

CAPÍTULO 2.1.2.

INFECCIÓN POR RANAVIRUS

1. **Ámbito de aplicación**

A efectos de este capítulo, la enfermedad causada por ranavirus se considera una infección clínica o subclínica sistémica por un miembro del género *Ranavirus* en las principales familias de anuros y caudados. No incluye el virus de la necrosis hematopoyética epizootica, que es el agente etiológico de la necrosis hematopoyética epizootica (NHE).

2. **Información sobre la enfermedad**2.1. **Factores del agente**2.1.1. **El agente patógeno, cepas del agente**

Los ranavirus pertenecen al género *Ranavirus*, de la familia Iridoviridae. La especie tipo es el virus de la rana tipo 3 (VR3) (Chinchar *et al.*, 2005). Otras especies son el iridovirus Bohle (IVB), el virus de la necrosis hematopoyética epizootica (VNHE), el virus del bagre europeo (VBE), el virus del siluro europeo (VSE) y el ranavirus de Santee-Cooper. En este género hay muchas otras especies provisionales. Desde el reconocimiento de la enfermedad causada por el VNHE en peces de aleta de Australia en 1986, en anfibios se han documentado síndromes necrotizantes sistémicos similares por iridovirus. Se han aislado ranavirus en ranas, salamandras y reptiles sanos o enfermos en América, Europa, Asia y Australia (Chinchar, 2002; Drury *et al.*, 1995; Fijan *et al.*, 1991; Hyatt *et al.*, 2002; Speare y Smith, 1992; Wolf *et al.*, 1968; Xia *et al.*, 2009; Zupanovic *et al.*, 1998b). Los ranavirus tienen viriones grandes (150–170 nm) icosaédricos, un genoma de ADN bicatenario de 150-170 kb, y se replican tanto en el núcleo como en el citoplasma, estructurándose en el citoplasma (Chinchar *et al.*, 2005). Poseen antígenos comunes que se pueden detectar por varias técnicas.

Especie	Nº de cepas	Ejemplos	Origen geográfico
<i>Virus Ambystoma tigrinum</i>	2	<i>Virus Ambystoma tigrinum</i> , ranavirus Regina	Norteamérica
<i>Iridovirus Bohle</i>	1	<i>Iridovirus Bohle</i>	Australia
<i>Virus de la rana tipo 3</i>	12	<i>Virus de la rana tipo 3</i>	Europa, Norteamérica y Sudamérica
		<i>Virus de la tortuga caja tipo 3</i>	Europa, Norteamérica y Sudamérica
		<i>Virus de Bufo bufo del Reino Unido</i>	Europa, Norteamérica y Sudamérica
		<i>Iridovirus Bufo marinus de Venezuela tipo 1</i>	Europa, Norteamérica y Sudamérica
		<i>Virus de Lucké triturus tipo 1</i>	Europa, Norteamérica y Sudamérica
		<i>Virus de la Rana temporaria del Reino Unido</i>	Europa, Norteamérica y Sudamérica
		<i>Virus del Redwood Park</i>	Europa, Norteamérica y Sudamérica
		<i>Virus del espinoso</i>	Europa, Norteamérica y Sudamérica
		<i>Virus del edema del renacuajo</i>	Europa, Norteamérica y Sudamérica
		<i>Virus del renacuajo tipo 2</i>	Europa, Norteamérica y Sudamérica
		<i>Virus de la rana atigrada</i>	Europa, Norteamérica y Sudamérica
		<i>Virus de la tortuga terrestre tipo 5</i>	Europa, Norteamérica y Sudamérica
Especies provisionales	3	<i>Iridovirus de la rana esculenta</i>	Europa, Norteamérica y Sudamérica
		<i>Iridovirus Testudo</i>	Europa, Norteamérica y Sudamérica

2.1.2. **Supervivencia fuera del hospedador**

Es probable que todos los ranavirus sean extremadamente resistentes a la desecación; el VNHE puede sobrevivir durante meses en el agua, en tejidos de pescado congelados durante más de 2 años

(Langdon, 1989), y en peces muertos congelados durante al menos un año (Whittington *et al.*, 1996). El ranavirus Santee-Cooper permanece viable en tejidos de pescado congelados durante al menos 155 días (Plumb y Zilbert, 1999). Se sabe menos sobre otros ranavirus, pero dada su similitud con el VNHE, se supone que tienen una estabilidad comparable. El virus de la salamandra *Ambystoma tigrinum* (VAT) resulta infeccioso para las salamandras si están en sedimento húmedo, pero no en sedimento de estanques secos, pero no se conoce la duración de la infectividad.

2.1.3. Estabilidad del agente (métodos eficaces de inactivación)

Los ranavirus (como se ejemplifica con el VNHE) son susceptibles al etanol al 70%, a 200 mg litro⁻¹ de hipoclorito de sodio o al calentamiento a 60°C durante 15 minutos (19). Si antes se deseca, el VNHE puede sobrevivir al calentamiento a 60°C durante 15 minutos (observaciones no publicadas). Se inactivaron 10⁷ unidades formadoras de colonias por ml de un ranavirus de los anfibios en 1 minuto en una solución de 150 mg litro⁻¹ de clorhexidina (Novasan ® al 0,75%), 180 mg litro⁻¹ de hipoclorito de sodio (lejía al 3%) o 200 mg litro⁻¹ de peroximonosulfato de potasio (Virkon ® al 1%) (Bryan *et al.*, 2009).

2.1.4. Ciclo de vida

La vía de infección se desconoce, pero los anfibios son susceptibles experimentalmente tras una exposición por inyección de baño o una exposición tras abrasiones inducidas en el laboratorio (Cunningham *et al.*, 2007; 2008).

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Se conocen casos de infecciones naturales por ranavirus en las principales familias de Anura y de Caudata (Carey *et al.* 2003a; 2003b; Cullen y Owens, 2002; Daszak *et al.*, 2003).

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

Las fases susceptibles de la vida del hospedador son todas las clases de edad, larvas, metamorfos y adultos.

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

No se conocen.

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

Los órganos y tejidos infectados por ranavirus en los anfibios no son siempre los mismos. A continuación se indican tres ejemplos: i) IVB infecta hígado, riñón, bazo, pulmón y otros tejidos parenquimatosos (Cullen y Owens, 2002). ii) VR-3 infecta células epiteliales de los túbulos proximales del riñón, el hígado y el tracto gastrointestinal (Robert *et al.*, 2005). iii) ranavirus del Reino Unido (RVRU) infecta a las células epiteliales, los fibroblastos, los linfocitos, los melanomacrófagos y una pequeña parte de células endoteliales de muchos tejidos, así como los hepatocitos y las células de Kupffer del hígado, la epidermis y la dermis (Cunningham *et al.*, 2008). Se halla VAT en la piel, el bazo, el hígado, las células epiteliales del túbulo renal y los tejidos linfoides y hematopoyéticos de las salamandras.

