al*., 1997).

2.1.3. Estabilidad del agente (métodos eficaces de inactivación)

El VAIS es sensible a la radiación UV (UVC) y al ozono. Se obtuvo una reducción de 3 niveles logarítmicos en la infectividad en agua dulce estéril y en agua de mar con una dosis de UVC de alrededor de 35 Jm^{-2} y 50 Jm^{-2}, respectivamente, mientras que el correspondiente valor para el VAIS en aguas residuales de una planta de procesado de peces fue de unos 72 Jm^{-2}. El agua de mar ozonizada (4 minutos con 8 mg/ml, 600-750 mV de potencial redox) podría inactivar el VAIS por completo. La incubación de homogenado de tejido procedente de peces enfermos de AIS a pH 4 o pH 12 durante 24 horas inactivó la infectividad del VAIS. La incubación en presencia de cloro (100 mg/ml) durante 15 minutos también inactivó el virus (Rimstad *et al*., 2011). El VAIS aislado en cultivo celular puede sobrevivir durante semanas a bajas temperaturas, pero la infectividad del virus se pierde en 30 minutos de exposición a 56°C (Falk *et al*., 1997).

2.1.4. Ciclo de vida

Es probable que la principal vía de transmisión sean las branquias, tanto en el caso del VAIS HPR0 como en caso del VAIS de HPR delecionada, pero no puede excluirse la infección por el intestino o la piel. Se ha utilizado VAIS de HRP delecionada en estudios mencionados abajo. Las células endoteliales que revisten vasos sanguíneos parecen ser las células diana principales del VAIS, como se ha comprobado mediante microscopía electrónica, inmunohistoquímica e hibridación *in-situ.* También se ha observado replicación del virus en leucocitos, y los macrófagos sinusoides del tejido renal presentan tinción positiva para el VAIS al utilizar inmunohistoquímica (IHC). Dado que las células endoteliales son las células diana (véase el apartado 2.2.4), puede producirse replicación vírica en cualquier órgano (Aamelfot *et al.,* 2012; Rimstad *et al*., 2011).

La molécula del VAIS con actividad hemaglutinina-esterasa (HE), como la hemaglutinina (HA) de otros ortomixovirus (virus influenza A, B y C) es crucial para la unión del virus a restos de ácido siálico de la superficie celular. En el caso del VAIS, la partícula vírica se une a receptores de glucoproteína que contienen residuos de ácido siálico 4-O-acetilado, que también funciona como sustrato para la enzima destructora de receptores. La posterior captación y replicación parecen seguir la vía descrita para los

virus de la influenza A, como lo indican una adsorción dependiente de un pH bajo, la inhibición de la replicación por la actinomicina D y la α-amanitina, la acumulación temprana de nucleoproteína seguida de la proteína de la matriz en el núcleo y la gemación de viriones progenie a través de la superficie celular (Cottet *et al*., 2011; Rimstad *et al.,* 2011).

La vía de excreción del VAIS de peces infectados puede ser por las excreciones/secreciones naturales.

No se ha aislado la variante HPR0 en cultivo celular, lo cual obstaculiza los estudios in vivo e in vitro de las características y del ciclo de vida de esta variante del virus.

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Solo se han registrado brotes naturales de AIS en salmón del Atlántico de piscifactoría, y en salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) en Chile (Kibenge *et al*, 2001). Mediante RT-PCR se han identificado salmones del Atlántico y trucha marina (*S. trutta*) infectados subclínicamente (Kibenge *et al*., 2004; Plarre *et al*., 2005). En peces de mar, la detección del VAIS mediante RT-PCR se ha notificado en tejidos de carbonero (*Pollachius virens*) y de bacalao (*Gadus morhua*), pero solo en peces obtenidos de jaulas con salmón del Atlántico que presentaran AIS (MacLean SA *et al*., 2003). Tras la infección experimental mediante inmersión en baño, se ha detectado el VAIS mediante RT-PCR en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Biacchesi et al., 2007) y en arenque del Atlántico (*Clupea harengus*), en el segundo caso en una posterior transmisión a salmón del Atlántico. Se han realizado intentos de inducir la infección o la enfermedad en carbonero, *Pollachius virens,* pero con resultados negativos.

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

En el salmón del Atlántico, los brotes de enfermedad se observan principalmente en jaulas de agua de mar, y en el estadio de agua dulce se han observado solo unos pocos casos, incluido un caso en alevines de saco vitelino (Rimstad *et al*., 2011). Se ha inducido experimentalmente AIS tanto en alevines como en pintos de salmón del Atlántico mantenidos en agua dulce. La genética también puede desempeñar un importante papel en la susceptibilidad del salmón del Atlántico al AIS, ya que se han observado diferencias de susceptibilidad entre distintos grupos familiares.

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

La AIS es principalmente una enfermedad del salmón del Atlántico.

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

En el caso de los peces que han desarrollado AIS: resultan infectadas células endoteliales de todos los órganos (branquias, corazón, hígado, riñón, bazo y otros) (Aamelfot *et al.,* 2012). Las variantes de VAIS con HPR0 parecen tener por diana principalmente la branquias, pero esta variante también se ha detectado en el riñón y en el corazón (Christiansen *et al*., 2011; Lyngstad *et al.,* 2011).

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

En salmón del Atlántico no se ha documentado infección persistente en portadores de por vida, pero a nivel de piscifactoría la infección puede persistir en la población mediante la infección continua de nuevos peces que no desarrollan signos clínicos de la enfermedad. Esto puede incluir infección con las variantes del genotipo HPR0, que parece ser de naturaleza meramente transitoria (Christiansen *et al*., 2011; Lyngstad *et al*., 2011). La infección experimental de la trucha arco iris y la trucha marina con VAIS indica que en estas especies podría tener lugar una infección persistente (Rimstad *et al*, 2011).

2.2.6. Vectores

En condiciones experimentales se ha observado la transferencia pasiva del VAIS por los piojos del salmón (*Lepeophtheirus salmonis*). Aunque no se han identificado vectores naturales, otros varios grupos de vectores podrían ser posibles vectores en ciertas condiciones definidas (revisado por Rimstad *et al.*, 2011).

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

Tanto el salmón del Atlántico (Salmo salar) como la trucha marina (*S. trutta*) salvajes pueden ser portadores del VAIS (Rimstad *et al*., 2011). La importancia de los peces marinos (véase el apartado 2.2.1) como portadores del virus debe aclararse. Los resultados de un estudio de las Islas Faroe indica la posible presencia de un reservorio marino desconocido para este virus (Christiansen *et al*., 2011).

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mecanismos de transmisión

Según estudios de epidemias recurrentes de AIS en distintas zonas de producción de salmón se llega a la conclusión de que el virus se extiende localmente entre lugares contiguos. La proximidad a lugares con brotes de AIS conlleva un riesgo muy importante, y el riesgo de una piscifactoría susceptible aumenta cuanto más cerca se encuentra de una piscifactoría infectada. El análisis de la secuencia del VAIS de brotes de AIS de Noruega ha mostrado un alto grado de similitud entre virus aislados de lugares cercanos afectados por AIS, lo cual respalda aun más la hipótesis de la transmisión del VAIS entre lugares cercanos. El riesgo de transmisión del VAIS depende del nivel de las medidas de bioseguridad de la zona. Las vías de transmisión del VAIS sugeridas son el agua de mar, el envío de peces vivos, la transmisión por piojos de mar, y por los salmónidos salvajes infectados (Aldrin *et al.*; 2011; Gustafson *et al*.; 2007; Lyngstad *et al*.; Mardones *et al.,* 2011; 2011; Rimstad *et al*., 2011).

Muchos brotes de AIS de Noruega parecen estar aislados en el espacio y en el tiempo de otros brotes con fuentes desconocidas de infección (Aldrin *et al*., 2011). Una de las hipótesis sugeridas es que podría haber una transición ocasional de VAIS de HPR0 a variantes de HPR delecionada, que causara brotes aislados o epidemias locales mediante transmisión local (Lyngstad *et al* 2011). El riesgo de aparición de variantes del VAIS con HPR delecionada a partir de un reservorio de VAOS HPR0 se considera bajo pero no insignificante (EFSA, 2012). Todavía no se ha demostrado la existencia de una relación entre variantes del VAIS HPR0 y variantes con HPR delecionada.

Dado que el VAIS también se ha notificado en lugares de producción de esguines con salmón del Atlántico, no puede excluirse la transmisión del VAIS de progenitores a descendencia. Aunque no existen pruebas de una verdadera transmisión vertical, los huevos y los embriones podrían suponer un riesgo de transmisión si no se aplican suficientes medidas de bioseguridad (Mardones *et al.,* 2014; Rimstad *et al*., 2011).

2.3.2. Prevalencia

En una jaula de red que contenga peces enfermos, la prevalencia de VAIS con HPR delecionada puede variar mucho, mientras que en jaulas de red adyacentes el VAIS puede ser difícil de detectar, incluso mediante los métodos más sensibles. Por tanto, en los estudios de diagnóstico es importante muestrear de compartimientos de red que contengan peces enfermos.

Cada vez hay más pruebas de que la prevalencia de la HPR0 podría ser alta en zonas de producción de salmón del Atlántico. El VAIS de HPR0 en el salmón del Atlántico parece ser una infección estacional y transitoria (Christiansen *et al*., 2011). También se ha detectado VAIS de HPR0 en salmónidos y en truchas arco iris salvajes (revisado por Rimstad*et al*., 2011).

2.3.3. Distribución geográfica

Notificado por primera vez en Noruega a mediados de los años 1980 (Thorud y Djupvik, 1988), la AIS se ha notificado desde entonces en salmón del Atlántico de Canadá (New Brunswick en 1996), el Reino Unido (Escocia en 1998), las islas Faroe (2000), EE.UU. (Maine en 2001) y en Chile (2007) (Cottet *et al*., 2010; Rimstad *et al*., 2011). En todos los países en que ha tenido lugar AIS se ha documentado la presencia de la variante HPR0.

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

Durante los brotes de AIS, la morbilidad y la mortalidad pueden variar en gran medida en una misma jaula de red y entre distintas jaulas de piscifactorías de agua salada, y entre distintas piscifactorías. La morbilidad y la mortalidad en el interior de una jaula de red puede empezar a niveles muy bajos. Lo habitual es que la mortalidad diaria oscile entre el 0,5% y el 1% en las jaulas afectadas. Sin intervención, la mortalidad aumenta y parece alcanzar el pico a primeros de verano y en invierno. El intervalo de mortalidades acumuladas durante un brote va de insignificante a moderada, pero en los casos graves puede tener lugar una mortalidad acumulada superior al 90% durante varios meses. Inicialmente, un brote de AIS puede limitarse a una o dos jaulas de red a lo largo de un periodo prolongado. En estos casos, si las jaulas de red con AIS clínica se sacrifican de inmediato, puede prevenirse la aparición de AIS clínica en ese lugar. En los brotes en los que se han infectado esguines en barcos durante el transporte, pueden tener lugar brotes simultáneos.

El VAIS HPR0 no se ha asociado a AIS en salmón del Atlántico.

2.3.5. Factores ambientales

En general, los brotes de AIS tienden a ser estacionales, y la mayoría tiene lugar a finales de primavera y a finales de otoño; no obstante, pueden aparece en cualquier momento del año. La manipulación de peces (como la clasificación o el tratamiento, el tronchado o el movimiento de jaulas) puede iniciar brotes de enfermedad en piscifactorías infectadas, sobre todo si con anterioridad han tenido lugar problemas crónicos no diagnosticados (Lyngstad *et al*., 2008).

2.4. Control y prevención

2.4.1. Vacunación

La vacunación contra la AIS se ha llevado a cabo en Norteamérica y en las islas Faroe durante los últimos 5 años. En Noruega la vacunación contra la AIS se llevó a cabo por primera vez en 2009 en una zona con una alta frecuencia de brotes de AIS, y Chile empezó la vacunación contra la AIS en 2010. No obstante, las vacunas actuales no parecen ofrecer una protección completa en el salmón del Atlántico.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

Más recientemente, se ha comprobado que el fármaco antivírico de amplio espectro ribavirina (1-β-D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-carboxamida) es eficaz para inhibir la replicación del VAIS tanto *in vitro* como *in vivo* (Rivas-Aravena*et al.,* 2011).

2.4.3. Inmunoestimulación

No es aplicable.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

Se han observado diferencias de susceptibilidad entre distintos grupos familiares de salmón del Atlántico en agua dulce en pruebas de desafío y en pruebas de campo, lo cual indica el potencial de la selección genética a favor de la resistencia (Gjøen et al., 1997).

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

No es aplicable

2.4.6. Agentes bloqueantes

No son aplicables.

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

La desinfección de huevos según los procedimientos estándar se sugiere como importante medida de control (véase el Capítulo 1.1.3. *Métodos de desinfección de los establecimientos de acuicultura*).

2.4.8. Prácticas generales de manejo

La incidencia de la AIS puede reducirse en gran medida mediante la implementación de medidas legislativas o prácticas de manejo relativas al desplazamiento de peces, controles sanitarios obligatorios y reglamentación sobre transporte y sacrificio. También pueden contribuir a reducir la incidencia de la enfermedad medidas específicas que incluyan restricciones sobre piscifactorías afectadas, sospechosas o próximas, el sacrificio sanitario obligatorio, la segregación generacional ("todo dentro/todo fuera"), así como la desinfección de los desechos y el agua residual de las pesquerías y las plantas de procesamiento de peces. La experiencia de las Islas Faroe, donde la prevalencia de la HPR0 es alta, pone de manifiesto que la combinación de una buena bioseguridad y unas buenas prácticas de manejo reduce considerablemente el riesgo de brotes de AIS.

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

A continuación se describe principalmente la verificación de casos que son sospechosos por los signos clínicos y las lesiones macroscópicas o por resultados positivos en la RT-PCR para el VAIS con HPR delecionada.

Para la detección del VAIS HPR, deben tomarse muestras de tejido de branquias en individuos escogidos aleatoriamente en distintos momentos del ciclo de producción. La detección de este genotipo solo es posible mediante RT-PCR.

3.2. Conservación de las muestras para su envío

Hematología:	Heparina o EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)
Cultivo celular:	Medio de transporte para virus
Histología e inmunohistoquímica:	Fijación en formalina neutra al 10% tamponada con fosfato
Inmunofluorescencia (frotis):	Se envían secados, o secados y fijados en acetona al 10%
Biología molecular (RT-PCR y secuenciación):	Medio adecuado para la conservación del ARN

3.3. Combinación de varias muestras

La combinación de varias muestras puede ser aceptable, pero debe tenerse en cuenta la influencia en la sensibilidad y el diseño de prevalencia.

3.4. Órganos y tejidos de elección

3.4.1. Detección del VAIS con HPR delecionada

La sangre es la muestra de elección para el muestreo no letal. En general, dado que la AIS es una infección generalizada, para las pruebas de diagnóstico deben utilizarse órganos internos no expuestos al medio.

Examen virológico (cultivo celular y PCR): corazón (siempre se debe incluir) y riñón medio.

Histología (priorizada): riñón medio, hígado, corazón, páncreas/intestino, bazo;

Inmunofluorescencia (frotis): riñón medio;

Inmunohistoquímica: riñón medio, corazón (incluyendo las válvulas y el bulbo arterioso).

3.4.2. Detección del VAIS HPR0

Deben analizarse branquias mediante RT- PCR.

4. Métodos de diagnóstico

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

Los signos más llamativos de la AIS son unas branquias pálidas (excepto en caso de estasis sanguínea en las branquias), exoftalmia, distensión abdominal, sangre en la cámara anterior del ojo y, a veces, hemorragias, sobre todo en el abdomen, así como edema en las escamas.

En general, el salmón del Atlántico infectado de forma natural por el VAIS con HPR delecionada está aletargado y puede estar cerca de la pared de la jaula de red.

Los peces afectados en general están en buen estado, pero los enfermos no tienen alimento en el tracto digestivo.

4.2. Evaluación anatomopatológica

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

Los peces infectados por el VAIS con HPR delecionada pueden presentar gran variedad de alteraciones anatomopatológicas, desde ninguna a alteraciones graves, según factores como la dosis infectiva, la cepa vírica, la temperatura, la edad y el estado inmunitario de los peces. Ninguna lesión es patognomónica de la AIS, pero siempre hay anemia y perturbaciones circulatorias. Se ha descrito que los siguientes hallazgos son compatibles con la AIS, aunque casi nunca se observan todas las alteraciones a la vez en un solo pez.

- Líquido amarillento o sanguinolento en las cavidades peritoneal y pericárdica.
- Edema en la vejiga natatoria.
- Pequeñas hemorragias del peritoneo visceral y parietal.
- Hígado focal o difusamente rojo oscuro. En la superficie puede haber una fina capa de fibrina.
- Bazo hinchado y de color rojo oscuro con márgenes redondeados.
- Enrojecimiento oscuro de la mucosa de la pared intestinal en los sacos ciegos, intestino medio y posterior, sin sangre en el lumen intestinal de los ejemplares frescos.
- Riñón hinchado y de color rojo oscuro con sangre y líquido saliendo de las superficies de los cortes.
- Hemorragias puntuales del músculo esquelético.

4.2.2. Bioquímica clínica

- Hematocrito <10 en casos terminales (a menudo se observa 25–30 en casos menos avanzados). En los casos de salmón del Atlántico criado en agua de mar con un hematocrito <10 siempre deben realizarse pruebas para descartar la AIS.
- Frotis de sangre con eritrocitos degenerados y vacuolizados y la presencia de eritroblastos con forma nuclear irregular. Los recuentos diferenciales presentan una reducción de la proporción de leucocitos respecto a los eritrocitos, en la cual la principal reducción es la de linfocitos y trombocitos.

La hepatopatía conllevará un aumento de las concentraciones de enzimas hepáticas en la sangre.

4.2.3. Anatomopatología microscópica

Las alteraciones histológicas en salmón del Atlántico clínicamente enfermo son variables, pero pueden consistir en las siguientes:

- Gran cantidad de eritrocitos en el seno venoso central y capilares de las lamelas, donde también se forman trombos de eritrocitos en las branquias.
- Hemorragias multifocales a confluentes y/o necrosis de hepatocitos a cierta distancia de vasos más grandes del hígado. Acumulaciones focales de eritrocitos en sinusoides hepáticos dilatados.
- Acumulación de eritrocitos en vasos sanguíneos de la lámina propia intestinal y finalmente hemorragia hacia el interior de la lámina propia.
- Estroma esplénico distendido por acumulación de eritrocitos.
- Ligera hemorragia intersticial difusa multifocal a extensa con necrosis tubular en las zonas hemorrágicas, acumulación de editorcitos en los glomérulos renales.
- Eritrofagocitosis en el bazo y hemorragias secundarias en el hígado y el riñón.

4.2.4. Preparaciones húmedas

No son aplicables.

4.2.5. Frotis

Véase el apartado 4.3.1.1.2

4.2.6 Cortes fijados

Véase el apartado 4.3.1.1.3

4.2.7. Microscopía electrónica/citopatología

Se ha observado virus en células endoteliales y leucocitos mediante microscopía electrónica de preparaciones de tejido, pero este método no se ha utilizado con fines de diagnóstico.

4.2.8. Diagnósticos diferenciales

Otros trastornos anémicos y hemorrágicos, como el síndrome de los cuerpos de inclusión eritrocitarios, la úlcera de invierno y septicemias causadas por infecciones por *Moritella viscosa.* Los

casos de enfermedad en el salmón del Atlántico con hematocritos inferiores a 10 no son un hallazgo específico de la AIS, aunque en los casos de hematocrito tan bajo sin explicación evidente siempre deben comprobarse si presentan VAIS.

4.3. Métodos de detección e identificación del agente

4.3.1. Métodos directos de detección

A excepción de las técnicas moleculares (véase el apartado 4.3.1.2.3), estos métodos directos de detección solo se recomiendan para peces con signos clínicos de infección por VAIS con HPR delecionada.

4.3.1.1. Métodos microscópicos

4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

No son aplicables.

4.3.1.1.2. Frotis

4.3.1.1.2.1 Prueba de inmunofluorescencia indirecta

Una prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFAT) en la que se han utilizado anticuerpos monoclonales (MAbs) validados contra la hemaglutinina-esterasa (HE) del VAIS en frotis (por impronta) de riñón o en cortes de tejido congelado de riñón, corazón o hígado ha dado reacciones positivas en salmón del Atlántico infectado tanto experimentalmente como de forma natural. Los casos sospechosos (véase el apartado 7.1) se pueden confirmar con una IFAT positiva.

i) Preparaciones de frotis (por impronta) de tejidos

Se seca brevemente un trozo pequeño del riñón medio con papel absorbente para eliminar el exceso de líquido, y varias improntas en una zona del tamaño de la uña del dedo pulgar se fijan sobre portaobjetos recubiertos de poli-L-lisina. Las improntas se secan al aire, se fijan en acetona fría al 100% 10 minutos y se guardan a 4°C si son solos unos días o a -80°C hasta que se utilicen.

ii) Procedimiento de la tinción

Tras bloquear con leche desnatada en polvo al 5% con solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 30 minutos, las preparaciones se incuban 1 hora con una dilución adecuada de MAb anti-VAIS, y a continuación se lavan tres veces. Para la detección de anticuerpos unidos, las preparaciones se incuban con anticuerpos anti-Ig de ratón conjugados con isotiocianato de fluoresceína (ITCF) durante 1 hora. Para el lavado se utiliza PBS con Tween 20 al 0,1%. Todas las incubaciones se realizan a temperatura ambiente.

4.3.1.1.3. Cortes fijados

4.3.1.1.3.1 Inmunohistoquímica (IHC)

Se utilizan anticuerpos policlonales contra el VAIS en cortes incluidos en parafina de tejido fijado en formalina. Esta tinción mediante IHC ha dado reacciones positivas en salmón del Atlántico infectado tanto experimentalmente como de forma natural. Los órganos de elección son el riñón medio y el corazón (la zona de transición incluidas las tres cámaras y válvulas). Los casos sospechosos por signos anatomopatológicos se verifican con una IHC positiva. Los cortes histológicos se preparan según los métodos estándar.

i) *Preparación de cortes histológicos*

Los tejidos se fijan en formalina neutra al 10% tamponada con fosfato durante al menos 1 día, se deshidratan en diluciones seriadas de etanol, se aclaran en xileno y se incluyen en parafina, según los protocolos estándar. Se calientan cortes de unos 5 µm de espesor (para la IHC se colocan sobre portas recubiertos de poli-L-lisina) a 56–58°C (máximo de 60°C) durante 20 minutos, se desparafinan en xileno, se rehidratan pasándolos por diluciones seriadas de etanol, y se tiñen con hematoxilina y eosina para la observar las lesiones anatomopatológicas y la IHC según se describe a continuación.

ii) *Procedimiento de tinción para IHC*

Todas las incubaciones se llevan a cabo a temperatura ambiente sobre una plataforma oscilante, a no ser que se indique lo contrario:

a) La recuperación del antígeno se realiza hirviendo los cortes en tampón citrato 0,1 M pH 6,0 durante 2 x 6 minutos y bloqueándolos a continuación con una dilución de leche en polvo desnatada al 5% y un 2% de suero de cabra en TBS 50 mM (TBS; Tris/HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6) durante 20 minutos.

b) A continuación, se incuban los cortes toda la noche con anticuerpo primario (anticuerpo de conejo monoespecífico contra la nucleoproteína del VAIS) diluido con un 1% de leche en polvo desnatada, y después se lavan tres veces con TBS con Tween 20 al 0,1%.

c) Para la detección de anticuerpos unidos, los cortes se incuban con anticuerpos anti IgG de conejo conjugados con fosfatasa alcalina durante 60 minutos. Tras un lavado final, se añade Fast Red (1 mg/ml) y Naphtol AS-MX fosfato (0,2 mg/ml) con Levamisole 1 mM en TBS 0,1 M (pH 8,2) para el revelado durante 20 minutos. Después, los cortes se lavan en agua de grifo antes de aplicar la tinción de contraste con hematoxilina de Harris y se montan en medio de montaje acuoso. Se incluyen cortes de tejido positivos y negativos al VAIS como controles en cada realización.

iii) *Interpretación*

Los cortes control negativos no deben presentar ninguna reacción de color importante. Los cortes control positivos deben presentar una clara y visible tinción roja citoplasmática e intranuclear de las células endoteliales en los vasos sanguíneos o el endocardio del corazón. Un corte problema solo debe considerarse positivo si se observa una clara tinción roja intranuclear en las células endoteliales. La localización intranuclear es propia de la nucleoproteína del ortomixovirus durante una fase de la replicación del virus. A menudo domina una tinción citoplasmática simultánea. Las tinciones citoplasmáticas y otros patrones de tinción sin localización intranuclear deben considerarse inespecíficos o inconcluyentes.

Las reacciones de tinción positivas más fuertes se suelen obtener en células endoteliales del corazón y el riñón. Las reacciones de tinción endotelial en el interior de lesiones hemorrágicas muy extensas pueden ser ligeras o estar ausentes, posiblemente debido a una lisis de las células endoteliales infectadas.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

4.3.1.2.1. Cultivo celular

Las células ASK (Devold *et al*., 2000) se recomiendan para el aislamiento primario, pero también pueden usarse otras líneas celulares susceptibles, como SHK-1 (Dannevig *et al*., 1995), aunque debe tenerse en cuenta la variabilidad de la cepa y la capacidad de replicación en distintas líneas celulares. Estas células parecen permitir el aislamiento y el crecimiento de las cepas víricas conocidas hasta ahora. En células ASK puede aparecer un efecto citopático (ECP) más característico. Tanto la línea celular SHK-1 como la SK parecen perder susceptibilidad al VAIS a medida que aumenta el número de pases.

Las células SHK-1 y ASK se cultivan a 20°C en medio de cultivo celular L15 de Leibovitz suplementado con suero fetal bovino (al 5% o 10%), L-glutamina (4 mM), gentamicina (50 µg ml^{-1}) y 2-mercaptoetanol (40 µM) (este último se puede omitir).

Para el aislamiento del virus se pueden utilizar células cultivadas en frascos de cultivo de tejido de 25 cm^2 o en placas de cultivo celular multipocillo, que pueden sellarse con plástico autosellante o con un sellador de placas para estabilizar el pH del medio. Las células cultivadas en placas de 24 pocillos pueden no crecer demasiado bien en monocapas, pero este rasgo puede variar entre laboratorios según el tipo de placas de cultivo celular utilizadas. Deben inocularse controles positivos con diluciones seriadas del VAIS al mismo tiempo que las muestras de tejido, como prueba de susceptibilidad de las células al VAIS (esto debe realizarse en un lugar distinto del que se utilice para las muestras problema).

i) *Inoculación de monocapas celulares*

Se prepara una suspensión al 2% de homogenado de tejido utilizando medio L-15 sin suero u otro medio de probada idoneidad. Se retira el medio de crecimiento de las monocapas en crecimiento activo (cultivos de 1-3 días de edad o con un 70-80% de confluencia) cultivadas en frascos de cultivo de tejido de 25 cm^2 o en placas de cultivo celular multipocillo (véase arriba). Se inoculan las monocapas (frascos de cultivo tisular de 25 cm^2) con 1,5 ml del homogenado de tejido. Se ajusta el volumen a la respectiva superficie utilizada. Se dejan incubar 3 a 4 horas a 15°C y después se retira el inóculo y se añade medio de crecimiento L-15 fresco suplementado con FCS al 2-5%. Como alternativa puede utilizarse una dilución a 1/1000 e inoculación directa sin sustitución del medio.

Cuando las muestras de peces proceden de lugares de producción en los que el virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI) se considera endémico, el sobrenadante del homogenado tisular debe incubarse (durante un mínimo de 1 hora a 15°C) con un conjunto de antisueros contra los serotipos correspondientes del VNPI antes de la inoculación.

ii) *Seguimiento de la incubación*

A intervalos periódicos (al menos cada 7 días) se comprueba si los cultivos celulares inoculados (mantenidos a 15°C) presentan ECP. El ECP característico del VAIS es la presencia de células vacuolizadas que a continuación se redondean y se desprenden de la superficie del cultivo. Si aparece un ECP compatible con el descrito para el VAIS o el VNPI, debe recogerse una alícuota del medio para la identificación del virus, como se describe abajo. En el caso de una infección por el VNPI, se reinoculan células con sobrenadante de homogenado tisular que haya sido incubado con una dilución menor de antisueros anti VNPI. Si no ha aparecido ECP pasados 14 días, se subcultiva en cultivos celulares frescos.

iii) *Procedimiento del subcultivo*

Se recogen alícuotas de medio (sobrenadante) de los cultivos primarios 14 días (o antes, si aparece ECP obvio) después de la inoculación. A efectos de vigilancia, se pueden combinar sobrenadantes de pocillos inoculados con distintas diluciones de muestras idénticas.

Se inoculan sobrenadantes en cultivos celulares frescos como se ha descrito para la inoculación primaria: se retira el medio de cultivo, se inoculan monocapas con un pequeño volumen de sobrenadante diluido (1/5 y diluciones más altas) durante 3-4 horas antes de añadir el medio fresco. Como alternativa, se pueden añadir sobrenadantes (diluciones finales de 1/10 o superiores) directamente a los cultivos celulares con medio de cultivo.

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 obvio, el medio se recoge para la identificación del virus, como se describe abajo. En los cultivos celulares sin ECP siempre debe comprobarse si hay VAIS mediante inmunofluorescencia (IFAT), hemadsorción o PCR, puesto que puede producirse replicación del virus sin que se observe ECP.

El procedimiento descrito abajo ha resultado útil para el aislamiento del VAIS con HPR delecionada a partir de peces con signos clínicos o de casos sospechosos. Hasta ahora no se ha aislado HPR0 en cultivos celulares.

4.3.1.2.2. Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos

4.3.1.2.2.1 Identificación del virus mediante IFAT

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

i) Se preparan monocapas de células en placas de cultivo tisular adecuadas (por ejemplo, placas de 96 o de 24 pocillos), en frascos portaobjetos o en cubreobjetos en función del tipo de microscopio del que se disponga (para las monocapas cultivadas sobre placas de cultivo tisular es necesario un microscopio invertido equipado con luz UV). Las células SHK-1 crecen bastante peor sobre cubreobjetos de vidrio. Deben incluirse las monocapas necesarias como controles negativos y positivos.

ii) Se inoculan las monocapas con las suspensiones de virus a identificar en diluciones decimales, dos monocapas para cada dilución. Se añade un control de virus positivo en diluciones que se sepa que dan una buena reacción de tinción. Se incuban cultivos celulares inoculados a 15°C durante 7 días o, si aparece ECP, durante un periodo más corto.

iii) Se fijan en acetona al 80% durante 20 minutos tras retirar el medio de cultivo celular y lavarlos una vez con acetona al 80%. Se retira el fijador y se secan al aire durante 1 hora. Los cultivos celulares fijados pueden guardarse secos durante menos de 1 semana a 4°C o a -20°C durante periodos más largos.

iv) Se incuban las monocapas celulares con MAb anti VAIS en una dilución adecuada en PBS durante 1 hora, y se lavan dos veces con PBS/Tween 20 al 0,05%. Si se observa unión inespecífica, se incuban con PBS que contenga leche en polvo desnatada al 0,5%

v) Se incuban durante 1 hora con anticuerpos de cabra anti Ig de ratón y conjugados con ITCF, (o, en el caso de anticuerpos generados en conejos como anticuerpo primario, se utilizarán anticuerpos anti Ig de conejo conjugados con ITCF), según las instrucciones del proveedor. Para aumentar la sensibilidad, los anticuerpos de cabra anti Ig de ratón conjugados con ITCF

pueden sustituirse por anticuerpos anti Ig de ratón marcados con biotina y estreptavidina marcada con ITCF con el lavado descrito antes del paso adicional. Se lava una vez con PBS/Tween20 al 0,05%, como se ha descrito anteriormente. Los núcleos se pueden teñir con yoduro de propidio a una concentración de 100 µg ml^{-1} en agua destilada estéril). Se añade PBS (sin Tween 20) y se examina con luz UV. Para evitar la decoloración, las placas teñidas deben guardarse en la oscuridad hasta que se examinen. Si es necesario guardarlas durante un largo periodo de tiempo (más de 2-3 semanas), puede añadirse una solución de 1,4-diazabiciclo octano (DABCO al 2,5% en PBS, pH 8,2) o un reactivo similar, como solución anti-decoloración.