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

No se conoce.

2.2.6. Vectores

Los anfibios pueden resultar infectados de la misma forma que los peces, y, por ello, se incluyen aquí los detalles relacionados con el VNHE. Los posibles vectores son redes, barcos y demás equipo, así como anfibios utilizados como cebos por parte de pescadores deportivos. Las aves son posibles vectores mecánicos, puesto que los ranavirus pueden ser vehiculados en el intestino, en las plumas, en las patas y en el pico. Es importante recordar que los ranavirus probablemente resulten inactivados a las temperaturas corporales habituales de las aves (40-44°C). No obstante, es posible que los ranavirus (como se ha observado en el VNHE) puedan propagarse por regurgitación de material ingerido en cuestión de pocas horas tras la ingesta (Whittington *et al.*, 1996). Además, se han observado casos de infección en anfibios por la exposición al sedimento de lugares donde se han producido muertes por ranavirus.

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

No se conocen.

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mecanismos de transmisión

Pueden producirse infecciones por ranavirus por contacto entre animales, y por la ingesta de animales infectados, moribundos o muertos (por ejemplo, Cullen y Owens, 2002; Picco y Collins, 2008). Estos virus también se pueden transmitir entre sistemas fluviales y embalses muy apartados. Se considera que la transmisión tiene lugar por medios distintos del agua (véase arriba); algunos de los mecanismos son el traslado de peces o cebos vivos por parte de pescadores deportivos (por ejemplo, Pico *et al.*, 2007).

2.3.2. Prevalencia

Se han notificado infecciones por ranavirus en cinco continentes, incluida Asia (Gray *et al.*, 2009); su prevalencia, a pesar de aplicar una serovigilancia amplia y exhaustiva y sistemas de detección del antígeno, no se conoce.

2.3.3. Distribución geográfica

Se han recuperado ranavirus de ranas de salvajes o de piscifactoría, sanas y enfermas, en América, Europa continental, el Reino Unido y Asia (Ariel *et al.*, 2009; Chinchar, 2002; Cunningham *et al.*, 1996; Drury *et al.*, 1995; Fijan *et al.*, 1991; Fox *et al.*, 2006; Green *et al.*, 2002; He *et al.*, 2002; Wolf *et al.*, 1968; Zhan *et al.*, 2001; Zupanovic *et al.*, 1998b) así como en salamandras manchadas de vida libre de la especie *Ambystoma maculatum* en Norteamérica (Docherty *et al.*, 2003; Jancovich *et al.*, 2003). El iridovirus Bohle (IVB), que es claramente distinto del VR-3, se aisló originalmente en renacuajos enfermos de la especie *Limnodynastes ornatus* en el norte de Queensland, Australia (Speare y Smith, 1992). Desde entonces no se ha vuelto a aislar, aunque existen indicios serológicos de infección por ranavirus en sapos gigantes (*Bufo bufo*) en esa región (Whittington *et al.*, 1996). Otra especie de ranavirus claramente distinta, el virus de la salamandra *Ambystoma tigrinum* (VAT), es responsable de muertes en la salamandra atigrada *A. tigrinum* (Jancovich *et al.*, 2005). También se han recuperado virus estrechamente relacionados con el VR-3 de reptiles. Se aisló el iridovirus Wamena (IVW) en Australia en pitones arborícolas verdes, *Chondropython viridis*, enfermas extraídas por contrabando de Papúa Occidental (Irian Jaya) mientras que se recuperó el iridovirus de *Testudo hermanni* (IVTH) (TV-CH8) de tortugas de Hermann (*Testudo hermanni*) de Europa. Tanto el IVW como el IVTH presentaron más de un 97% de homología de las secuencias de nucleótidos con la del VR-3 en las regiones de la proteína principal de la cápsida (MCP) que se examinaron (Hyatt *et al.*, 2002; Marshang *et al.*, 1999).

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

La mortalidad y la morbilidad varían en función de la especie. Las infecciones de laboratorio y los datos de campo muestran que la mortalidad pueden oscilar entre baja (incluso del 0%) y del 100% de los animales infectados de un grupo experimental según la especie, el virus y la edad y estado sanitario del hospedador tras periodos de infección cortos (Harp y Petranka, 2006; Hyatt *et al.* 1998; Pearman *et al.*, 2004). Sin embargo, otras pruebas en las que se utilizaron distintas especies hospedadoras y ranavirus dieron resultados variables (Brunner *et al.*, 2004; 2007; Cunningham *et al.*, 2007).

2.3.5. Factores ambientales

Las epizootias naturales por ranavirus en los anfibios parecen ser similares a las de piscifactoría (como las del VNHE). Las epizootias parecen ser estacionales y pueden estar relacionadas con un mal manejo (poblaciones en cautividad) y con la sobrepoblación (en la naturaleza o en cautividad). Se considera que en algunos anfibios, como las salamandras (bibliografía) la enfermedad está relacionada con la aparición anual de grandes cantidades de animales jóvenes no inmunes y su posterior exposición al virus en aguas poco profundas (Brunner *et al.*, 2004; 2007; Green *et al.*, 2002; Greer y Collins, 2008; Greer *et al.*, 2008; Jancovich *et al.*, 1997; 2001; Rojas *et al.*, 2005).

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 disponible.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia.

No se ha probado.

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

No se ha probado.

2.4.6. Agentes bloqueantes

No se han probado.

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

No se han probado.

2.4.8. Prácticas generales de manejo

No se han probado.

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

Se ha validado un método sencillo para la preparación de tejidos para el cultivo celular y el enzoinmunoanálisis (ELISA) de peces (Whittington y Steiner, 1993; Whittington *et al.*, 1999).

Se bañan anfibios grandes durante 30 segundos en etanol al 70%; se bañan anfibios pequeños durante 5 segundos en etanol al 70% y a continuación se enjuagan en agua estéril. Se secan de forma aséptica en una cabina de bioseguridad de Clase II.

Anfibios grandes: (>60 mm de longitud) se extrae 0,1 g de hígado, riñón, bazo (\pm otros órganos en estuaciones específicas) y se introducen en tubos estériles de 1,5 ml. Existen tubos especiales para ser utilizados con morteros para triturar tejidos (véase abajo), pero también pueden servir los tubos estándar de 1,5 ml. En algunas situaciones, puede juntarse el hígado, el riñón y el bazo en un solo tubo (véase el apartado 3.3).

Anfibios medianos (30–60 mm de longitud): se introducen todas las vísceras en el tubo.

Anfibios pequeños (<30 mm de longitud): se elimina la cabeza y la cola y se introduce el resto del animal en el tubo.

3.2. Conservación de las muestras para su envío

Para el cultivo celular y el ELISA, se congelan los tubos con tejidos a temperaturas de entre -20°C y -80°C hasta que sean necesarios.

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

3.3. Combinación de varias muestras

No se ha evaluado cuál es el efecto de combinar varios tejidos de distintos animales en la sensibilidad de las pruebas diagnósticas. No obstante, a menudo se combinan tejidos para el aislamiento de virus en lotes de 5 o 10 animales por prueba.

3.4. Órganos o tejidos de elección

Hígado, riñón, bazo, pulmón, piel.

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

Los tejidos que no son adecuados son las gónadas, los líquidos gonadales, el esperma y los huevos, puesto que no se ha observado infección del tracto reproductor ni de que los reproductores intervengan en los ciclos de infección.

4. Métodos de diagnóstico

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

Existen dos síndromes de las ranas relacionados con la infección por ranavirus: un síndrome ulceroso crónico y un síndrome hemorrágico agudo (Cunningham *et al.*, 1996). Las salamandras infectadas por el virus *Ambystoma tigrinum* desarrollan dermatitis y enteritis ulcerosas. Las larvas afectadas tienen pequeñas hemorragias multifocales que afectan al tejido subcutáneo de la superficie plantar de los pies, la zona inguinal y la zona de la cloaca, con edema ventral, y la piel pueden contener focos claros (Bollinger *et al.*, 1999; Docherty *et al.*, 2003).

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Las alteraciones en el campo y del comportamiento difieren entre especies, entre estadios de vida y según la gravedad de la enfermedad. Las alteraciones incluyen lordosis, natación errática, letargia y pérdida del equilibrio (Gray *et al.*, 2009).

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

Es posible que no haya lesiones macroscópicas ni inespecíficas. En las ranas existen dos síndromes relacionados con la infección por ranavirus: el síndrome ulceroso y el síndrome hemorrágico (Cunningham *et al.*, 1996). En las salamandras infectadas por el virus *Ambystoma tigrinum* puede haber dermatitis ulcerosa, focos claros en la piel, pequeñas hemorragias multifocales que afectan al tejido subcutáneo de la superficie plantar de los pies, la zona inguinal, la cloaca, la superficie subserosa del intestino, y el hígado puede estar pálido e hinchado; puede haber edema ventral (Bollinger *et al.*, 1999; Docherty *et al.*, 2003).

4.2.2. Bioquímica clínica

No es aplicable.

4.2.3. Anatomopatología microscópica

El IVB y el VR3 causan hemorragia y necrosis multifocales en varios órganos (Cullen y Owens, 2002; Robert *et al.*, 2005). Las salamandras infectadas por el virus *Ambystoma tigrinum* desarrollan necrosis en muchos tejidos, incluidos el bazo, el hígado, las células epiteliales de los túbulos renales y tejidos linfoides y hematopoyéticos (Bollinger *et al.*, 1999). Puede haber cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos anfífilos en células de varios órganos junto con células únicas o zonas de tamaño variable de necrosis focal (Bollinger *et al.*, 1999; Docherty *et al.*, 2003). En la piel puede haber focos de espongirosis y degeneración por abombamiento, erosión y ulceración e hiperplasia de células epiteliales epidérmicas que pueden tener cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos (Bollinger *et al.*, 1999).

4.2.4. Preparaciones húmedas

No es aplicable.

4.2.5. Frotis

No se han probado.

4.2.6. Cortes fijados

Consúltense el apartado 4.3.

4.2.7. Microscopía electrónica/citopatología

Los tejidos afectados (como el riñón, el hígado o el bazo) contienen células que presentan necrosis. Las células contienen inclusiones citoplasmáticas llamativas que son zonas enrarecidas del citoplasma en las que los virus se estructuran. Dentro del citoplasma, se observan agregados (matrices paracrystalinas) de virus icosaédricos grandes (los ranavirus pueden variar mucho de tamaño, midiendo entre 150 nm y más de 170 nm) sin envoltura; también se observan virus aislados. Salen virus enteros (con los centros electrodensos incluidos) de las células infectadas a través de la membrana plasmática por gemación. Los núcleos de las células infectadas a menudo están situados en la periferia y están deformados.

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 de tejidos en formalina tamponada neutra al 10%, inclusión en parafina, preparación de cortes de 10 µm y tinción con H/E para demostrar la necrosis tisular y la presencia de cuerpos basófilos de inclusión intracitoplasmática. Estos cuerpos de inclusión indican, aunque no confirman, los ranavirus. También pueden teñirse cortes incluidos en parafina y fijados con formalina utilizando un método de inmunoperoxidasa (véase abajo) para identificar el antígeno ranavirus asociado a las lesiones necróticas.

Microscopía electrónica: con el fin de demostrar la necrosis tisular, la presencia de virus y la presencia de cuerpos de inclusión víricos pueden utilizarse métodos sistemáticos de corte ultrafino para preparar tejidos y cultivos celulares (Eaton *et al.*, 1991). Pueden utilizarse tejidos y células fijados con una pauta alternativa de fijación y de inclusión para la detección de antígeno (Hyatt, 1991).

Microscopía electrónica de contraste negativo: para detectar virus pueden utilizarse sobrenadantes de tejidos homogeneizados mediante homogeneizador Dounce (al 10% [p/v]) y cultivos celulares. Los ranavirus tienen un aspecto definido. Tienen un diámetro variable (150-180 nm) y una envoltura limitante derivada de la membrana (membrana plasmática) que envuelve una cápsida de simetría sesgada. Debajo de la cápsida hay una membrana *de novo* que envuelve por sí misma un centro que contiene ADN bicatenario (ds) y proteínas menores. Estas preparaciones también se pueden utilizar para confirmar la antigenicidad del ranavirus (Eaton *et al.*, 1991).

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

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 anfibio para el aislamiento de virus y para ELISA

Se ha descrito un método sencillo de preparación de tejidos para el cultivo celular y para ELISA (Whittington y Steiner, 1993; Whittington *et al.*, 1999) (véase la obtención de muestras en el apartado 3.1).