4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

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

Los cebadores descritos abajo para la RT-PCR y la PCR en tiempo real detectarán tanto el VAIS de HPR delecionada europeo como el americano, así como el VAIS HPR0.

La RT-PCR se puede utilizar para la detección del VAIS a partir de ARN total (o ácido nucleico total) extraído de los órganos/tejidos recomendados (véase el apartado 3.4). La RT-PCR en tiempo real par la detección del VAIS se recomienda porque aumenta la especificidad y, probablemente, también la sensibilidad de la prueba. Aunque se han notificado varios conjuntos de cebadores para la RT-PCR en tiempo real de detección del VAIS, los conjuntos de cebadores recomendados son los que se indican en la tabla. Los conjuntos de cebadores derivados de los segmentos genómicos 8 y 7 se han utilizado en varios laboratorios y se ha observado que resultan útiles para la detección del VAIs durante brotes de la enfermedad y en peces portadores aparentemente sanos.

Con la aparición generalizada de variantes del VAIS HPR0, es fundamental realizar un seguimiento de los resultados positivos en la PCR basada en conjuntos de cebadores del segmento 7 u 8 mediante secuenciación de la HPR del segmento 6 para determinar de qué variante del VAIS HPR se trata en cada caso (HPR delecionada, HPR0 o ambas). En la siguiente tabla se indican los cebadores adecuados, diseñados y validados por el Laboratorio de Referencia de la OIE. La validación del conjunto de cebadores del HPR para las cepas aisladas en Norteamérica presenta la limitación de que en el Genbank se dispone de pocos datos relativos al extremo 3' del segmento 6 del VAIS.

Los cebadores de los segmentos 7 y 8, así como los cebadores de secuenciación del segmento 6 HPR se indican a continuación y también pueden utilizarse para un RT-PCR convencional en caso necesario.

RT-PCR en tiempo real: Secuencias del cebador y de la sonda	Denominación	Segmento genómico	Tamaño del producto	Referencia
5'-CAG-GGT-TGT-ATC-CAT-GGT-TGA-AAT-G-3' 5'-GTC-CAG-CCC-TAA-GCT-CAA-CTC-3' *5'-6FAM*-CTC-TCT-CAT-TGT-GAT-CCC-*MGBNFQ-3'*	Debador directo Cebador inverso Taqman®probe	7	155 nt	Snow *et al*., 2006
5'-CTA-CAC-AGC-AGG-ATG-CAG-ATG-T-3' 5'-CAG-GAT-GCC-GGA-AGT-CGA-T-3' *5'-6FAM*-CAT-CGT-CGC-TGC-AGT-TC-*MGBNFQ-3'*	Debador directo Cebador inverso Taqman®probe	8	104 nt	Snow *et a*l., 2006
5'-GAC-CAG-ACA-AGC-TTA-GGT-AAC-ACA-GA-3' 5'-GAT-GGT-GGA-ATT-CTA-CCT-CTA-GAC-TTG-TA-3'	Debador directo Cebador inverso	6 (HPR)	304 nt if HPR0	Designed by OIE Ref. Lab.

4.3.1.2.4. Purificación del agente

El VAIS propagado en cultivo celular puede purificarse mediante centrifugación con gradiente de sacarosa (Falk *et al*., 1997) o mediante purificación por afinidad utilizando perlas inmunomagnéticas recubiertas con MAb anti VAIS.

4.3.2. Métodos serológicos

Tanto el salmón del Atlántico como la trucha arco iris desarrollan una respuesta inmunitaria humoral a la infección con el VAIS. Se han creado enzimoinmunoanálisis (ELISA) con virus purificado o lisados de cultivos celulares infectados con el VAIS para la detección de anticuerpos específicos del VAIS.

Los títulos de ELISA pueden ser muy altos y parecer bastante específicos de la nucleoproteína en inmunoelectrotransferencias (K. Falk, comunicación personal). La prueba no está estandarizada para la vigilancia ni el diagnóstico, pero puede utilizarse como complemento para la detección directa del virus y la enfermedad en casos ambiguos. Además, el nivel y la distribución de la seroconversión en una población infectada por el VAIS puede dar cierta información sobre la transmisión de la infección, sobre todo en casos en que no se vacuna, y en peces salvajes.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

Los métodos actualmente disponibles para la vigilancia dirigida de la infección por el VAIS de HPR delecionada y para el diagnóstico de la AIS se detallan en la Tabla 5.1. Para la vigilancia de la infección por el VAIS de HPR0, la RT-PCR en tiempo real seguida de una secuenciación es el único método recomendado (no se incluye en la tabla). 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 de la infección por el VAIS de HPR delecionada				Diagnóstico provisional de la AIS	Diagnóstico confirmativo de la AIS
	Alevines	Pintos	Esguines	Adultos		
Signos macroscópicos	d	d	d	d	c	b
Histopatología	d	d	d	b	b	b
IFAT en improntas de riñón	c	c	c	c	b	a
Inmunohistoquímica	c	c	c	c	b	a
Aislamiento en cultivo celular con identificación del virus	a	a	a	a	a	a
RT-PCR o RT-PCR en tiempo real seguida de secuenciación	a	a	a	a	b	a

*Dado que el diagnóstico de la AIS no se basa en los resultados de una sola prueba, la información de esta Tabla debe utilizarse con cautela. En el apartado 7 se indican los criterios de diagnóstico de la AIS
PL = postlarvas; IFAT = prueba de inmunofluorescencia indirecta; 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 del virus de la anemia infecciosa del salmón

Cuando se observa una alta mortalidad asociada a uno de los signos clínicos dados y/o alteraciones anatomopatológicas compatibles con la AIS, las inspecciones sanitarias periódicas junto con pruebas de detección de la AIS son una forma eficiente de obtener datos sobre la aparición de la AIS en poblaciones de piscifactoría. Además de las inspecciones sanitarias periódicas, pueden llevarse a cabo pruebas de detección del VAIS de HPR delecionada, preferiblemente mediante metodología basada en la PCR, a determinados intervalos. Sin embargo, debido a la esperable baja prevalencia en poblaciones aparentemente sanas y a la propagación no uniforme de la infección dentro de una piscifactoría determinada, deben analizarse muestras de un tamaño estadísticamente apropiado. No está clara la importancia de un hallazgo positivo de VAIS mediante una mera PCR en cuanto a riesgo de aparición de la AIS, y por tanto en todo hallazgo positivo deberá realizarse un seguimiento mediante otras pruebas y/o una vigilancia del lugar de producción.

Dado el perfil transitorio del VAIS HPR0, para poder documentar la ausencia de esta infección deben analizarse cantidades de muestras estadísticamente apropiadas en distintos momentos del ciclo de producción.

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

A continuación se indican motivos razonables de sospecha de que los peces estén infectados por el VAIS (con HPR delecionada o HPR0. Las autoridades competentes deben asegurarse de que, ante la sospecha de peces infectados por el VAIS en una piscifactoría, debe llevarse a cabo una investigación oficial para confirmar o descartar la presencia de la enfermedad cuanto antes, aplicando inspección y exploración física, así como obteniendo y escogiendo muestras y aplicando los métodos de examen de laboratorio descritos en el apartado 4.

7.1. Definición de caso sospechoso (HPR delecionada)

Se sospechará de AIS o de infección por el VAIS de HPR delecionada si se cumple al menos uno de los siguientes criterios:

i) Signos clínicos compatibles con la AIS y/o alteraciones anatomopatológicas compatibles con la AIS (apartado 4.2) tanto si las alteraciones anatomopatológicas se asocian a signos clínicos de enfermedad como si no;

ii) Aislamiento e identificación del VAIS en un cultivo celular a partir de una sola muestra (buscada o aleatoria) de cualquier pez de la piscifactoría, como se describe en el apartado 4.3.1.2.1;

iii) Indicios de la presencia del VAIS en dos pruebas de laboratorio independientes, como la RT-PCR (apartado 4.3.1.2.3) y/o IFAT en improntas de tejido (apartado 4.3.1.1.2.1) o la IHC (apartado 4.3.1. 1.3.1).

7.2. Definición de caso confirmado (HPR delecionada)

7.2.1. Definición de AIS confirmada

Para confirmar un caso de AIS deben cumplirse los siguientes criterios: detección del VAIS en preparaciones de tejido mediante anticuerpos específicos contra el VAIS (IHC en cortes fijados [apartado 4.3.1.1.3.1] o IFAT en improntas de tejido [apartado 4.3.1.1.2] o cortos fijados como se describe en el apartado 4.3.1.1.3) además de:

i) aislamiento e identificación del VAIS en cultivo celular a partir de al menos una muestra de cualquier pez de la piscifactoría, como se describe en el apartado 4.3.1.2.1

o

ii) detección del VAIS mediante RT-PCR por los métodos descritos en el apartado 4.3.1.2.3;

7.2.2 Definición de infección por el VAIS confirmada (HPR delecionada)

Para confirmar una infección por el VAIS de HPR delecionada deben cumplirse los criterios de i) o ii).

i) Aislamiento e identificación del VAIS en cultivo celular de cualquier muestra de peces de la piscifactoría, como se describe en el apartado 4.3.1.2.1.

ii) Aislamiento e identificación del VAIS en cultivo celular de al menos una muestra de cualquier pez de la piscifactoría con indicios confirmativos del VAIS en preparaciones tisulares utilizando la RT-PCR (apartado 4.3.1.2.3) o IFAT/IHC (apartados 4.3.1.1.2 y 4.3.1.1.3).

7.3. Definición de infección por el VAIS confirmada (HPR0)

Para confirmar la infección por el VAIS de HPR0 deben cumplirse los criterios del apartado i).

i) Detección del VAIS por RT-PCR seguida de una amplificación y secuenciación independientes de la región HPR del segmento 6 para confirmar la presencia de solo HPR0.

8. Bibliografía

AAMELFOT M., DALE O.B., WELI S., KOPPANG E.O. & FALK K. (2012). Expression of 4-O-acetylated sialic acids on Atlantic salmon endothelial cells correlates with cell tropism of Infectious salmon anemia virus. *J.Virol.,* **86**, 10571–10578.

ALDRIN M., LYNGSTAD T.M., KRISTOFFERSEN A.B., STORVIK B., BORGAN O. & JANSEN P.A. (2011). Modelling the spread of infectious salmon anaemia among salmon farms based on seaway distances between farms and genetic relationships between infectious salmon anaemia virus isolates. *J.R. Soc. Interface*, **8**, 1346–1356.

BIACCHESI S., LE BERRE M., LE GUILLOU S., BENMANSOUR A., BREMONT M., QUILLET E. & BOUDINOT P. (2007). Fish genotype significantly influences susceptibility of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), to waterborne infection with infectious salmon anaemia virus. *J. Fish Dis*., **30**, 631–636

CHRISTIANSEN D.H., ØSTERGAARD P.S., SNOW M., DALE O.B & FALK K. (2011). A low-pathogenic variant of infectious salmon anemia virus (ISAV1 - HPR0) is highly prevalent and causes a non-clinical transient infection in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in the Faroe Islands. *J. Gen. Virol.,* **92**, 909–918.

COTTET L., RIVAS-ARAVENA A., CORTEZ-SAN MARTIN M., SANDINO A.M. & SPENCER E. (2011) Infectious salmon anemia virus – genetics and pathogenesis. *Virus Res.,* **155**, 10-19.

CLOUTHIER S.C., RECTOR T., BROWN N.E.C. & ANDERSON E.D. (2002). Genomic organization of infectious salmon anaemia virus. *J. Gen. Virol.,* **83**, 421–428.

CUNNINGHAM C.O., GREGORY A., BLACK J., SIMPSOM I. & RAYNARD R.S. (2002). A novel variant of the infectious salmon anaemia virus (ISAV) haemagglutinin gene suggests mechanisms for virus diversity. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol*., **22**, 366–374.

DANNEVIG, B.H., FALK, K. & NAMORK E. (1995). Isolation of the causal virus of infectious salmon anemia (ISA) in a long-term cell line from Atlantic salmon head kidney. *J. Gen. Virol.*, **76**, 1353–1359.

DEVOLD M., KARLSEN M. & NYLUND A. (2006). Sequence analysis of the fusion protein gene from infectious salmon anemia virus isolates: evidence of recombination and reassortment. *J. Gen. Virol.*, **87**, 2031–2040.

DEVOLD M., KROSSOY B., ASPEHAUG V. & NYLUND A. (2000). Use of RT-PCR for diagnosis of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in carrier sea trout *Salmo trutta* after experimental infection. *Dis. Aquat. Org*., **40**, 9–18.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2012) EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW); Scientific Opinion on infectious salmon anaemia. *EFSA Journal*, **10** (11), 2971.

FALK K., NAMORK E., RIMSTAD E., MJAALAND S. & DANNEVIG B.H. (1997). Characterization of infectious salmon anemia virus, an orthomyxo-like virus isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar L*)*. J. Virol*., **71**, 9016–9023.

GJØEN H.M., REFSTIE T., ULLA O. & GJERDE B. (1997). Genetic correlations between survival of Atlantic salmon in challenge and field tests. *Aquaculture*, **158**, 277–288.

GUSTAFSON L.L., ELLIS S.K., BEATTIE M.J., CHANG B.D., DICKEY D.A., ROBINSON T.L., MARENGHI F.P., MOFFETT P.J. & PAGE F.H. (2007). Hydrographics and the timing of infectious salmon anemia outbreaks among Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) farms in the Quoddy region of Maine, USA and New Brunswick, Canada. *Prev. Vet. Med.*, **78**, 35–56.

KAWAOKA Y., COX N.J., HALLER O., HONGO S., KAVERIN N., KLENK H.D., LAMB R.A., MCCAULEY J., PALESE P., RIMSTAD E. & WEBSTER R.G. (2005). Infectious Salmon Anaemia Virus. *In:* Virus Taxonomy – Eight Report of the International Committee on Taxonomy Viruses, Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A., eds. Elsevier Academic Press, New York, USA, pp 681–693.

KIBENGE F.S.B., GARATE O.N. JOHNSON G., ARRIAGADA K., KIBENGE M.J.T. & WADOWAKA D. (2001). Isolation and identification of infectious salmon anaemia virus (ISAV) from Coho salmon in Chile. *Dis. Aquat. Org.*, **45,** 9–18.

KIBENGE F.S.B., GODOY M.G., WANG Y., KIBENGE M.J.T., GHERARDELLI V., MANSILLA S., LISPERGER A., JARPA M., LARROQUETE G., AVENDAÑO F., LARA M. & GALLARDO A. (2009). Infectious salmon anaemia virus (ISAV) isolated from the ISA disease outbreaks in Chile diverged from ISAV isolates from Norway around 1996 and was disseminated around 2005, based on surface glycoprotein gene sequences. *Virol. J*., **6**, 88.

KIBENGE F.S.B., KIBENGE M.J.T., WANG Y., QIAN B., HARIHARAN S. & MCGEACHY S. (2007). Mapping of putative virulence motifs on infectious salmon anaemia virus surface glycoprotein genes. *J. Gen. Virol*., **88**, 3100–3111.

KIBENGE F.S.B., MUNIR K., KIBENGE M.J.T., MONEKE T.J. & MONEKE E. (2004). Infectious salmon anemia virus: causative agent, pathogenesis and immunity. *Anim. Health Res. Rev.*, **5**, 65–78.

KULSHRESHTHA V., KIBENGE M., SALONIUS K., SIMARD N., RIVEROLL A. & KIBENGE F. (2010). Identification of the 3' and 5' terminal sequences of the 8 RNA genome segments of European and North American genotypes of infectious salmon anaemia virus (an orthomyxovirus) and evidence for quasispecies based on the non-coding sequences of transcripts. *Virol. J.,* **7**, 338.

LYNGSTAD T.M., HJORTAAS M.J, KRISTOFFERSEN A.B, MARKUSSEN T., KARLSEN E.T., JONASSEN C.M. & JANSEN P.A. (2011). Use of molecular epidemiology to trace transmission pathways for infectious salmon anaemia virus (ISAV) in Norwegian salmon farming. *Epidemics,* **3**, 1–11.

LYNGSTAD T.M., ., KRISTOFFERSEN A. B., HJORTAAS M. J., DEVOLD, M., ASPEHAUG, V., LARSSEN, R. B. & JANSEN, P. A. (2012). Low virulent infectious salmon anaemia virus (ISAV-HPR0) is prevalent and geographically structured in Norwegian salmon farming. *Dis. Aquat. Org*., **101**, 197–206.

LYNGSTAD T.M., JANSEN P.A., SINDRE H., JONASSEN C.M., HJORTAAS M.J., JOHNSEN S. & BRUN E. (2008). Epidemiological investigation of infectious salmon anaemia (ISA) outbreaks in Norway 2003–2005. *Prev. Vet. Med.,* **84**, 213–227.

MACLEAN S.A., BOUCHARD D.A. & ELLIS S.K. (2003). Survey of non-salmonid marine fishes for detection of infectious salmon anemia virus and other salmonid pathogens. *In:* Technical Bulletin 1902. International Response to Infectious Salmon Anemia: Prevention, Control and Eradication, Miller O. & Cipriano R.C., eds. USDA, APHIS; US Dept Interior, US Geological Survey; US Dept Commerce, National Marine Fisheries Service, Washington DC, USA, 135–143.

MARDONES F.O., MARTINEZ-LOPEZ B., VALDES-DONOSO P., CARPENTER T.E. & PEREZ A.M. (2014). The role of fish movements and the spread of infectious salmon anemia virus (ISAV) in Chile, 2007–2009. *Prev. Vet. Med*. (in press)

MARDONES F.O., PEREZ A.M., VALDES-DONOSO P. & CARPENTER T.E. (2011). Farm-level reproduction number during an epidemic of infectious salmon anaemia virus in southern Chile in 2007–2009. *Prev. Vet. Med.*, **102** (3), 175–184.

MARKUSSEN T., JONASSEN C.M., NUMANOVIC S., BRAAEN S., HJORTAAS M., NILSEN H. & MJAALAND S. (2008). Evolutionary mechanisms involved in the virulence of infectious salmon anaemia virus (ISAV), a piscine orthomyxovirus. *Virology,* **374**, 515–527.

MCBEATH A. J., BAIN N. & SNOW M. (2009). Surveillance for infectious salmon anaemia virus HPR0 in marine Atlantic salmon farms across Scotland. *Dis. Aquat. Org.,* **87**, 161–169.

MJAALAND S., HUNGNES O., TEIG A., DANNEVIG B.H., THORUD K. & RIMSTAD E. (2002). Polymorphism in the infectious salmon anemia virus hemagglutinin gene; importance and possible implications for evolution and ecology of infectious salmon anemia disease. *Virology*, **302**, 379–391.

MJAALAND S., MARKUSSEN T., SINDRE H., KJOGLUM S., DANNEVIG B.H., LARSEN S. & GRIMHOLT U. (2005). Susceptibility and immune responses following experimental infection of MHC compatible Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with different infectious salmon anaemia virus isolates. *Arch. Virol*., **150**, 2195–2216.

MJAALAND S., RIMSTAD E., FALK K. & DANNEVIG B.H. (1997). Genomic characterisation of the virus causing infectious salmon anemia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L): an orthomyxo-like virus in a teleost. *J. Virol*., **71**, 7681–7686.

MULLINS J.E, GROMAN D.B & WADOWSKA D (1998) Infectious salmon anaemia in salt water Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in New Brunswick, Canada. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.,* **18**, 110–114.

NYLUND A., PLARRE H., KARLSEN M., FRIDELL F., OTTEM K.F., BRATLAND A.,& SAETHER P.A. (2007). Transmission of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in farmed populations of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Arch. Virol.*, **152**, 151–179.

PLARRE H., DEVOLD M., SNOW M. & NYLUND A. (2005). Prevalence of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in wild salmonids in western Norway. *Dis. Aquat. Org.*, **66**, 71–79.

RIMSTAD E., DALE O.B., DANNEVIG B.H. & FALK K. (2011). Infectious Salmon Anaemia. *In*: Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections, Woo P.T.K. & Bruno D., eds. CAB International, Oxfordshire, UK, 143–165.

RIVAS-Aravena A., VALLEJOS-VIDAL E., MARTIN M.C., REYES-LOPEZ F., TELLO M., MORA P., SANDINO A.M., SPENCER E. (2011). Inhibitory effect of a nucleotide analog on ISAV infection. *J. Virol*., **85**, 8037–8045.

SNOW M., MCKAY P., MCBEATH A. J. A., BLACK J., DOIG F., KERR R., CUNNINGHAM C. O., NYLUND A. & DEVOLD M. (2006). Development, application and validation of a taqman® real-time RT-PCR assay for the detection of infectious salmon anaemia virus(ISAV) in Atlantic salmon (*Salmo salar*), Vannier P. & Espeseth D., eds. New Diagnostic Technology: Applications in Animal Health and Biologics Controls. *Dev. Biol*., Basel, Karger. **126**, 133–145.

THORUD K.E. & DJUPVIK H.O. (1988). Infectious salmon anaemia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L)*. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.,* **8**, 109–111.

*
* *

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la Infección por el virus de la anemia infecciosa del salmón (puede consultarse 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 la anemia infecciosa del salmón, por favor contactar con los Laboratorios de Referencia de la OIE.

CAPÍTULO 2.3.6.

HERPESVIROSIS DE LA CARPA KOI

1. Ámbito de aplicación

La herpesvirosis de la carpa koi (HCK) es una infección por un herpesvirus (Hedrick *et al*., 2000) capaz de inducir una viremia contagiosa y aguda en la carpa común (*Cyprinus carpio*) y en variedades como la carpa koi o la carpa goi (Haenen *et al.,* 2004).

2. Información sobre la enfermedad

2.1. Factores del agente

2.1.1. El agente patógeno, cepas del agente

El agente patógeno es el herpesvirus de la carpa koi (HVK) de la familia Alloherpesviridae (Haramoto *et al*., 2007; Waltzek *et al.,* 2009), aunque antes de la clasificación taxonómica, también se denominaba virus de la nefritis intersticial y la necrosis de las branquias de la carpa (Ilouze *et al.,* 2010). Waltzek *et al.* (2005) proporcionaron indicios que respaldaron la clasificación de este virus como un herpesvirus, y lo denominaron herpesvirus de los ciprínidos tipo 3 (HVCy-3), siguiendo la nomenclatura de otros herpesvirus de ciprínidos: HVCy-1 (virus de la viruela de la carpa, virus del papiloma de los peces) y HVCy-2 (virus de la necrosis hematopoyética del pez rojo). El análisis de la secuencia de una parte del genoma ha puesto de manifiesto que el HVK está estrechamente relacionado con el HVCy-1 y el HVCy-2, y lejanamente relacionado con el virus del bagre de canal (herpesvirus de los ictalúridos tipo 1: IcHV-1) y herpesvirus de los ránidos tipo 1 (ranas) (RaHV-1) (Waltzek *et al.,* 2005). Aoki *et al.* (2007) han descrito la secuencia del genoma complete del HVK y han identificado 156 genes que codifican proteínas únicas. Sugirieron que el hallazgo de que los 15 genes del HVK son homólogos con genes del IcHV-1 confirma la propuesta de clasificar al HVK en la familia Herpesviridae. En los viriones maduros hay cuarenta proteínas víricas y 18 proteínas celulares (Michel *et al.,* 2010). Recientemente, el HVCy-3 se ha designado la especie tipo del nuevo género Cyprinivirus dentro de la familia Alloherpesviridae, que también contiene HVCy-1 y HVCy-2. Las primeras estimaciones del tamaño del genoma del HVK oscilaban entre al menos 150 kpb y 277 kpb, pero ahora se ha confirmado que tiene un tamaño de 295 kpb. Se ha observado que el tamaño de las nucleocápsidas del virus es de 100-110 nm de diámetro y están envueltos por una envoltura (Ilouze *et al.,* 2010).

Las comparaciones de los genomas de las cepas del HVK de distintas zonas geográficas mediante análisis por enzima de restricción (Haenen *et al.,* 2004) o análisis de la secuencia de nucleótidos (Sano *et al.,* 2004) han mostrado que son prácticamente idénticos. De igual forma, los polipéptidos de cepas del HVK de distintas zonas geográficas eran similares, aunque una cepa de Israel tenía dos polipéptidos adicionales (Gilad *et al.,* 2003). Aoki *et al.* (2007) compararon las secuencias del genoma complete de tres cepas del HVK aisladas de Japón, Israel y EE.UU. Se observó que os genomas eran muy similares entre ellos a nivel de secuencia (>99%), estando las cepas de Israel y de EE.UU. más estrechamente relacionadas entre ellas que ninguna de las dos con la de Japón. Las tres cepas se interpretaron como originadas a modo de dos linajes (J y U/I) a partir de una cepa progenitora tipo salvaje. No obstante, estudios posteriores realizados en Japón sugieren que los linajes no tienen relación genética directa y que llegaron por vías independientes a esas zonas y causaron epidemias del HVK (Revisado por Ilouze *et al*. 2010). Un estudio más reciente realizado en Francia ha identificado un tercer intermediario entre los linajes J y U/I y ha sugerido que los tres linajes del HVCy-3 se introdujeron en Europa el año 2001 mediante carpas koi importadas (Bigarré *et al.,* 2009). Más recientemente, se ha descubierto otro linaje intermediario que podría haber emergido en Indonesia (Sunarto*et al.,* 2011).

2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

Estudios llevados a cabo en Israel han mostrado que el HVK sigue activo en agua durante al menos 4 horas, pero durante 21 horas, a temperaturas del agua de 23-25°C (Perelberg *et al.,* 2003). Estudios realizados en Japón han mostrado una significativa reducción del título infectivo del HVK en un plazo de 3 días en muestras de agua o sedimento del ambiente a 15°C. No obstante, la infectividad se mantuvo más de 7 días cuando el HVK se expuso a muestras de agua similares que habían sido esterilizadas mediante autoclave o filtración (Shimizu *et al.,* 2006). El estudio también presentó indicios de la presencia de cepas bacterianas en el agua con actividad antivírica. Más recientemente, se ha detectado ADN de HVK en muestras de agua de río a temperaturas de 9-11°C, 4 meses antes de un brote de HCK en un río

(Haramoto *et al*., 2007). No obstante, la persistencia del virus podría haber contribuido a la presencia de vectores vivos y la detección del ADN puede no siempre ser indicativa de la presencia de virus infeccioso.

2.1.3. Estabilidad del agente

El virus se inactiva por radiación UV y temperaturas superiores a los 50°C durante 1 minuto. Lo siguientes desinfectantes también son eficaces para la inactivación: iodóforo a 200 mg/litro durante 20 minutos, cloruro de benzalconio a 60 mg/litro durante 20 minutos, alcohol etílico al 30% durante 20 minutos e hipoclorito de sodio a 200 mg/litro durante 30 segundos, todos ellos a 15°C (Kasai *et al.,* 2005).

2.1.4. Ciclo de vida

En informes anteriores, los investigadores han sugerido que las branquias constituyen la principal puerta de entrada del virus en la carpa (Dishon *et al.,* 2005; Gilad *et al.,* 2004; Pikarsky *et al*., 2004). Sin embargo, un estudio experimental más reciente ha puesto de manifiesto que la piel que recubre las aletas y el cuerpo de la carpa es la principal vía de entrada del HVK (Costes *et al.,* 2009). A continuación, se produce una diseminación sistémica del virus desde la piel y las branquias a los órganos internos y se han detectado altos niveles de ADN del HVK en el tejido de riñón, bazo, hígado e intestino (Dishon *et al.,* 2005; Pikarsky *et al*., 2004). Se ha descrito que la estructuración y morfogénesis del HVK en las células infectadas son iguales a las de otros herpesvirus. Un examen de la ultraestructura de carpas infectadas experimentalmente ha proporcionado indicios de que cápsidas inmaduras y nucleocápsidas maduras se estructuran en el núcleo y que el virión madura a continuación en el citoplasma de las células infectadas. Es muy evidente una hipersecreción de mucus en las primeras fases de infección por el HVK y se han detectado altos niveles de ADN del HVK en muestras de mucus tomadas de carpas infectadas experimentalmente (Gilad *et al.,* 2004). Este es un indicio más de la intervención activa de la piel en la patogenia vírica y de que constituye un importante lugar de excreción de virus. La excreción de virus por la orina y las heces también podría ser un importante mecanismo de excreción de virus. Se han detectado altos niveles de ADN del HVK en tejido intestinal y renal, y se ha detectado virus infeccioso en heces de carpas infectadas (Dishon *et al.,* 2005; Gilad *et al.,* 2004).

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Solo se han registrado infecciones por el HVK de forma natural en la carpa común (*Cyprinus carpio*) y variedades de esta especies (por ejemplo, la carpa koi. Se ha observado que híbridos de pez rojo x carpa común, obtenidos por hibridación de machos de pez rojo x hembras de carpa común, presentan cierta susceptibilidad a la infección por el HVK. Aunque la mortalidad fue baja (del 5%), alrededor de un 50% de estos híbridos examinados 25 días después de la inyección intraperitoneal de una dosis alta de HVK poseían ADN genómico vírico, que se detectó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Hedrick *et al*., 2006). En un estudio más reciente, la infección mediante inmersión en baño con distintas cepas del HVK causó una mortalidad del 35-42% en híbridos de pez rojo x carpa koi y de un 91-100% en un cruce de carpa cruciana x carpa koi. Los signos clínicos más destacados fueron úlceras cutáneas, producción excesiva de mucus y hemorragias en las aletas, y los signos más extensos se observaron en los híbridos de carpa cruciana x carpa koi. Se detectó ADN vírico en todos los casos de mortalidad de híbridos mediante PCR (Bergmann *et al.,* 2010).

Estudios recientes aportan cada vez más pruebas que indican que el pez rojo (*Carassius auratus*) es susceptible a la infección por el HVK. El transcrito de ARN del gen de la timidina kinasa vírica se ha detectado en branquias, encéfalo e intestino de pez rojo expuesto al HVK por cohabitación con carpas koi infectadas. A continuación, se observó que peces rojos de la misma población transmitían el HVK a carpas comunes nunca antes expuestas al virus al utilizar la fluctuación de las temperaturas del agua como factor estresante (El-Matbouli y Soliman, 2010). Bergmann *et al.* (2010a) también han observado la replicación del HVK en pez rojo tras la infección experimental por inmersión. Mediante PCR se detectó ADN de HVK en leucocitos extraídos de muestras de sangre de pez rojo (a los 45 días post-infección), así como por inmunofluorescencia indirecta (a los 60 días post-infección).

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

Todos los grupos de edad de los peces, desde los juveniles en adelante, parecen ser susceptibles a la HCK (Bretzinger *et al.,* 1999; Sano *et al.,* 2004) pero, en condiciones experimentales, peces de entre 2,5 y 6 gramos fueron más susceptibles que peces de 230 g (Perelberg *et al.,* 2003). Las larvas de carpa son resistentes a la infección por el HVK, pero las mismas carpas fueron susceptibles a la infección al llegar a la edad adulta (Ito *et al.,* 2007).

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

La carpa común o variedades de la misma, como la carpa koi o la carpa goi (koi x común) son más susceptibles y son las de elección para la detección del virus, seguidas de cualquier híbrido de carpa común que se encuentre en el lugar, como los de pez rojo x carpa común o los de carpa cruciana x carpa común.

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

Las branquias, el riñón y el bazo son los órganos en los que el HVK es más abundante durante el curso de una infección manifiesta (Gilad *et al.,* 2004).

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

Existen indicios que apuntan a que los supervivientes a la HCK quedan infectados con el virus de manera persistente y que pueden retener el virus durante largos periodos de tiempo. Se ha observado que el virus persisten en carpas comunes infectadas experimentalmente a una temperatura permisiva y mantenidas a continuación a una temperatura inferior a la permisiva (St-Hilaire *et al.,* 2005). Más recientemente, se han presentado indicios de persistencia del HVK en la carpa común en un estudio en el que se ha determinado la distribución del virus en una población salvaje de carpa común. Investigadores japoneses llevaron a cabo en 2006 un estudio, mediante PCR y serología, del HVK en el lago Biwa en 2006 (Uchii *et al.,* 2009), donde se habían notificado brotes episódicos de HCK en los 2 años posteriores a un brote importante que había tenido lugar en el 2004. Análisis posteriores de la población superviviente mostraron que el 54% de las carpas más viejas eran seropositivas y que un 31% eran positivas según la PCR. El mantenimiento de altos niveles de anticuerpos contra el virus sugiere que podría estar reactivándose virus latente periódicamente, reforzando la respuesta inmunitaria.