- i) Se congelan los tubos con los tejidos a -80°C hasta que sean necesarios.
- ii) Se añaden 0,5 ml de medio homogeneizador (medio mínimo esencial Eagle, con sales de Earle con glutamina [MEM] con 200 Unidades Internacionales [UI] ml⁻¹ penicilina, 200 µg ml⁻¹ de estreptomycin y 4 µg ml⁻¹ de amfotericina B) a cada tubo. Se tritura el tejido con una mano de mortero estéril hasta obtener una masa fina.

- iii) Se añaden otros 0,5 ml de medio homogeneizador a cada tubo y se mezclan con una mano de mortero.
- iv) Se añaden tres perlas de vidrio estéril a cada tubo (de 3 mm de diámetro) y se tapan los tubos.
- v) Se somete la suspensión al vórtex enérgicamente durante 20-30 segundos y se guarda a 4°C durante 2 horas.
- vi) Se somete la suspensión a vórtex de nuevo como antes y se centrifuga durante 10 minutos a 2500 *g* en una microcentrífuga de mesa.
- vii) Se transfiere el sobrenadante, ahora denominado homogenado de tejido clarificado, a un tubo nuevo estéril. Los homogenados se pueden congelar a -80°C hasta que sean necesarios para el aislamiento del virus y para el ELISA.

Cultivo celular/medios artificiales

El cultivo celular es la prueba de referencia pero es cara y lenta. Los ranavirus crecen bien en muchas líneas celulares de peces, como BF-2 (alevines de *Lepomis macrochirus*; ATCC CCL 91), FHM (*Pimephales promelas*; ATCC CCL 42), EPC (epitelioma papuloso de carpa [Fijan *et al.*, 1983]), y CHSE-214 (línea celular de embrión de salmón real; ATCC CRL 1681) a temperaturas de entre 15°C y 22°C (Crane *et al.*, 2005), pero el Laboratorio de Referencia prefiere BF-2, que utiliza una temperatura de 22°C tanto antes como después de la inoculación con virus. El procedimiento para la BF-2 se indica a continuación. En el apartado sobre tinción con inmunoperoxidasa (véase el apartado 4.3.1.2.2) se indica un procedimiento para las células CHSE-214. El virus *Ambystoma tigrinum* produce un ECP igual que el del VNHE en FHM, RTG y células de lengua de rana mugidora a 25°C (Docherty *et al.*, 2003). Otros han utilizado fibroblastos de embrión de rana a 27°C o células FHM para aislar o propagar las cepas del Reino Unido de VR-3 (Cunningham *et al.*, 1996, 2007).

La identidad de los virus en el 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 para el cultivo celular: las células se cultivan (en frascos, tubos o placas multi-pocillo) con medio de crecimiento (MEM + suero fetal bovino [FBS] al 10% con 100 UI ml⁻¹ de penicilina, 100 µg ml⁻¹ de estreptomycin y 2 µg ml⁻¹ de amfotericina B). Las células se incuban hasta que casi confluyen a 22°C, lo cual puede tardar hasta 4 días, en función de la rapidez de siembra. El medio se cambia por un medio de mantenimiento (MEM con FBS al 2% y 100 UI ml⁻¹ de penicilina, 100 µg ml⁻¹ de estreptomycin y 2 µg ml⁻¹ de amfotericina B) el día de la inoculación. Se prepara una dilución a 1/10 utilizando medio homogeneizador de homogenados simples o combinados. Cada cultivo se inocula con 100 µl de muestra por ml de medio de cultivo. Esto representa una dilución a 1/100 de un homogenado de tejido de 0,1 mg/ml. Un cultivo se inocula con homogenado no diluido, y dos con homogenado diluido a 1/10. No se utiliza paso de adsorción. Como alternativa, pueden inocularse directamente dos de tres cultivos con 10 µl de homogenado no diluido por ml de medio de cultivo. Obsérvese que el uso de un gran inóculo no diluido a menudo cursa con una alta tasa 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, y se pasan 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 se inocula el sobrenadante del cultivo en células frescas como antes (P2), es decir 100 µl de sobrenadante de P1 por ml de medio de cultivo. Los sobrenadantes P1 restantes se transfieren a tubos estériles de 5 ml y se guardan a 4°C para ser analizados mediante ELISA o PCR u otro medio para confirmar que la causa del efecto citopático (ECP) es el VNHE. P2 se incuba como antes, y se lleva a cabo un tercer pase si es necesario.

Interpretación de los resultados

El ECP está bien desarrollado y consiste en una lisis focal rodeada de células granulares redondas. Esta alteración se extiende rápidamente afectando a toda la monocapa, que se desprende y se desintegra.

4.3.1.2.2. Métodos de detección de antígeno basados en anticuerpos

Es importante destacar que los anticuerpos utilizados en todos los métodos relacionados (inmunoperoxidasa, ELISA de captura de antígeno y microscopía inmunoelectrónica) reaccionan de forma cruzada con todos los ranavirus conocidos (Hyatt *et al.*, 2000).

4.3.1.2.2.1. *Detección de ranavirus utilizando tinción por inmunoperoxidasa de cultivos celulares infectados*

Principio de la prueba: los ranavirus se replican en cultivos celulares. Al añadir un detergente suave se permeabilizan las células, lo cual permite que un anticuerpo de conejo purificado por afinidad se una a proteínas víricas intracelulares. Se detecta el ranavirus mediante un anticuerpo biotinilado anti-especie y un conjugado estreptavidina-peroxidasa. La adición de un sustrato da lugar a una tinción de color “rojo ladrillo” en 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 llamativa y específica. No obstante, la prueba no se ha validado respecto a sensibilidad y reproducibilidad.

Preparación de células: el procedimiento descrito abajo es para las células CHSE-214. También se pueden utilizar otras líneas celulares recomendadas.