2.2.6. Vectores

El agua es el principal vector abiótico. Sin embargo, en la transmisión también pueden intervenir vectores vivos (como otras especies de peces, invertebrados parásitos y aves y mamíferos piscívoros) y fómites.

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

Existen indicios que apuntan a que otras especies de peces y ciertos invertebrados acuáticos son posibles vectores del HVK. Se ha detectado el ADN vírico en tejidos de pez rojo sano tras la cohabitación con carpa koi infectada experimentalmente con el HVK y también en pez rojo expuesto durante epizootias naturales del HVK en carpa koi (Ilouze *et al.,* 2010). En estudios realizados en Alemania, se ha detectado HVK mediante PCR anidada en distintas variedades de pez rojo (rojo, cabeza de león y shubunkin) así como en carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*), cacho (*Leuciscus idus*) y bagre ornamental (*Ancistrus sp*.) (Bergmann *et al.,* 2009). La detección en el pez rojo y en la carpa herbívora se confirmó mediante hibridación *in-situ* utilizando distintos cebadores de los utilizados en la PCR. Además, en un estudio reciente realizado en Polonia, se detectó HVK mediante PCR en esturión ruso (*Acipenser gueldenstaedtii*) y en esturión del Atlántico (*A. oxyrinchus*) de piscifactorías de peces del norte de Polonia (Kempter *et al.,* 2009). Todas las muestras de esturiones se tomaron de piscifactorías en las que se criaba carpa común con antecedentes de brotes de HCK. La presencia, en branquias y tejido renal de esturiones, de proteína y genoma vírico del HVK se confirmaron mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta y la de hibridación *in-situ,* respectivamente.

También hay cada vez más indicios que apuntan a que invertebrados acuáticos podrían ser vectores del HVK. En estudios realizados en Japón se ha descrito la detección de ADN del HVK en muestras de plancton y en concreto en especies rotíferos (Minamoto *et al.,* 2010). Las muestras de plancton se obtuvieron en 2008 de Iba-naiko, una laguna poco profunda conectada con el lago Biwa, que es una zona que favorece el desove de las carpas. Análisis estadísticos pusieron de manifiesto una correlación positiva significativa entre el HVK del plancton y los números de rotíferos, y los autores sugirieron que el HVK se vincula al comportamiento de filtro alimentador de las especies rotíferas y/o se concentra debido a este comportamiento. En un informe anterior de un pequeño estudio realizado en Polonia, se detectó HVK en anodontes (*Anodonta cygnea*) y gambas de agua dulce (*Gammarus pulex*) (Kielpinski *et al.,* 2010). Los invertebrados se obtuvieron de estanques del sur de Polonia que habían sufrido brotes de HCK en sus poblaciones de carpa común a lo largo de 5 o 6 años. Se precisan otros estudios para determinar durante cuánto tiempo persiste el virus infeccioso en los invertebrados en ausencia de la especie hospedadora y también si el virus sigue se mantiene viable.

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mecanismos de transmisión

El mecanismo de transmisión del HVK es horizontal, pero actualmente no se puede descartar la transmisión "asociada a huevos" (que normalmente se denomina transmisión "vertical"). La transmisión horizontal puede ser directa (de pez a pez) o vectorial, en la cual el agua es el principal vector abiótico. Los reservorios de la HCK son peces infectados clínicamente y portadores ocultos del virus entre peces de piscifactoría, asilvestrados o salvajes. Se excreta virus virulento por las heces, la orina, las branquias y el mucus cutáneo. En condiciones experimentales, se ha observado que la carpa común infectada a 16°C excreta continuamente virus infeccioso durante periodos más largos de tiempo que a 23°C o a 28°C (Yuasa *et al.,* 2008). El curso de la enfermedad puede ser rápido, en concreto a temperaturas óptimas (23-25°C), pero menos rápido a temperaturas inferiores a los 23°C. La enfermedad se podría manifestar por sí misma 3 días después de añadir peces no expuestos anteriormente al virus a un estanque con peces enfermos, pero otros investigadores han indicado que se tardan 8 a 21 días en observar la enfermedad en dichos peces no expuestos anteriormente al virus (Bretzinger *et al.,* 1999; Hedrick *et al*., 2000).

2.3.2. Prevalencia

Hay pocas observaciones publicadas sobre la prevalencia del virus en poblaciones de carpa salvajes ni de piscifactoría. Existen indicios observados en pruebas experimentales de la persistencia del virus en carpas comunes infectadas a una temperatura permisiva y posteriormente mantenidas a una temperatura inferior a la permisiva (St-Hilaire *et al.,* 2005; véase el apartado 2.2.5). El análisis de muestras de suero sanguíneo del estudio mostró que una parte de las carpas (al menos un 10-25%) presentó altos títulos de anticuerpos y que la respuesta inmunitaria fue detectable durante varios meses (St-Hilaire *et al.,* 2009). En otros estudios, se detectó ADN vírico en carpas mediante PCR, en ausencia de enfermedad, a 13°C y es posible que peces infectados supervivientes a bajas temperaturas puedan actuar como reservorios del virus (Gilad *et al.,* 2004). En poblaciones salvajes que han sobrevivido a un brote de HVK hay indicios de una alta prevalencia de carpas seropositivas. En el estudio realizado con PCR sobre los anticuerpos contra el HVK en el lago Biwa del 2006, análisis posteriores de la población de carpas supervivientes mostraron que un 54% de las carpas más viejas eran seropositivas y que un 31% eran positivas según la PCR (Uchii *et al.,* 2009). Como parte de un estudio de la distribución del HVK en el Inglaterra y Gales, en 2007 se visitaron cuatro lugares en los que habían tenido lugar brotes clínicos del HVK en 2006 y en los que no se habían realizado introducciones de peces desde ese momento, y en ellos se comprobó si había anticuerpos contra el HVK mediante enzimoinmunoanálisis (ELISA) (Talyor *et al.,* 2010). Tres de estos lugares produjeron resultados positivos y mostraron un 85 a 93% de seroprevalencia en las muestras de la población de carpas supervivientes. El cuarto lugar dio resultados negativos.

2.3.3. Distribución geográfica

Tras los primeros informes de la HCK en Israel y Alemania en 1998 y la detección de ADN del HVK en muestras de tejido tomadas durante un episodio de mortalidad masiva de carpas en el Reino Unido en 1996 (Bretzinger *et al.,* 1999; Perelberg *et al.,* 2003), la distribución geográfica de la enfermedad se ha ampliado. La enfermedad se ha extendido a muchos países de todo el mundo, sobre todo a través del comercio en la carpa koi, antes de que se supiera lo que se conoce actualmente sobre la enfermedad y de que se dispusiera de medios para detectarla. Ahora se sabe que tiene lugar, o se ha registrado, en peces importados al menos a 28 países distintos. En Europa, el HVK se ha detectado en muchos países de todo el continente (Bergmann *et al.,* 2006; Haenen *et al.,* 2004; Novotny *et al.,* 2010). Más recientemente, se han notificado a la OIE brotes de HCK desde Rumanía, Eslovenia, España y Suecia. En Asia, China (Hong Kong), Taipei chino, Indonesia, Japón, Corea (Rep. de), Malasia (), Singapur (en peces importados de Malasia) y Tailandia (Haenen *et al.,* 2004; Ilouze *et al.,* 2010; Pikulkaew *et al.,* 2009; Sano *et al.,* 2004). En cuanto al resto del mundo, en Sudáfrica, Canadá y EE.UU. (Garver *et al.,* 2010; Haenen *et al.,* 2004; Hedrick *et al*., 2000) se han registrado casos de HCK. Es probable que el virus esté presente en muchos más países, pero hasta ahora no se ha identificado ni notificado.

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

La morbilidad de las poblaciones afectadas puede ser del 100% y la mortalidad, del 70-80%, pero esta última puede alcanzar incluso el 90 o el 100% (Bretzinger *et al.,* 1999; Haenen *et al.,* 2004). En carpas enfermedad a menudo se observan infecciones bacterianas y/o parasitarias secundarias y concomitantes, y pueden afectar a la mortalidad y a la presentación de signos clínicos de la enfermedad (Haenen *et al.,* 2004).

2.3.5. Factores ambientales

Los patrones de la enfermedad están influidos por la temperatura del agua, la virulencia del virus, la edad y el estado de los peces, la densidad de población y factores estresantes (como el transporte, el desove

o una mala calidad del agua). La enfermedad depende de la temperatura, y tiene lugar a 16 a 25°C (Haenen *et al.,* 2004; Hedrick *et al*., 2000; Perelberg *et al.,* 2003; Sano *et al.,* 2004). En condiciones experimentales, la enfermedad ha causado alta mortalidad a 28°C pero no a 29 ni a 30°C, así como tampoco a 13°C (Gilad *et al.,* 2004; Ilouze *et al.,* 2010). Sin embargo, se detectó ADN vírico en los peces mediante PCR a 13°C, y es posible que peces infectados que sobreviven a bajas temperaturas puedan ser reservorios del virus (Gilad *et al.,* 2004).

2.4. Control y prevención

Los métodos de control y prevención de la HCK deben basarse principalmente en evitar la exposición al virus y en unas buenas prácticas de higiene y bioseguridad. Esto es factible en piscifactorías pequeñas a las que se suministra agua de pozos entubados o de manantial y que dispongan de un sistema de seguridad para evitar que entren peces a la piscifactoría con el agua de descarga.

2.4.1. Vacunación

Actualmente no se dispone de ninguna vacuna inocua y eficaz. Sin embargo, se han utilizado virus vivos atenuados para vacunar carpas y proteger a los peces de la exposición al virus. La preparación de la vacuna indujo la formación de anticuerpos contra el virus y la protección duró al menos 8 meses (Ilouze *et al.,* 2010). La vacuna se autorizó para una utilización de emergencia en Israel y se ha utilizado mucho en piscifactorías de carpas de todo el país. En estudios realizados en Japón se observó que la administración por vía oral de una vacuna basada en lisosomas que contenía HVK inactivado era eficaz para proteger a las carpas contra la infección por el HVK (Ilouze *et al.,* 2010).

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

No es aplicable.

2.4.3. Inmunoestimulación

Actualmente no se dispone de información publicada sobre la utilización de inmunoestimulantes para el control de la HCK en las carpas. Sin embargo, se sabe que existe un campo de interés en la investigación.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

Se ha observado una resistencia distinta en cada cepa de carpa. En estudios de selección genética a favor de la resistencia, se expuso a infección experimental o natural la descendencia de cruces de dos cepas de carpas domesticadas y una cepa de carpa salvaje. La menor supervivencia observada fue de alrededor del 8%, pero la supervivencia de la cepa más resistente fue del 61-64% (Aspira *et al.,* 2005). En un estudio más reciente sobre la resistencia, 96 familias derivadas de un cruce de dos alelos de cuatro cepas europeas/asiáticas de carpa común fueron expuestas experimentalmente al HVK. Las supervivencias de los cinco cruces más resistentes en la prueba final de exposición al virus oscilaron entre el 42,9 y el 53,4% (Dixon *et al.,* 2009).

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

No se han notificado brotes naturales de la HCK en las especies de carpas herbívoras criadas más habituales, como la carpa plateada (*Hypophthalmichthys molitrix*), la carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*), o la carpa cabezona (*Aristichthys nobilis*). Las especies de carpas herbívoras a menudo se crían en policultivo con carpa común, pero en estas especies no se han observado signos de la enfermedad ni mortalidad, ni en condiciones de policultivo normal ni tras la cohabitación experimental con peces infectados, ni tras la exposición directa al virus (Ilouze *et al.,* 2010). Los híbridos de carpa común también constituyen un posible método de control para prevenir pérdidas importantes debidas a la HCK. En estudios sobre una población de híbridos de macho de pez rojos x hembras de carpa común se observó que eran resistentes a la HCK (Hedrick *et al*., 2006). Estos híbridos presentan un crecimiento rápido y tienen un aspecto morfológico más similar a sus progenitores maternos. Sin embargo, se ha detectado ADN del HVK mediante PCR en híbridos supervivientes, lo cual sugiere que son posibles portadores del virus (Hedrick *et al*., 2006). Por el contrario, en un estudio realizado en Polonia se observó una mortalidad del 35-42% en híbridos de pez rojo x carpa koi y del 91-100% en híbridos de carpa cruciana x carpa koi, expuestos al HVK mediante inmersión en baño (Bergmann *et al.,* 2010; véase el apartado 2.2.1). Puede haber un alto nivel de variación genética entre híbridos de distintos cruces y, en consecuencia, una variación en la resistencia al HVK. Esto dependería en gran medida de la cepa de carpa común o carpa koi utilizada. Se ha observado que los niveles de resistencia a la HCK varían en función de las cepas de carpa común utilizadas (Dixon *et al.,* 2009; Shapira *et al.,* 2005).

2.4.6. Agentes bloqueantes

No son aplicables.

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

Los huevos y las larvas pueden desinfectarse mediante un tratamiento con iodóforos. Se ha observado que el HVK se inactiva mediante iodóforos a razón de 200 mg/litro durante 30 segundos a 15°C (Kasai *et al.,* 2005).

2.4.8. Prácticas generales de manejo

Las medidas de bioseguridad deben incluir la garantía de que las nuevas introducciones de peces procedan de fuentes libres de la enfermedad y la instalación de un sistema de cuarentena donde puedan mantenerse los peces nuevos con peces centinela a temperaturas permisivas para la HCK. Así, los peces pasan por una cuarentena de un mínimo de 4 semanas a 2 meses antes de ser transferidos al estanque principal y mezclados con peces nunca antes expuestos al virus. Las medidas de higiene del lugar deben ser similares a las recomendadas para el virus de la viremia primaveral de la carpa e incluir desinfección de huevos, desinfección periódica de estanques, desinfección química del equipo de la piscifactoría, manipulación cuidadosa de los peces, evitación del estrés y desechado seguro de los peces muertos.

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

Todos los grupos de edad de las carpas parecen ser susceptibles a la HCK, aunque en general los peces más jóvenes, de hasta 1 año, son más susceptibles a la enfermedad clínica y son los que se recomienda tomar como muestra. La idoneidad de las muestras de peces escogidos durante un brote sospechoso de HCK dependerá de la prueba de diagnóstico utilizada. Las carpas moribundas o que acaban de morir y que presentan signos clínicos característicos de la enfermedad son adecuadas para un análisis mediante la mayoría de pruebas descritas en el apartado 4. Los peces muertos que presentan signos de descomposición tisular pueden ser adecuados solo cuando se analiza mediante métodos basados en la PCR. De igual forma, las muestras tomadas de peces aparentemente sanos, en una población sospechosa de estar enferma, tal vez solo puedan analizarse de manera fiable mediante métodos basados en la PCR más sensibles.

3.2. Conservación de muestras para su envío

Deben enviarse peces enteros al laboratorio, vivos o sacrificados y empaquetados por separado en recipientes asépticos herméticos. Sin embargo, es claramente preferible y muy recomendable obtener muestras de órganos de los peces inmediatamente después de la obtención en los lugares de producción de peces. Las muestras de peces enteros o de órganos escogidos deben enviarse al laboratorio en recipientes refrigerados o sobre hielo. Debe evitarse la congelación de los peces u órganos diseccionados escogidos. Sin embargo, si se reciben peces u órganos congelados, pueden ser útiles para ser analizados, aunque solo mediante métodos basados en la PCR. Las muestras pequeñas de tejido también pueden enviarse conservadas en alcohol (por ejemplo, etanol al 80-100%) para ser analizadas mediante métodos basados en la PCR.

3.3. Combinación de varias muestras

Cuando se analizan peces afectados clínicamente mediante métodos basados en la PCR, y en concreto si se intenta el aislamiento del virus, debe evitarse la combinación de muestras o restringirse a un máximo de dos peces por muestra compuesta. Para las pruebas de vigilancia sanitaria, mediante métodos basados en la PCR, la combinación debe restringirse a un máximo de cinco peces por muestra compuesta.