- i) Se siembran placas de 24 pocillos de la línea CHSE-214 el día antes de utilizarlas con 250.000 células/pocillo (o 4 millones de células en 40 ml de medio de crecimiento por placa) en 1,5 ml de medio de crecimiento (MEM de Earle con aminoácidos no esenciales [EMEM], FBS al 10%, N-2-hidroxietilpiperazina 10 mM, N-2-etanosulfónico [HEPES], glutamina 2 mM, 100 UI de penicilina y 100 µg de estreptomycin) y se incuban en un 5% de CO₂ a 22°C durante toda la noche. (Nota: los cultivos deben ser casi confluentes 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 al 10% de tejido triturado (por ejemplo, de hígado, riñón o bazo), se incuba durante 1 hora (22°C) y a continuación se añaden 1,5 ml de medio fresco de mantenimiento (igual que para el medio de crecimiento excepto por el FBS al 2%) y se devuelve a la incubadora (22°C).
- iii) Se observa si los cultivos presentan ECP. Si no aparece ECP durante los primeros 10 días, se pasan los cultivos por células CHSE frescas recogiendo las células y el medio y añadiendo 150 µl a las células de la placa nueva; obsérvese que las células no se congelan-descongelan. No hay necesidad de desechar el medio existente, solo de devolver la placa nueva a la incubadora (22°C). Se observa de nuevo a diario si aparece ECP.
- iv) Se fijan las células (se añaden 50 µl de una solución de formalina al 20% a cada pocillo (en el caso de los cultivos en placas de 96 pocillos con 200 µl de medio de cultivo/pocillo) o bien 400 µl (en el caso de los cultivos en placas de 24 pocillos con 1,6 ml de medio de cultivo/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), se desecha la mezcla de medio/formalina y los pocillos se enjuagan dos veces con PBS-A (solución salina tamponada con fosfato, sin Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺) para eliminar la formalina. Se añade más PBS-A si las placas van a guardarse a 4°C.

Protocolo

- i) Se diluye anticuerpo anti-VNHE y suero normal a una concentración de trabajo como se describe abajo (protocolo de fijación para inmunocitoquímica) para el agente en cuestión en solución de leche desnatada (SM) al 1% (PBS-A (SM)) hasta el volumen necesario para la prueba.
- ii) Se retira el PBS-A de los pocillos (con cultivos celulares fijados) y se lavan los pocillos dos veces con PBS/Tween 20 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 incuba en 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 biotinilado anti-especie (anticuerpo secundario) en solución de SM al 0,1% como se describe en el protocolo de fijación (abajo) para el agente en cuestión hasta el volumen necesario para la prueba.
- iv) Se elimina la solución de anticuerpo primario y se lavan los pocillos tres veces con PBST. Se añade anticuerpo secundario a todos los pocillos. Se incuba en 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 de estreptavidina-peroxidasa en solución de SM al 0,1% para el agente en cuestión hasta el volumen necesario para la prueba.

- vi) Se elimina la solución de anticuerpo secundario y se lavan los pocillos tres veces con PBST. Se añade conjugado a cada pocillo. Se incuba en 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 sustrato madre de solución de 3-amino-9-etilcarbazol (AEC): se disuelve un comprimido de AEC (20 mg) en 2,5 ml de dimetilformamida.
- viii) Se elimina el conjugado de los pocillos. Se lavan (tres veces) con PBST.
- ix) Se diluye solución madre disuelta de AEC 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 utilizarla, se añaden 25 µl de peróxido 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 aplica una tinción de contraste con hematoxilina de Mayer (50 µl/pocillo o 200 µl/pocillo) durante 1 minuto y se enjuaga con agua desionizada.
- xii) Se añaden 50 µl de agua de grifo de Scott y se enjuaga con agua desionizada y se seca al aire.

Interpretación de los resultados

Reacción positiva: la tinción celular tipo granular, focal y de color rojo ladrillo indica la presencia de virus identificado por el anticuerpo diagnóstico.

Reacción negativa: ausencia de 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, pálida y rosácea por todo el cultivo. Esta tinción de fondo podría estar causada por varias razones, como una reacción de anticuerpos inespecífica frente a 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
10 × PBS-A	10 ml

10 × PBS-A

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

NaCl	80,0 g
Na ₂ HPO ₄	11,5 g
KCl	2,0 g
KH ₂ PO ₄	2,0 g
Agua destilada	1,0 litro

NOTA: algunas sales se suministran con grupos adicionales de agua. Si se utilizan estos reactivos, se ajustan las masas para asegurarse de que se añade la masa adecuada de sal; por ejemplo, para el Na₂HPO₄·2H₂O se añaden 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 de ranavirus utilizando ELISA de captura de antígeno

Se ha validado un ELISA de captura de antígeno para detectar el VNHE en cultivos celulares y directamente en homogenados de tejido de pescado. La misma prueba se puede aplicar a tejidos de anfibios. La sensibilidad analítica es de 10³ a 10⁴ DICT₅₀ ml⁻¹. La especificidad se acerca al 100% y la sensibilidad de la detección directa en tejidos de pescado es del 60% respecto al método de referencia, que es el aislamiento del virus en células BF-2 (Drury *et al.*, 1995; Marsh *et al.*, 2002; and datos no publicados). El ELISA es útil tanto para el diagnóstico como para la certificación. No pueden utilizarse pruebas de neutralización 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 epítomos de la proteína principal de la cápsida (MCP) y no son neutralizantes (datos no publicados). Se han desarrollado

anticuerpos de conejo anti-VNHE par ser utilizados en el ELISA de captura de antígeno, tinción por inmunoperoxidasa y microscopía inmunoelectrónica (Hengstberger *et al.*, 1993; Hyatt *et al.*, 1991; Reddacliff y Whittington, 1996). En el Laboratorio de Referencia pueden adquirirse los protocolos y reactivos correspondientes.

Muestras: muestras de homogenado tisular preparadas utilizando un protocolo validado (véase abajo) y cultivos celulares.

Principio de la prueba: se capturan partículas de VNHE de la muestra mediante anticuerpo de conejo purificado por afinidad que se aplica recubriendo la placa. Se detecta el VNHE mediante un segundo anticuerpo y conjugado marcado con peroxidasa utilizando el cromógeno ABTS ácido 2,2'-azino-di-(3-etil-benzotiazolina)-6-sulfónico. La enzima se inactiva tras 20 minutos y la densidad óptica (OD) resultante se compara con los estándares.

Componentes de la prueba y preparación de los reactivos

- i) Se precisan placas de microtitulación de fondo plano.
- ii) La inmunoglobulina de conejo anti-VNHE purificada por afinidad y el antisuero de oveja anti-VNHE se suministran liofilizados. Se reconstituyen utilizando 1 ml de agua purificada y se deja el vial en reposo a RT durante 2 minutos. Se mezcla el vial con mucho cuidado. Cuando se guardan a -20°C, estos reactivos son estables durante al menos 4 años. Para el uso sistemático en el ELISA, se recomienda preparar soluciones de trabajo de ambos anticuerpos a una dilución de 1/10 en una solución salina de tris, glicerol y mertiolato (fórmula al final de este apartado). A -20°C, estas son estables al menos durante 5 años y no solidifican a esta temperatura.
- iii) El conjugado anti-inmunoglobulina de oveja marcado con peroxidasa (reactivo comercial, KPL #14-23-06; 0,5 mg) se suministra en forma de polvo liofilizado. En este reactivo se ha observado una considerable constancia en la actividad entre distintos lotes a lo largo de un periodo de 15 años. Este producto se debe reconstituir en agua de glicerol al 50% estéril, distribuirse en alícuotas de 150 µl y guardarse a -20°C en forma de solución madre no diluida. Se prepara una solución de trabajo añadiendo 900 µl de TSGM a 100 µl de solución madre no diluida. La solución de trabajo también se guarda a -20°C y es estable durante al menos 1 año. Deben titularse nuevos lotes de este conjugado contra un lote más antiguo aplicando protocolos estándar.
- iv) El antígeno control de VNHE, inactivado por calor, se suministra en forma de polvo liofilizado. Se reconstituye en 1 ml de agua estéril y se guarda en pequeñas alícuotas a -20°C. Se preparan diluciones utilizando PBSTG (PBS + Tween + gelatina) el mismo día que se lleva a cabo la prueba. Las diluciones de antígeno VNHE control (A, B, D y F) cubren el intervalo de la señal de respuesta de la prueba y permiten realizar un procedimiento de normalización.

Equipo

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

Se recomienda utilizar un lector automático de placas, aunque las placas también pueden leerse a simple vista.

Para preparar las diluciones de todos los reactivos y para cargar reactivos en los pocillos de las placas de microtitulación deben utilizarse pipetas de precisión calibradas (como las Gilson).

Protocolo

- i) Se recubre una placa de ELISA de 96 pocillos (100 µl pocillo⁻¹) con anticuerpos de conejo purificados por afinidad anti-VNHE diluidos a 1/12.800 en tampón borato de recubrimiento. Se incuba durante toda la noche a 4°C.
- ii) Se lava la placa cinco veces con tampón de lavado (agua Milli-Q (MQ) purificada más Tween 20 al 0,05%). Es importante recordar que en este y otros pasos también puede utilizarse agua destilada y desionizada.
- iii) Se prepara una solución de bloqueo: se calientan las soluciones en un microondas o baño de agua para disolver la gelatina, a continuación se enfrían hasta que alcancen la RT.

- iv) Se bloquean los lugares de unión restantes utilizando solución de bloqueo (100 µl pocillo⁻¹) (gelatina al 1% [p/v] en diluyente PBSTG [PBS, Tween 20 al 0,05% (v/v), gelatina al 0,1% (p/v)]). Se incuba a RT durante 30 minutos.
- v) Se lava la placa cinco veces como antes.
- vi) Se trabaja en una cabina de bioseguridad de 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 a pocillos por duplicado. Se incuba durante 90 minutos a RT.

Los antígenos control son diluciones de un sobrenadante de cultivo celular de VNHE 86/8774 inactivado por calor. Es esperable que los controles den las siguientes OD, aunque habrá cierta variación entre laboratorios y, por tanto, deberá permitirse una variación de ±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 OD son los determinados por el Laboratorio de Referencia de la OIE para el VNHE y variarán en función del lote de antígeno control. Los valores anteriores corresponden al lote 86/8774-4-5-01. En este ELISA, el valor de corte que determina qué muestras de homogenado de tejido clarificado de perca y de trucha arcoiris son positivas y cuáles son negativas se estima por el valor de OD de la D control en cada placa.

- vii) Se lava la placa a mano para evitar contaminar el lavador de placas. Se trabaja en una cabina de Clase II. Se aspiran los pocillos mediante una pipeta multicanal. Se enjuaga la placa dos veces.
- viii) Se lava la placa cinco veces en el lavador de placas, como antes.
- ix) Se añade el segundo anticuerpo de oveja anti-VNHE diluido a 1/32.000 en PBSTG (100 µl pocillo⁻¹). Se incuba 90 minutos a RT.
- x) Se lava la placa cinco veces en el lavador de placas.
- xi) Se añade el conjugado diluido a 1/1500 en PBSTG (100 µl pocillo⁻¹). Se incuba 90 minutos a RT.
- xii) Se lava la placa cinco veces en el lavador de placas.
- xiii) Se añade el sustrato ABTS (22 ml de ABTS + 10 µl de H₂O₂) (100 µl pocillo⁻¹) y se coloca la placa en el agitador. Se cronometra este paso desde el momento en que se añade el sustrato a los primeros pocillos de la placa 1. Se incuba 20 minutos.
- xiv) Se añade de inmediato solución de parada de ABTS (50 µl pocillo⁻¹), se agita la placa brevemente y se lee la OD a 405 nm. Se calcula la OD media del 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 queda cerca del valor de corte entre positivo y negativo.

Normalización de datos y control de calidad del límite de decisión

Si se desea normalizar los datos obtenidos de distintas placas y a lo largo del tiempo, o para llevar a cabo un control de calidad del límite de decisión, puede aplicarse el siguiente procedimiento. Se realizan análisis de antígenos control en ELISA al menos en cinco ocasiones a lo largo de un periodo de 3 semanas (un total de 20 placas de ELISA independientes). Se calcula la OD media para cada antígeno control. A continuación, para cada placa que se vaya utilizando, se calcula un factor de corrección de la placa (PCF) del siguiente modo:

$$PCF = (OD \text{ media del control A} (OD \text{ real} + OD \text{ media del control B} / OD \text{ real} + OD \text{ media del control D} / OD \text{ real} + OD \text{ media del control F} / OD \text{ real}) / 4.$$
 Se multiplica la OD media real de cada muestra por el PCF de la placa y se notifican estos valores.

Se permite una variación del PCF de entre 0,8 y 1,2, lo cual se aproxima a un coeficiente de variación del 10%. Los valores que queden fuera de este intervalo sugieren que la placa tiene que volver a analizarse. Los gráficos del PCF que pueden ir registrándose a lo largo del tiempo constituyen un medio útil para el seguimiento de la estabilidad de los reactivos, de las variaciones

en el procedimiento y de posibles errores del operario. Este método de control de calidad se ha validado para el ELISA de captura de antígeno.