3.4. Órganos y tejidos de elección

Al analizar peces afectados clínicamente mediante métodos basados en la PCR, y en concreto si se intenta aislar el virus, se recomienda tomar muestras de tejido de branquia, riñón y bazo. El virus es más abundante en estos tejidos durante el curso de una infección manifiesta y también se han detectado altos niveles de virus en tejido encefálico e intestinal (Dishon*et al*., 2005; Gilad *et al.,* 2004). Cuando se analizan peces infectados de forma subclínica y aparentemente sanos mediante métodos basados en la PCR, se recomienda incluir también intestino y encéfalo.

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

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

4. Métodos de diagnóstico

El diagnóstico de la HCK en peces afectados clínicamente puede realizarse mediante muchos métodos. Actualmente, el aislamiento del HVK en cultivo celular no se considera tan sensible como los métodos basados en la PCR publicados para detectar el ADN del HVK. El virus se aísla solo en unas pocas líneas celulares y estas células pueden ser difíciles de manejar. Como consecuencia, el aislamiento del virus en cultivo celular no es un método fiable de diagnóstico para la HCK (Haenen *et al.,* 2004). Los métodos de inmunodiagnóstico, similares a los utilizados para el diagnóstico de la viremia de primavera de la carpa (como la inmunofluorescencia [IF] o el ELISA), pueden ser adecuados para una identificación y diagnóstico rápidos de la HCK, pero no se han documentado, comparado ni validado ampliamente. Hasta que no se disponga de pruebas validadas, el diagnóstico de la HCK no debe basarse en una sola prueba, sino en una combinación de dos o tres (Haenen *et al.,* 2004).

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

Durante un brote de HCK se producirá un considerable aumento de la mortalidad en la población. Todos los grupos de edad de los peces parecen ser susceptibles a la HCK, aunque, en infecciones experimentales, los peces de hasta 1 año de edad son más susceptibles a la enfermedad. Al examinar con más detalle los peces, se observa que los signos clínicos característicos son una palidez o enrojecimiento de la piel, que también puede tener una textura rugosa (tipo papel de lija), una pérdida focal o total de la epidermis, una excesiva o insuficiente producción de mucus en la piel y las branquias, y una palidez de las branquias. Otros signos macroscópicos son una endoftalmia (ojos hundidos) y hemorragias en la piel y la base de las aletas, así como erosión en las aletas.

4.1.2. Cambios de comportamiento

Los peces se vuelven letárgicos, se separan del banco y se reúnen en la entrada del agua o en los márgenes de un estanque y jadean en la superficie del agua. Algunos peces pueden experimental pérdida de equilibrio y desorientación, pero también pueden presentar signos de hiperactividad.

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

No hay lesiones macroscópicas patognomónicas. El diagnóstico definitivo debe esperar a la detección directa de ADN vírico o al aislamiento e identificación del virus. Sin embargo, la lesión anatomopatológica macroscópica más habitual se observa en las branquias y puede variar en cuanto a extensión desde zonas necróticas pálidas a una gran área de cambio de color, necrosis e inflamación intensas. Otros signos anatomopatológicos macroscópicos observados son unas manchas pálidas e irregulares en la piel, asociadas a un exceso de secreción de mucus y también una deficiencia de producción de mucus cuando las manchas cutáneas tienen una textura tipo papel de lija. Otros signos clínicos observados con frecuencia son anorexia, endoftalmia (ojos hundidos) y hemorragia superficial en la base de las aletas. En un examen más detallado se puede observar erosión de las láminas primarias, fusión de láminas secundarias e hinchazón en las puntas de las láminas primarias y secundarias. Otras lesiones internas aparecen de forma variable y a menudo están ausentes en casos de muerte súbita. Otras lesiones anatomopatológicas macroscópicas que se han descrito son adherencias en la cavidad abdominal con o sin coloración anómala en los órganos internos (más clara o más oscura). El riñón o el hígado pueden presentar aumento de tamaño, y también pueden presentar hemorragias petequiales. La presencia de lesiones macroscópicas también puede complicarse porque los peces enfermos, en concreto la carpa común, también están infestados con ectoparásitos, como *Argulus* sp., *Chilodonella* sp., *Cryptobia* sp., *Dactylogyrus* sp., *Gyrodactylus* sp., *Ichthyobodo* sp., *Ichthyophthirius* sp., *Trichodina* sp. y monogeneas de las branquias, así como por muchas especies de bacterias, sobre todo *Flavobacterium columnare* a temperaturas del agua más cálidas.

4.2.2. Bioquímica clínica

No se dispone de información publicada.

4.2.3. Anatomopatología microscópica

Al examinar las branquias con mayor detalle, mediante microscopía de bajos aumentos, se puede observar erosión de las láminas primarias, fusión de las láminas secundarias e hinchazón de las puntas de las láminas tanto primarias como secundarias.

La histopatología de la enfermedad puede ser inespecífica y variable, pero la inflamación y necrosis de las branquias es una característica constante. Las branquias también presentan hiperplasia e hipertrofia del epitelio branquial, y puede observarse fusión de láminas secundarias y adherencia de los filamentos de las branquias. Se observa necrosis de las branquias, que oscila entre pequeñas zonas de células epiteliales necróticas de láminas secundarias y la pérdida completa de las láminas. Las células epiteliales y los leucocitos de las branquias pueden presentar una destacada hinchazón nuclear, y a menudo se observa una marginación de la cromatina que confiere un aspecto de "anillo grabado" e inclusiones intranucleares eosinófilas difusas pálidas. Se ha observado inflamación, necrosis e inclusiones nucleares (individualmente o combinadas) en otros órganos, sobre todo en el riñón, pero también en el páncreas, el hígado, el encéfalo, el intestino y el epitelio oral.

4.2.4. Preparaciones húmedas

No son aplicables

4.2.5. Frotis

El HVK se ha identificado en improntas de contacto y en frotis de hígado, riñón y encéfalo de peces infectados, mediante inmunofluorescencia (IF). En el riñón se observaron niveles más altos de IF positiva y el virus se pudo detectar mediante IF de una impronta de riñón 1 día post-infección (Pikarsky *et al*., 2004; Shapira *et al.,* 2005).

4.2.6. Microscopía electrónica/citopatología

La detección de partículas víricas mediante el examen de tejidos de carpas infectadas clínicamente por microscopía electrónica de transmisión (MET) no es un método de diagnóstico fiable. Deben tomarse muestras de trozos de branquia y tejido renal fijados en glutaraldehído de carpas intensamente infectadas (>10^6 partículas víricas). Los mejores resultados se obtienen recogiendo varias carpas de una población afectada que se encuentren en distintos estadios de la infección. Esto contribuirá a garantizar que algunas de las muestras de tejido pertenezcan a ejemplares intensamente infectados.

4.3. Métodos de detección e identificación del agente

En este apartado, no todos los métodos se describen con demasiado detalle porque no ha habido una comparación y validación completas de los métodos de detección e identificación del HVK. En los casos en los que sí se ha realizado, se proporciona una breve descripción de los métodos publicados de los que se dispone. Las recomendaciones en cuanto al método se basarán en otras pruebas y validaciones, y en los datos que se vayan obteniendo de los laboratorios que hayan desarrollado los métodos, con el fin de decidir si son adecuados para este fin.

4.3.1. Métodos directos de detección

Se ha identificado el HVK en improntas de contacto de hígado, riñón y encéfalo de peces infectados, mediante inmunofluorescencia (IF). Los niveles más altos de IF positiva se observaron en el riñón y el virus se pudo detectar mediante IF en una impronta de riñón 1 día después de la infección (Pikarsky *et al*., 2004; Shapira *et al.,* 2005). También se ha detectado antígeno vírico en tejidos infectados mediante un método de tinción por inmunoperoxidasa. El antígeno vírico se detectó 2 días después de la infección en el riñón, y también se observó en las branquias y el hígado (Pikarsky *et al*., 2004). Sin embargo, la detección del HVK mediante inmunotinción debe interpretarse con cuidado, dado que pueden teñirse células positivamente como consecuencia de una reacción cruzada con virus serológicamente relacionados (como el HVCy-1) o una proteína no vírica (Pikarsky *et al*., 2004). A continuación se describe un método de detección directa del HVK a partir de improntas de riñón mediante la prueba de la inmunofluorescencia indirecta (IFAT).

Se han utilizado métodos de inmunofluorescencia (IF) e hibridación *in-situ* (ISH), llevados a cabo en leucocitos extraídos de peces, para aplicaciones de investigación cuyo objetivo ha sido la detección o identificación del HVK. Aunque estos métodos no se han comparado exhaustivamente con otras técnicas, son técnicas no destructivas (no letales) y algunos laboratorios podría encontrarlas útiles en un contexto de diagnóstico. En este texto no se indican los detalles de estos métodos, pero pueden hallarse los protocolos detallados de separación de los leucocitos de la sangre y de la IF y la ISH en informes publicados por Bergmann *et al.* (2009, 2010a).

En muchos laboratorios de todo el mundo se están desarrollando métodos de detección directa del HVK basados en ELISA en tejidos infectados, pero hasta ahora no se ha publicado ningún método validado. Actualmente, se dispone de un método de ELISA publicado que se desarrolló en Israel para detectar el HVK en deyecciones (heces) de peces (Dishon *et al.,* 2005). Los ELISA desarrollados tendrán una sensibilidad baja que puede ser adecuada para la detección de los altos niveles de HVK hallados en tejidos de peces clínicamente enfermos, pero no para la vigilancia del HVK en poblaciones sanas.

El método de detección del HVK más habitualmente utilizado directamente en tejidos de peces son las pruebas basadas en la PCR específicas del HVK.

4.3.1.1. Métodos microscópicos

4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

No son aplicables.

4.3.1.1.2. Frotis/Improntas

4.3.1.1.2.1. Prueba de inmunofluorescencia indirecta en improntas de riñón

i) Se sangran los peces por completo.

ii) Se realizan improntas de riñón sobre portas de vidrio limpios o en el fondo de los pocillos de una placa de cultivo celular de plástico

iii) Se deja secar la impronta al aire durante 20 minutos.

iv) Se lavan una vez con solución salina tamponada con fosfato (PBS) 0,01 M, a continuación tres veces brevemente con acetona fría (conservada a -20°C) en el caso de los portas de vidrio o una mezcla de un 30% de acetona y un 70% de etanol, también a -20°C, en el caso de los pocillos de plástico.

v) Se deja actuar el fijador durante 15 minutos. Un volumen de 0,5 ml/pocillo de 2 cm^2 es suficiente para improntas en placas de cultivo de celular.

vi) Se dejan secar las improntas fijadas al aire durante al menos 30 minutos y se procesan de inmediato o bien se congelan a -20°C.

vii) Se rehidratan las improntas secadas mediante cuatro pasos de lavado con solución de PBS 0,01 M, pH 7,2, que contenga contenga Tween 20 al 0,05% (PBST), y se retira este tampón por completo tras el último lavado.

viii) Se prepara una solución de anticuerpos purificados o de suero anti HVK en PBS 0,01 M, pH 7,2, que contenga Tween 20 al 0,05% (PBST), a la dilución adecuada (que se habrá establecido previamente o la que proporcione el proveedor del reactivo).

ix) Se bloquean con leche desnadata al 5% o seroalbúmina bovina al 1%, en PBST durante 30 minutos a 37°C.

x) Se lavan cuatro veces con PBST.

xi) Se tratan las improntas con la solución de anticuerpos (preparada en el paso viii) durante 1 hora a 37°C en una cámara con humedad y no se permite que se produzca evaporación. Un volumen de 0,25 ml/pocillo de 2 cm^2 es suficiente para improntas en placas de cultivo celular.

xii) Se lavan cuatro veces con PBST.

xiii) Se tratan las improntas durante 1 hora a 37°C con una solución de anticuerpos anti inmunoglobulina conjugados con isotiocianato de fluoresceína (ITCF) utilizada en la primera capa y preparada según las instrucciones del fabricante. Estos anticuerpos conjugados con ITCF suelen ser anticuerpos de conejo o cabra.

xiv) Se lavan cuatro veces con PBST.

xv) Se añade PBS a razón de 0,5 ml/pocillo de 2 cm^2 a las improntas tratadas en placas de cultivo celular y se examinan de inmediato o se montan los portas de vidrio con cubres utilizando solución salina de glicerol a pH 8,5 antes de la observación microscópica.

xvi) Se examinan bajo luz UV incidente en un microscopio con oculares de 10x y objetivos de 20-40x que tengan aperturas numéricas de >0,65 y >1,3, respectivamente. Deben incluirse controles positivos y negativos que den los resultados esperados antes de cualquier otra observación.

4.3.1.1.3. Cortes fijados

El método detallado en el apartado 4.3.1.1.2 anterior también es adecuado para la detección del HVK en cortes místicos fijados en parafina y fijados en formalina neutra tamponada al 10% (NBF). Sin embargo, los cortes desparafinados, rehidratados en PBS, podrían precisar otro tratamiento para revelar el antígeno, que podría estar enmascarado por una excesiva fijación del tejido. Un tratamiento frecuente es la incubación de los cortes con tripsina al 0,1% en PBS a 37°C durante 30 segundos. A continuación, los cortes se lavan en PBS fría antes de proceder con los pasos viii-xvi del apartado 4.3.1.1.2 anterior.

NOTA: Para la detección directa del antígeno vírico mediante IFAT o inmunohistoquímica, los tejidos deben fijarse 24 a 48 horas en NBF al 10% y a continuación el fijador debe sustituirse por etanol al 10% para un almacenaje de larga duración.

4.3.1.2. Detección, aislamiento e identificación del agente

4.3.1.2.1. Cultivo celular

El diagnóstico de la HCK en peces afectados clínicamente se puede conseguir mediante el aislamiento del virus en cultivo celular. Sin embargo, el virus solo puede aislarse en unas pocas líneas celulares y estas pueden ser difíciles de manejar. Además, el aislamiento en cultivo celular no es tan sensible como los métodos basados en la PCR publicados para detectar ADN del HVK y no se considera un método de diagnóstico fiable para la HCK (Haenen *et al.,* 2004).

Línea celular a utilizar: KF-1 o CCB

Extracción del virus

Se utiliza el procedimiento descrito en el Capítulo 2.3.0, apartado A.2.2.2.

Inoculación de monocapas celulares

i) Antes de la inoculación, pueden tratarse los homogenados de combinaciones de órganos con antibióticos, como se detalla en el Capítulo 2.3.0, apartados A.2.2.1 y A.2.2.2.

ii) Si se han observado efectos citotóxicos tras la inoculación de homogenados tratados con antibióticos, se filtra al menos 1 ml del sobrenadante del homogenado de órganos a una dilución de 1/10 por un filtro de acetato de celulosa desechable de 0,45 µm (o a una unidad acoplada a una membrana de filtro de baja unión a proteína similar).

iii) Para la inoculación directa, se transfiere un volumen adecuado del homogenado tratado con antibiótico o filtrado a monocapas celulares de 24 a 48 horas de edad en frascos de cultivo tisular o a placas multipocillo. Se inoculan al menos 5 cm^2 de monocapa celular con 100 µl del sobrenadante filtrado. Como alternativa, se crea otra dilución decimal del sobrenadante filtrado en medio de cultivo celular, se tampona a pH 7,6 y se suplementa con un 2% de suero fetal bovino (FBS), y se deja absorber durante 30 minutos a 1 hora a 18-22°C. A continuación, sin retirar el inoculado, se añade el volumen adecuado de medio de cultivo celular (1–1,5 ml/5 cm^2 para frascos de cultivo celular), y se incuba a 20 - 25°C. NOTA: Cuando se utilicen placas multipocillo, la incubación en atmósfera de CO_2 o la adición de HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfónico) al medio de cultivo celular mantendrá el pH correcto durante la incubación.

Seguimiento de la incubación

i) Se sigue el curso de la infección en controles positivos y otros cultivos celulares inoculados mediante examen microscópico diario a 40-100 aumentos durante 14 días. Se recomienda utilizar un microscopio de contraste de fases.

ii) Se mantiene el pH del medio de cultivo celular a 7,3-7,6 durante toda la incubación. Esto se puede lograr añadiendo al medio de cultivo celular inoculado tampón bicarbonato estéril en el caso de frascos de cultivo celular cerrados con mucha fuerza, o bien medio tamponado con HEPES en el caso de placas multipocillo.

iii) Si aparece un efecto citopático (ECP) en estos cultivos celulares inoculados con las diluciones de los sobrenadantes del homogenado analizado, los procedimientos de identificación deben llevarse a cabo de inmediato (véase el apartado 4.3.1.2.2 abajo).

iv) Si no aparece ECP en los cultivos inoculados (a pesar de un progreso normal del ECP en los controles del virus), debe realizarse un subcultivo de los cultivos inoculados durante 14 días

más. En el caso de que el control del virus no presente ECP, el proceso debe repetirse con células susceptibles frescas y nuevas muestras.