Tampones y otros reactivos

Tampón borato de recubrimiento

Ácido bórico	6,18 g
Tetraborato de sodio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)	9,54 g
NaCl	4,38 g
Agua MQ hasta	1 litro
Se esteriliza en autoclave	

Solución salina tamponada con fosfato 10 x

NaCl	80,00 g
KCl	2,00 g
Na_2HPO_4	11,50 g
KH_2PO_4	2,00 g
Agua MQ hasta	900 ml
Se ajusta el pH a 7,2 con HCl o NaOH; se prepara hasta 1 litro	
Se esteriliza en autoclave	

Para obtener la concentración de trabajo, se diluye a 1/10 y se vuelve a comprobar el pH. Para guardar polvo en botes, se prepara el doble de la cantidad de polvo anterior; se guarda; para obtener la solución, se añaden 1,8 litros de agua MQ, se ajusta el pH, y se prepara un volumen total de 2 litros.

ABTS

<i>Tampón citrato fosfato</i>	
Ácido cítrico	21,00 g
Na_2HPO_4	14,00 g
Agua MQ hasta 800 ml; se ajusta el pH a 4.2; se prepara hasta	
	1 litro
ABTS	0,55 g
Tampón citrato fosfato hasta	1 litro

Se distribuye en alícuotas de 22 ml y se congela.

Inmediatamente antes de utilizarlo, se añaden 10 µl de H_2O_2 por cada alícuota de 22 ml.

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

Ácido cítrico	10,5 g
Agua MQ hasta	500 ml
Se añaden 50 mg de azida sódica o 1 ml de solución al 5%.	

Conjugado KPL #14-23-06¹

Crioprotector TSGM

Solución Tris/salina 10x, 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 frasco oscuro a 4°C	

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. Visítese: www.kpl.com para enlaces a distribuidores de todo el mundo.

Solución Tris/salina 10x (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 cultivos o cultivos celulares*

Principio de la prueba: para el examen por microscopía electrónica pueden utilizarse cultivos celulares, tejidos y/o homogenados de tejidos. La microscopía electrónica convencional (examen de cortes ultrafinos) genera datos sobre la estructura y la morfogénesis del virus. La microscopía electrónica de contraste negativo produce imágenes que pueden utilizarse para examinar la estructura de las partículas del virus. El uso de anticuerpos específicos contra los ranavirus y oro conjugado con estas preparaciones permite examinar tanto la ultraestructura como la antigenicidad (Hyatt, 1991). Estos datos colectivos permiten la clasificación en el género *Ranavirus*.

Cultivos celulares y tejidos

- i) Se fijan los tejidos o cultivos celulares como describe Hyatt (1991). En pocas palabras, se utiliza glutaraldehído tamponado al 2,5% (v/v) (cacodilato o fosfato) para fijar células durante 40 minutos. Tras la fijación primaria, las células se enjuaga en el mismo tampón (3 x 20 minutos), se post-fijan en tetróxido de osmio tamponado al 1% (p/v), se deshidratan en soluciones seriadas de alcohol (70-100%) y se infiltran y fijan en una resina de epoxi (como Spurr's o Epon). Para el marcaje con oro de cortes ultrafinos en resina, debe prestarse atención a las pautas de fijación e inclusión. Así, por ejemplo, las células deben fijarse en glutaraldehído al 0,25% (v/v) con paraformaldehído al 2-4%. No se utiliza fijación secundaria y las células se infiltran y se incluyen en una resina acrílica como la LR White.
- ii) Tras la fijación e inclusión, se realizan cortes ultrafinos y se transfieren a rejillas bañadas en níquel.
- iii) Se realizan cortes de los bloques apropiados.
- iv) Se bloquean en una solución de leche desnatada en polvo 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 lava con PBS-A (3 x 1 minutos). Este es un paso opcional que solo se utiliza si hay un exceso de aldehídos libres (un fondo alto puede ser indicativo de ello).
- vii) Si no se está utilizando proteína A-oro, se bloquea en suero normal de la especie – este suero debe ser homólogo al que se utiliza para formar los complejos 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 las reacciones iniciales con diluciones a 1/100 a 1/2700 (con diluciones a un tercio). Se diluyen los anticuerpos en solución de gelatina de pescado de agua fría al 1% (v/v) en PBS-A, (60 minutos, RT).
- ix) Se enjuaga en solución de gelatina de pescado de agua fría al 1% (v/v) en PBS-A, (6 x 3 minutos).
- x) Se incuba en anticuerpo secundario marcado con oro o proteína A-oro o proteína G-oro. La dilución sugerida es 1/40 en PBS-A que contenga albúmina de suero bovino (BSA) al 1% (p/v), Tween 20 al 0,1% (v/v) y Triton X al 0,1% (v/v), durante 60 minutos, a RT.
- xi) Se enjuaga en PBS-A (6 x 3 minutos, RT).
- xii) Se post-fija en una solución de glutaraldehído (v/v) al 2,5% en PBS-A (5 minutos, RT).
- xiii) Se enjuaga en agua (RO) (3 x 3 minutos, RT).
- xiv) Se seca sobre papel de filtro (no importa de qué tipo).
- xv) Se tiñe en acetato de uranilo y en acetato de plomo.

Interpretación de los resultados

Los virus del interior del citoplasma de las células infectadas quedarán marcados específicamente con oro. Los virus se situarán de forma peculiar, dentro de cuerpos de inclusión y de matrices paracrystalinas.

Marcado con oro de partículas víricas (virus adsorbidos a rejillas)

- i) Se homogeneiza mediante Dounce una solución 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) a un sustrato de 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% (v/v) en PBS (2 minutos).
- v) Se lava en PBS (3 × 3 minutos).
- vi) Se bloquea con solución de gelatina de pescado de agua fría al 5% (v/v) (Sigma) en PBS (10 minutos) y a tampón de incubación (PBS/solución de gelatina de pescado de agua fría al 0,1%).
- vii) Se incuba con anticuerpo (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 RT.
- viii) Se lavan las rejillas (6 × 3 minutos) en tampón de incubación.
- ix) Se incuban con 10 nm de proteína-oro (para la dilución, consúltese la recomendación de los proveedores) durante 1 hora, a RT.
- x) Se lava (6 × 3 minutos).
- xi) Se fija con glutaraldehído al 2,5% (5 minutos).
- xii) Se lava con agua destilada (3 × 3 minutos) y se tiñe con ácido fosfotúngstico al 2% (pH 6,8) durante 1 minuto.

Interpretación de los resultados

La inclusión de NP40 permitirá que penetren anticuerpos y proteína A-oro en la membrana externa y que reaccionen con la cápsida subyacente. El marcado debe ser específico del virus. Debe incluirse un suero de conejo purificado por afinidad sin VNHE (1/500) como control negativo.