Procedimientos de subcultivo

i) Se transfieren alícuotas de medio de cultivo celular de todas las monocapas inoculadas con sobrenadante de homogenado de órgano a cultivos celulares frescos.

ii) Se inoculan monocapas celulares como se ha descrito anteriormente en el apartado 4.3.1.2.1, Inoculación de monocapas celulares, paso iii.

iii) Se incuban y controlan como se ha descrito antes en el apartado 4.3.1.2.1.

Si no se produce ECP, la prueba puede considerarse negativa.

Identificación confirmativa

El método más fiable para la identificación confirmativa de un ECP es la PCR, seguida del análisis de la secuencia del producto de la PCR. Los métodos de PCR recomendados para la identificación del HVK son los mismos que los recomendados para la detección directa en tejidos de peces (apartado 4.3.1.2.3, abajo). Para la confirmación final, los productos de la PCR del tamaño adecuado deben identificarse como HVK en origen mediante análisis de la secuencia (véase el apartado 4.3.1.2.3, abajo).

Confirmación mediante PCR

i) Se extrae ADN del sobrenadante del cultivo del virus mediante un kit adecuado de extracción de ADN o un reactivo. Un ejemplo de extracción de ADN utilizando un método de extracción basado en las sales (reactivo DNAzol®) se describe abajo en el apartado 4.3.1.2.3.1.

ii) A continuación, el ADN extraído se amplifica mediante los protocolos de PCR descritos abajo en el apartado 4.3.1.3.1.1.

A continuación, los productos de la PCR amplificados pueden separarse del gel y secuenciarse como se describe en el apartado 4.3.1.2.3.

4.3.1.2.2 Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos

Se están desarrollando métodos basados en el enzimoinmunoanálisis (ELISA) para la detección directa del antígeno HVK en tejidos infectados en muchos laboratorios, y estos métodos también podrían ser útiles para la identificación confirmativa del HVK. Actualmente, se dispone de un método ELISA publicado que se desarrolló en Israel para detectar el HVK en deyecciones (heces) de peces (Dishon *et al.,* 2005).

Los métodos de identificación del virus que se basan en la producción de cultivos celulares infectados con el HVK (como la IFAT, la inmunoperoxidasa o la neutralización sérica) no se recomiendan, debido a que el crecimiento del virus en cultivos celulares susceptibles es lento e impredecible.

4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

De los métodos de PCR de un solo paso publicados, los protocolos que se indican a continuación se consideran actualmente los más sensibles para la detección de ADN del HVK en muestras de tejido fresco de carpas con enfermedad clínica. Los protocolos podrían permitir también la detección de niveles subclínicos del virus. En el primero se utiliza el conjunto de cebadores TK desarrollado por Bercovier *et al.* en la Facultad de Medicina de la Universidad Hebrea Hadassah, en Israel (Bercovier *et al.,* 2005). El segundo lo desarrollaron Yuasa *et al.* en el Instituto Nacional de Investigación sobre Acuicultura (NRIA), Watarai, Mie, Japón (Yuasa *et al.,* 2005) y es una importante mejora de un protocolo publicado. Si el tejido presenta señales de descomposición, tal vez tenga que utilizarse el conjunto de cebadores que tiene por diana regiones más cortas del genoma.

Algunas de las PCR que prefieren muchos laboratorios de diagnóstico respecto a la PCR convencional, son las PCR cuantitativas, como la PCR en tiempo real. La prueba cuantitativa más frecuentemente utilizada para la detección del HVK es la PCR en tiempo real Taqman de Gilad (Gilad *et al.* 2004). Hoy en día, la PCR en tiempo real de Taqman es un procedimiento diagnóstico frecuente que se ha observado que detecta y evalúa cuantitativamente cantidades muy bajas de copias de secuencias del ácido nucleico de interés. La PCR Taqman evita gran parte del riesgo de contaminación inherente a las PCR anidadas porque minimiza la manipulación de las muestras mediante la automatización durante la preparación de las mismas y mediante procedimientos de ciclador térmico.

En el protocolo de preparación de la muestra detallado a continuación se utiliza un método de extracción basado en sales (reactivo DNAzol®) para la extracción de ADN del HVK. Es un protocolo fácil de utilizar y de corta duración que además, es relativamente barato en comparación con otros. Los laboratorios que no están familiarizados con el DNAzol® o reactivos similares de extracción basada en sales tal vez consideren que es un método menos fiable. Sin embargo, existen muchos kits comerciales de extracción de ADN basados en sales y en matriz de sílice (algunos de los fabricantes conocidos son Roche, Qiagen e Invitrogen) que producen ADN de alta calidad adecuado para su utilización con los protocolos de PCR descritos.

4.3.1.2.3.1. Detección directa mediante PCR

Preparación de la muestra y extracción de ADN utilizando el reactivo DNAzol®

La extracción de virus a partir de tejidos de órganos debe llevarse a cabo mediante el procedimiento descrito en el Capítulo 2.3.0, apartado A.2.2.2.

i) Se añaden 100 µl de homogenado de tejido (1/10 [p/v]) a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml que contenga 1 ml de reactivo DNAzol®

ii) Se mezcla suavemente invirtiendo el tubo cinco veces y dejándolo reposar a temperatura ambiente 5 minutos, y después se centrifuga a 10.6000 ***g*** (rcf) 10 minutos mediante una microcentrífuga.

iii) Se extrae 1 ml del sobrenadante y se introduce en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml que contenga 0,5 ml de etanol.

iv) Se mezcla suavemente invirtiendo el tubo cinco veces y dejándolo reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos, y a continuación se centrifuga a 18.000 ***g*** (fcr –fuerza centrífuga relativa-) durante 30 minutos mediante una microcentrífuga.

v) Se retira el sobrenadante y se lava el precipitado con 250 µl de etanol al 70% en agua de grado de biología molecular.

vi) Se centrifugan las muestras 5 minutos a 18.000 ***g*** (fcr).

vii) Se retira el etanol mediante una pipeta y se seca el precipitado al aire dejando los tubos abiertos sobre la repisa de trabajo 5 minutos.

viii) Se vuelve a suspender el precipitado en 50 µl de agua de grado de biología molecular, se precalienta a 60°C y se incuba a 60°C durante 5 minutos. Las muestras se pueden guardar a -20°C hasta que sean necesarias.

PCR

Comentarios generales

La PCR tiende a dar falsos positivos y falsos negativos. Los falsos positivos (muestras negativas que dan una reacción positiva) pueden ser consecuencia de un arrastre de producto de las muestras positivas o, lo que es más frecuente, de una contaminación cruzada con productos de la PCR de pruebas anteriores. Por tanto, cada prueba y extracción de tejido debe incluirán control negativo para descartar la contaminación. Para minimizar el riesgo de contaminación, deben utilizarse puntas de pipeta que prevengan la formación de aerosol para todos los pasos de preparación de la muestra y de la PCR. Además, todas las PCR deben prepararse en una zona limpia que sea independiente de la zona donde se llevan a cabo las amplificaciones y la electroforesis en gel. No debe compartirse equipo (como batas o material consumible) entre zonas y, a ser posible, se debe restringir el acceso entre zonas. El equipo, la ropa y el papel (como los libros) pueden contener productos de la PCR contaminantes. Además, es necesario asegurarse de que todas las superficies de trabajo y campanas de flujo de aire utilizadas para las extracciones y la PCR se limpien y descontaminen periódicamente con luz UV y lejía. Los reactivos y consumibles también deben descontaminarse sistemáticamente con radiación UV. Para garantizar la integridad de las muestras, estas deben guardarse siempre (por ejemplo en un congelador o nevera) en un lugar alejado del laboratorio o zona destinados a la biología molecular.

Protocolo 1 (*con cebadores TK de Bercovier*)

i) Para cada muestra, se prepara una mezcla madre que contenga:

10 µl	Tampón de reacción (conc. ×5)
5 µl	$MgCl_2$ (solución madre 25 mM)
0,5 µl	dNTPs (mezcla 25 mM)
0,5 µl	Cebador directo (solución madre de 10 pmol μl^{-1})

0,5 µl Cebador inverso (solución madre de 10 pmol μl^{-1})
0,25 µl ADN polimerasa 500 µ (5 µ/µl)
30,75 µl Agua de grado biología molecular
Cebadores TK de Bercovier:
Directo = 5'-GGG-TTA-CCT-GTA-CGA-G-3'
Inverso = 5'-CAC-CCA-GTA-GAT-TAT-GC-3'
Tamaño del producto = 409 pb
Para cada muestra, se distribuyen 47,5 µl en un tubo de microcentrífuga de pared fina de 0,5 ml. Se recubren con dos gotas de aceite mineral.

ii) Se añaden 2,5 µl del ADN extraído. El resto del ADN se guarda a –20°C.

iii) Se colocan los tubos en un termociclador y se ejecuta el siguiente programa:

1 ciclo de 5 minutos a 94°C;
40 ciclos de: 1 minuto a 95°C
1 minuto a 52°C (véase la nota abajo)
1 minuto a 72°C
Un paso de extensión final de 10 minutos a 72°C.

Nota sobre las condiciones de ciclado: Muchos laboratorios han utilizado con éxito una temperatura de hibridación de 55°C para amplificar el HVK con cebadores TK elaborados por Bercovier.

iv) Se visualiza el amplicón de la PCR de 409 pb mediante electroforesis del producto en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio al 2% y se observa utilizando transiluminación con luz UV. Debe incluirse una escala de pesos moleculares adecuada en el gel para determinar el tamaño del producto.

v) Los productos del tamaño adecuado deben confirmarse como HVK en origen mediante análisis de la secuencia.

Protocolo 2 (con cebadores Gray Sph /modificación de Yuasa)

i) Para cada muestra, se prepara una mezcla madre que contenga:

2 µl Tampón de reacción (conc. ×10)
1,6 µl dNTPs (mezcla 2,5 mM)
0,2 µl Cebador directo (solución madre de 50 pmol μl^{-1})
0,2 µl Cebador inverso (solución madre de 50 pmol μl^{-1})
0,1 µl ADN polimerasa
14,9 µl Agua de grado de biología molecular
(NOTA: la concentración final de $MgCl_2$ en la mezcla madre es 2 mM)

Cebadores Gray Sph:
Directo = 5'-GAC-ACC-ACA-TCT-GCA-AGG-AG-3'
Inverso = 5'-GAC-ACA-TGT-TAC-AAT-GGT-CGC-3'
Tamaño del producto = 292 pb
Para cada muestra, se distribuyen 19 µl en un tubo de microcentrífuga de pared fina de 0,2 ml. Se recubren con dos gotas de aceite mineral.

ii) Se añade 1µl del ADN extraído

iii) Se colocan los tubos en un termociclador y se ejecuta el siguiente programa:

1 ciclo de 30 segundos a 94°C
40 ciclos de: 30 segundos a 94°C
30 segundos a 63°C
30 segundos a 72°C
Un paso de extensión final de 7 minutos a 72°C.

iv) Se añaden 3 µl de tampón de carga 6x a cada producto de PCR y se someten a electroforesis 7 µl en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio al 2% a 100 V durante 20 minutos y se visualizan con luz UV. Debe incluirse una escala de pesos moleculares adecuada en el gel para determinar el tamaño del producto.

v) Los productos del tamaño correcto deben confirmarse como HVK en origen mediante análisis de la secuencia.

Análisis de la secuencia de nucleótidos de los productos de la PCR

Los productos de la PCR se separan del gel y se purifican mediante un kit comercial de purificación de gel (como el Geneclean®, Q-BIOgene, Reino Unido). Se secuencian productos de la PCR simples e intensos (brillantes) tras la purificación, directamente en ambas direcciones con los cebadores utilizados en la amplificación inicial. Como alternativa, pueden clonarse productos de la PCR menos intensos (apenas perceptibles) mediante un vector de clonación TA (como el pGEM T, Promega) y se secuencias ambas cadenas del ADN mediante los conjuntos de cebadores universales M13. La amplificación, clonación y secuenciación se llevan a cabo por duplicado para eliminar posibles errores introducidos por la polimerasa Taq. A continuación, se analizan las reacciones de la secuencia en un *Genetic Analyser* y las alineaciones y secuencias consenso generadas mediante un programa informático adecuado (como Sequencher™ 4.0 software, Gene Codes Corporation, Ann Arbour, MI, EE.UU.). Se recomienda a los laboratorios de análisis que no disponen de instalaciones de secuenciación que la encarguen a empresas que ofrezcan servicios de secuenciación. A la hora de enviar las muestras, los laboratorios de análisis deben seguir las instrucciones del servicio de secuenciación escogido.

4.3.2. Métodos serológicos

El estado inmunitario de los peces es un factor importante ante la exposición al HVK, puesto que tanto la inmunidad inespecífica (interferón) como la específica (anticuerpos séricos, inmunidad celular) desempeñan importantes papeles en las infecciones por herpesvirus. La enfermedad clínica predomina a temperaturas del agua de 18°C y superiores cuando la respuesta inmunitaria del hospedador es óptima. Las carpas infectadas producen anticuerpos contra el virus, y se han publicado pruebas basadas en el ELISA que detectan de forma fiable estos anticuerpos a altas diluciones del suero (Adkison *et al.,* 2005; Ilouze *et al.,* 2010; St-Hilaire *et al.,* 2005). Se han detectado anticuerpos en el suero 3 semanas después de la infección experimental y en supervivientes pasado 1 año desde la infección natural (Adkison *et al.,* 2005; Ilouze *et al.,* 2010; St-Hilaire *et al.,* 2005; Talyor *et al.,* 2010).

Se ha observado que el suero de carpa koi con anticuerpos contra el HVK presenta reacción cruzada, a un nivel bajo, con el HVCy-1, una prueba más de que estos virus están estrechamente relacionados. En análisis recíprocos con ELISA e inmunoelectrotransferencia del suero de carpas koi infectadas con el HVCy-1 y el HVK se observaron anticuerpos que presentaban reacción cruzada (Adkison *et al.,* 2005). Los virólogos que llevan a cabo el diagnóstico también deben saber que los peces recientemente vacunados contra el HVK podrían dar resultados positivos en el ELISA de detección de anticuerpos.

La detección de anticuerpos podría resultar un método útil para determinar si se han producido exposiciones previas al HVK en peces aparentemente sanos, y mientras no terminen de desarrollarse métodos basados en la PCR que permitan detectar de modo fiable virus persistente en peces expuestos, las pruebas basadas en anticuerpos podrían constituir el único medio de vigilancia. No obstante, debido a que no se sabe suficiente sobre las respuestas serológicas de los peces a las infecciones víricas, hasta ahora no se ha aceptado la detección de anticuerpos de los peces contra los virus como método sistemático de análisis para evaluar el estado vírico de las poblaciones de peces. En el futuro podrían validarse ciertas técnicas serológicas para ciertas infecciones víricas de los peces, lo cual haría que la utilización de la serología en los peces se aceptara más como método de detección de enfermedades.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

Los métodos actualmente disponibles para la vigilancia dirigida y el diagnóstico del HVK 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	b	d
MO directa	d	d	c	c	b	d
Histopatología	d	c	c	c	b	c
Aislamiento en cultivo celular	d	d	d	d	b	d
ME de transmisión	d	d	d	d	b	c
Pruebas de detección del virus basadas en anticuerpos	d	d	c	c	b	b
Sondas de ADN – *in situ*	d	d	c	c	b	b
PCR	d	b	b	b	a	a
Secuenciación	NA	NA	NA	NA	NA	a
Pruebas de detección de anticuerpos (Serología)	d	d	c	b	b	d
Bioanálisis	NA	NA	NA	NA	NA	NA

PL = postlarvas; MO = microscopía óptica; ME = microscopía electrónica; PCR = reacción en cadena de la polimerasa; NA = No es aplicable.

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

La vigilancia dirigida debe basarse en un seguimiento periódico de los lugares en los que se crían especies susceptibles. Deben realizarse controles de dichos lugares cuando las temperaturas del agua hayan alcanzado niveles que permiten el desarrollo de la enfermedad (>17°C) y no antes de 3 semanas después de que se hayan alcanzado estas temperaturas. Deben tomarse como muestra peces enfermos o peces que presenten un comportamiento anómalo, y analizarse mediante las pruebas más sensibles de que se disponga (como la PCR). Actualmente no existe ningún método validado que se recomiende para el análisis de poblaciones sanas de peces susceptibles con vistas a la declaración de ausencia del HVK. No obstante, muchos laboratorios utilizan métodos moleculares más sensibles, como la PCR en tiempo real o anidada, para detectar niveles bajos de ADN vírico persistentes de manera fiable. Estas pruebas podrían muy bien ser adecuadas para programas de vigilancia. No se dispone de informes publicados sobre validaciones extensas de las pruebas más sensibles, pero la prueba más utilizada es la PCR en tiempo real Taqman descrita por Gilad (Gilad *et al.,*2004). Esta prueba está ampliamente reconocida como el método de PCR publicado más sensible del que se dispone para la detección de niveles bajos del HVK. Como alternativa, la detección de anticuerpos podría ser un método útil para averiguar si ha habido exposición previa al HVK en peces aparentemente sanos. En el futuro podrían validarse enzimoinmunoanálisis para la detección de anticuerpos contra el HVK, lo cual haría que la utilización de estas técnicas se aceptarán más como método de detección de enfermedades

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

Debe sospecharse del HVK, en una especie de pez susceptible, si se cumple al menos uno de los siguientes criterios:

i) Presencia de signos clínicos característicos de la HCK en una población de peces susceptibles.

ii) Presencia de la histopatología característica en cortes histológicos compatible con la HCK.

iii) Observación de un ECP característico en cultivos celulares susceptibles sin identificar el agente causal.

iv) Un solo resultado positive en una de las pruebas diagnósticas de la Tabla 5.1 clasificadas como a o b.

v) Transferencia de peces vivos procedentes de un lugar en el que se haya confirmado la presencia del HVK, o se sospeche, debido a la presencia de enfermedad clínica, a lugares donde no se sospeche del HVK.

vi) Existencia de otras relaciones epidemiológicas con lugares donde se haya confirmado el HVK.

vii) Detección de anticuerpos contra el HVK.

NOTA: Cuando un lugar se ha definido como sospechoso en base a los criterios v) y vi), solo deben realizarse pruebas de detección del HVK si las temperaturas del agua han alcanzado niveles que permitan el desarrollo de la enfermedad (>17°C). Si las temperaturas del agua son inferiores a los niveles permisivos, puede tomarse una muestra de peces sospechosos vivos, mantenerlos a temperaturas altas (lo ideal son 20 a 24°C) y analizarlos 14 a 21 días después.

7.2. Definición de caso confirmado

Para confirmar el HVK deben cumplirse los siguientes criterios:

i) Mortalidad, signos clínicos y alteraciones anatomopatológicas compatibles con la enfermedad que causa el HVK (apartado 4.2) y detección del HVK mediante uno o más de los siguientes métodos:

   a) Detección del HVK mediante PCR por los métodos descritos en el apartado 4.3.1.2.3.

   b) O BIEN detección del HVK en preparaciones de tejido mediante anticuerpos específicos contra el HVK (como la IFAT en improntas de tejido, según se describe en el apartado 4.3.1.1.2);

   c) O BIEN aislamiento e identificación del HVK en cultivo celular a partir de al menos una muestra de cualquier pez del lugar, como se describe en el apartado 4.3.1.2.1.

ii) En ausencia de mortalidad y enfermedad clínica, mediante uno o más de los siguientes métodos:

   a) Detección y confirmación del HVK mediante PCR por los métodos descritos en el apartado 4.3.1.2.3;

   b) Resultados positivos en dos de las pruebas diagnósticas de la Tabla 5.1 clasificadas como a o b.

8. Bibliografía

ADKISON M.A., GILAD O. & HEDRICK R.P. (2005). An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to the koi herpesvirus (KHV) in the serum of koi *Cyprinuscarpio*. *Fish Pathol.*,**40**,53–62.

AOKI T., HIRONO I., KUROKAWA K., FUKUDA H., NAHARY R., ELDAR A., DAVISON A.J., WALTZEK T.B., BERCOVIER H. & HEDRICK R.P. (2007). Genome sequences of three koi herpesvirus isolates representing the expanding distribution of an emerging disease threatening koi and common carp worldwide. *J. Virol.*, **81** (10), 5058–5065.

BERCOVIER H., FISHMAN Y., NAHARY R., SINAI S., ZLOTKIN A., EYNGOR M., GILAD O., ELDAR A. & HEDRICK R.P. (2005). Cloning of the koi herpesvirus (KHV) gene encoding thymidine kinase and its use for a highly sensitive PCR based diagnosis. *BMC Microbiol.*,**5**,1–9.

BERGMANN S.M., KEMPTER J., SADOWSKI J. &FICHTNER D. (2006). First detection, confirmation and isolation of koi herpesvirus (KHV) in cultured common carp (*Cyprinuscarpio L.*) in Poland. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*,**26**,97–104.

BERGMANN S.M., LUTZE P., SCHUTZE H., FISCHER U., DAUBER M., FICHTNER D. &KEMPTER J. (2010a). Goldfish (Carassiusauratus) is a susceptible species for koi herpesvirus (KHV) but not for KHV disease. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*,**30**, 74–84.

BERGMANN S.M., SCHUTZE H., FISCHER U., FICHTNER D., RIECHARDT, M., MEYER, K., SCHRUDDE D. &KEMPTER J. (2009).Detection of koi herpes-virus (KHV) genome in apparently healthy fish.*Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*,**29**, 145-152.

BERGMANN S.M., SADOWKSI J., KIELPINSKI M., BARTLOMIEJCZYK M., FICHTNER D., RIEBE R., LENK M. &KEMPTER J. (2010b). Susceptibility of koi x crucian carp and koi x goldfish hybrids to koi herpesvirus (KHV) and the development of KHV disease (KHVD).*J. Fish Dis* ,**33**,267–272.

BIGARRÉ L., BAUD M., CABON J., ANTYCHOWICZ J., BERGMANN S.M., ENGELSMA M., POZET F., REICHERT M. &CASTRIC J. (2009). Differentiation between Cyprinid herpesvirus type-3 lineages using duplex PCR.*J. Virol. Methods***158**, 51-57.

BRETZINGER A., FISCHER-SCHERL T., OUMOUNA M., HOFFMANN R. &TRUYEN U.(1999). Mass mortalities in koi carp, *Cyprinuscarpio*, associated with gill and skin disease. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*,**19**,182–185.

COSTES B., STALIN RAJ V., MICHEL B., FOURNIER G., THIRION M., GILLET L., MAST J., LIEFFRIG F., BREMONT M. &VANDERPLASSCHEN A. (2009). The major portal of entry of koi herpesvirus in *Cyprinuscarpio*is the skin. *J. Virol.*, **83**,2819–2830.

DISHON A., PERELBERG A., BISHARA-SHIEBAN J., ILOUZE M., DAVIDOVICH M., WERKER S. &KOTLER M. (2005). Detection of carp interstitial nephritis and gill necrosis virus in fish droppings *Appl. Environ.Microbiol*.,**71**, 7285–7291.

DIXON P.F., JOINER C.L., WAY K., REESE R.A., JENEY G. &JENEY Z.(2009). Comparison of the resistance of selected families of common carp, *Cyprinuscarpio* (L.), to koi herpesvirus: preliminary study. *J. Fish Dis*., **32** 1035–1039.

EL-MATBOULI M. &SOLIMAN H. (2010).Transmission of cyprinid herpesvirus-3 (CyHV-3) from goldfish to naïve common carp by cohabitation.*Res. Vet. Sci.* [published on-line: doi:10.1016/j.rvsc.2010.07.008.

GARVER K.A., AL-HUSSINEE L., HAWLEY L.M., SCHROEDER T., EDES S., LEPAGE V., CONTADOR E., RUSSELLS., LORD S., STEVENSON R.M.W., SOUTER B., WRIGHTE. &LUMSDEN J.S. (2010). Mass mortality associated with koi herpesvirus in wild common carp in Canada. *J.Wildl. Dis.*,**46**, 1242–1251.

GILAD O., YUN, S. ADKISON M.A., WAY K., WILLITS N.H., BERCOVIER H. & HEDRICK R.P. (2003).Molecular comparison of isolates of an emerging fish pathogen, koi herpesvirus, and the effect of water temperature on mortality of experimentally infected koi.*J. Gen. Virol.*, **84**,2661–2667.

GILAD O., YUN S., ZAGMUTT-VERGARA F.J., LEUTENEGGER C.M., BERCOVIER H. & HEDRICK R.P. (2004). Concentrations of a Koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally infected *Cyprinuscarpio koi* as assessed by real-time TaqMan PCR.*Dis. Aquat. Org.*, **60**,179–187.

HAENEN O.L.M., WAY K., BERGMANN S.M. & ARIEL E. (2004).The emergence of koi herpesvirus and its significance to European aquaculture.*Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*,**24**,293–307.

HARAMOTO E., KITAJIMA M., KATAYAMA H. &OHGAKI S. (2007).Detection of koi herpesvirus DNA in river water in Japan.*J. Fish Dis.*, **30**,59–61.

HEDRICK R.P., GILAD O., YUN S., SPANGENBERG J.V., MARTY G.D., NORDHAUSEN R.W., KEBUS M.J., BERCOVIER H. &ELDAR A. (2000). A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp. *J. Aquat. Anim. Health*, **12**,44–57.

HEDRICK R.P., WALTZEK T.B. & MCDOWELL T.S. (2006).Susceptibility of koi carp, common carp, goldfish and goldfish × common carp hybrids to cyprinid herpesvirus-2 and herpesvirus-3.*J. Aquat. Anim. Health*, **18**,26–34.

ILOUZE M., DAVIDOVICH M., DIAMANT A., KOTLERM. &DISHONA. (2011). The outbreak of carp disease caused by CyHV-3 as a model for new emerging viral diseases in aquaculture: a review. *Ecol. Res.,***26**, 885–892.~~doi: 10.1007/s11284-010-0694-2~~

ITO T., SANO M., KURITA J., YUASA K. & IIDA T (2007). Carp larvae are not susceptible to koi herpesvirus. *Fish Pathol.*,**42**,107–109.

KASAI H., MUTO Y. &YOSHIMIZU M.(2005).Virucidal effects of ultraviolet, heat treatment and disinfectants against koi herpesvirus (KHV).*Fish Pathol.*,**40**,137–138.

KEMPTER J., SADOWSKI J., SCHUTZE H., FISCHER U., DAUBER M., FICHTNER D., PANICZ R. &BERGMANN S.M. (2009).Koi herpesvirus: Do Acipenserid restitution programs pose a threat to carp farms in the disease free zones? *ActaIchthyologicaetPiscatoria,***39**, 119–126.

KIELPINSKI M., KEMPTER J., PANICZ R., SADOWSKI J., SCHUTZE H., OHLEMEYER S. & BERGMANN S.M.(2010). Detection of KHV in freshwater mussels and crustaceans from ponds with KHV history in common carp (*Cyprinuscarpio*). *Israeli J. Aquaculture* (*Bamidgeh*), **62**, 28–37.

MINAMOTO T., HONJO M.N., YAMANAKA H., TANAKA N., ITAYAMA T.& KAWABATA Z. (2010).Detection of cyprinid herpesvirus-3 DNA in lake plankton.*Res. Vet. Sci.,* **90**, 530–532.

MICHEL B., LEROY B., STALIN RAJ V., LIEFFRIG F., MAST J., WATTIEZ R., VANDERPLASSCHEN A.F. &COSTES B. (2010). The genome of cyprinid herpesvirus 3 encodes 40 proteins incorporated in mature virions. *J. Gen. Virol.,***91**, 452–462.

NOVOTNY L., POKOROVA D., RESCHOVA S., VICENOVA M., AXMANN R., VESELY T. &MIKLER J.R. (2010). First clinically apparent koi herpesvirus infection in the Czech Republic.*Bull.Eur.Assoc.Fish Pathol*.,**30**, 85–91.

PERELBERG A., SMIRNOV M., HUTORAN M., DIAMANT A., BEJERANO Y. &KOTLER M.(2003). Epidemiological description of a new viral disease afflicting cultured *Cyprinuscarpio* in Israel. *Israeli J. Aquaculture*, **55**,5–12.

PIKARSKY E., RONEN A., ABRAMOWITZ J., LEVAVI-SIVAN B., HUTORAN M., SHAPIRA Y., STEINITZ M., PERELBERG A., SOFFER D. &KOTLER M. (2004). Pathogenesis of acute viral disease induced in fish by carp interstitial nephritis and gill necrosis virus. *J. Virol.*, **78**,9544–9551.

PIKULKAEW S., MEEYAM T. &BANLUNARA W. (2009).The outbreak of Koi herpesvirus (KHV) in Koi (*Cyprinuscarpio*koi) from Chiang Mai Province, Thailand.*Thai J. Vet. Med*.,**39**,53–58.

SANO M., ITO T., KURITA J., YANAI T., WATANABE N., MIWA S. & IIDA T. (2004). First detection of koi herpesvirus in cultured common carp *Cyprinuscarpio* in Japan. *Fish Pathol.*,**39**,165–167.

SHAPIRA Y., MAGEN Y., ZAK T., KOTLER M., HULATA G. &EVAVI-SIVAN B. (2005).Differential resistance to koi herpes virus (KHV)/carp interstitial nephritis and gill necrosis virus (CNGV) among common carp (*Cyprinuscarpio* L.) strains and crossbreds.*Aquaculture*, **245**,1–11.

SHIMIZU T., YOSHIDA N., KASAI H. &YOSHIMIZU M.(2006).Survival of koi herpesvirus (KHV) in environmental water.*Fish Pathol.*,**41**,153–157.

ST-HILAIRE S., BEEVERS N., JOINER C., HEDRICK R.P. & WAY K. (2009). Antibody response of two populations of common carp, *Cyprinuscarpio*L., exposed to koi herpesvirus. *J. Fish Dis*.,**32**, 311–320.

ST-HILAIRE S., BEEVERS N., WAY K., LE DEUFF R.M., MARTIN P. & JOINER C.(2005).Reactivation of koi herpesvirus infections in common carp *Cyprinuscarpio*.*Dis. Aquat. Org.*, **67**,15–23.

SUNARTO A., MCCOLL K. A., CRANE M. ST J., SUMIATI T., HYATT A. D., BARNES A. C. & WALKER P. J. (2011). Isolation and characterization of koi herpesvirus (KHV) from Indonesia: identification of a new genetic lineage. *J. Fish Dis.,* **34**, 87–101.

TAYLOR N., WAY K., DIXON P.F., PEELER E.J., JEFFREY K. & DENHAM K.L. (2010).Koi herpesvirus (KHV): distribution and prospects for control in England and Wales.*J. Fish Dis.,***33**, 221–230.

UCHII K., MATSUI K., IIDA T. & KAWABATA Z.(2009).Distribution of the introduced cyprinid herpesvirus 3 in a wild population of common carp, *Cyprinuscarpio*L.*J. Fish Dis*.,**32**, 857–864.

WALTZEK T.B., KELLEY G.O., STONE D.M., WAY K., HANSON L., FUKUDA H., HIRONO I., AOKI T., DAVISON A.J. & HEDRICK R.P.(2005). Koi herpesvirus represents a third cyprinid herpesvirus (CyHV-3) in the family *Herpesviridae*. *J. Gen. Virol.*, **86**,1659–1667.

WALTZEK T.B., KELLEY G.O., ALFARO M.E., KUROBE T., DAVISON A.J. & HEDRICK R.P.(2009). Phylogenetic relationships in the family *Alloherpesviridae*.*Dis. Aquat. Org.*, **84**,179–194.

YUASA K., ITO T. & SANO M. (2008). Effect of water temperature on mortality and virus shedding in carp experimentally infected with koi herpesvirus. *Fish Pathol*., **43**, 83–85.

YUASA K., SANO M., KURITA J., ITO T. & IIDA T. (2005). Improvement of a PCR method with the Sph 1–5 primer set for the detection of koi herpesvirus (KHV). *Fish Pathol.*, **40**, 37–39.

*
* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la Herpesvirosis de la carpa koi (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)