4.3.1.2.2.4. Inmunohistoquímica (tinción por inmunoperoxidasa)

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

Procedimiento técnico

El objetivo del siguiente protocolo es la demostración cualitativa de antígenos de ranavirus en cortes de tejido fijados en formalina e incluidos en parafina (He *et al.*, 2002). Se considera que los antígenos pueden haber adquirido la capacidad de reaccionar de forma cruzada, y por tanto se incluye un paso de digestión con proteasa que puede omitirse si se examinan muestras no 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 a modo de anticuerpos de unión. También se utilizan otros reactivos comerciales, que también suministra DAKO². El anticuerpo primario de conejo anti-VNHE purificado por afinidad (Lote nº M708) lo suministra liofilizado el Laboratorio de Referencia.

- 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 hace una marca alrededor del corte con un lápiz de diamante para reducir la diseminación de los reactivos.

2 Dako Cytomation California Inc., 6392 via Real, Carpinteria, CA 93013, EE.UU., 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; Visítese la página www.dakocytomation.com para enlaces a otros países.

- ii) Se desparafina el corte:
Se pre-calientan los portas en una incubadora a 60°C 30 minutos.
Se colocan los portas en un baño de xileno y se incuban 5 minutos. Se repite una vez. Obsérvese que pueden realizarse sustituciones del xileno sin efectos perjudiciales.
Se elimina el exceso de líquido y se sumergen los portas en etanol absoluto 3 minutos. Se repite una vez.
Se elimina el exceso de líquido y se sumergen los portas en etanol al 95% 3 minutos. Se repite una vez.
Se elimina el exceso de líquido y se sumergen los portas en agua destilada o agua desionizada 30 segundos.
- iii) Se exponen antígenos utilizando un tratamiento con proteasa. Se inunda el porta con proteinasa K (5–7 µg ml⁻¹) y se incuba 20 minutos (solución lista para usar, DakoCytomation Cat. No. S3020). Se enjuaga 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 aplica con cuidado papel absorbente alrededor del corte.
- iv) Se lleva a cabo la reacción de inmunotinción utilizando el Universal DAKO LSAB[®]+ Kit, Peroxidase (DakoCytomation Cat No. K0679). Asegurándose de que el corte de tejido se ha recuperado por completo, se añaden los siguientes reactivos al porta. Se evita que se sequen por completo.
- v) Peróxido de hidrógeno al 3%: se cubre el corte y se incuba 5 minutos. Se enjuaga con cuidado con PBST y se coloca en un baño limpio de lavado.
- vi) Anticuerpo primario (anticuerpo de conejo anti-VNHE purificado por afinidad 1:/1500 Lote N° M708) y reactivo control negativo (suero de conejo no inmune a una dilución de 1/1500) en un segundo porta. Se cubre el corte y se incuba 15 minutos. Se enjuagan los portas.
- vii) Unión: se cubre el corte y se incuba 15 minutos. Se enjuagan los portas.
- viii) Estreptavidina peroxidasa: se cubre el corte y se incuba 15 minutos. Se enjuagan los portas.
- ix) Solución de sustrato-cromógeno: se cubre el corte y se incuba 5 minutos. Se enjuagan los portas con cuidado con agua destilada.
- x) Se aplica tinción de contraste colocando los portas en un baño de hematoxilina de Mayer de DAKO[®] durante 1 (modificación de Lillie, Cat. N° S3309). Se lava con cuidado con agua destilada. Se sumerge 10 veces en un baño de agua. Se coloca en agua destilada o desionizada durante 2 minutos.
- xi) Se montan muestras y se cubren con cubreobjetos con un medio de montaje de base acuosa (medio de montaje acuoso de DAKO[®] Faramount Cat. N° S3025).

Interpretación de los resultados

El antígeno de ranavirus se tiñe de marrón en las zonas que circundan las partes parenquimatosas degeneradas y necróticas. No debe haber tinción con el suero control negativo de conejo en el mismo corte.

Acceso a pruebas y reactivos: se pueden obtener reactivos de anticuerpos y protocolos analíticos en el Laboratorio de Referencia de la OIE.

4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

Se puede llevar a cabo la identificación de ranavirus a nivel de género y de especie mediante dos PCR dirigidas al gen de la MCP. En la primera, se utilizan dos PCR con cebadores de MCP con análisis de restricción para detectar y diferenciar rápidamente los ranavirus de peces (VNHE, VBE (virus del bagre europeo)) de los ranavirus de anfibios (VR3, IVB) (Harp y Petranka, 2006). Esto se puede llevar a cabo en menos de 24 horas a un coste relativamente bajo. En el segundo método, se utiliza una PCR dirigida a la MCP para generar un producto de 580 pb, que a continuación se secuencian para identificar el tipo de ranavirus (consúltese el capítulo 2.3.1. Necrosis hematopoyética epizoótica).

Muestras: Virus tomado de cultivo celular o análisis directo de homogenado tisular.

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

El producto MCP-1 amplificado mediante PCR y digerido con PflM I permite diferenciar entre iridovirus australianos (VNHE e IVB) e iridovirus no australianos (VR3, de América; y VBE, de Europa). El producto MCP-2 amplificado mediante PCR y digerido con Hinc II, Acc I y Fnu4H I (individualmente) permite diferenciar entre el VNHE y el IVB (Australia) entre ellos, así como entre el VR3 (América) y el VBE (Europa).

Preparación de los reactivos

El Laboratorio de Referencia suministra reactivos control liofilizados de ADN purificado de VNHE y de ADN purificado de IVB para la PCR. Se reconstituyen con 0,5 ml de tampón Tris-EDTA (TE) (Tris/HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) y se deja el vial en reposo a RT 2 minutos. Se mezcla el vial con mucho cuidado. Para el uso sistemático, como control de la PCR, se recomienda preparar las soluciones de trabajo a modo de una dilución a 1/10 en tapón TE (pH 8,0). Deben guardarse alícuotas de 250 µl a -20°C. Cada alícuota es suficiente durante al menos 50 reacciones (se añaden 1 a 5 µl al cóctel) y tiene un periodo de validez mínimo de 6 meses desde la fecha en que se diluye.

Los cebadores M151 y M152 (MCP-1, 321 pb), M153 y M154 (MCP-2, 625 pb) se suministran a la concentración de trabajo y deben guardarse a -20°C. También pueden encargarse cebadores a proveedores comerciales. Para saber cuáles son las secuencias de los cebadores, consúltese la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Secuencias de los cebadores MCP-1 y MCP-2

PCR	Cebador	Secuencia	Tamaño del producto	Ubicación 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		

Cóctel para la PCR

Las reacciones de amplificación en un volumen final de 50 µl (incluidos 5 µl de la muestra de ADN) contienen 2,5 µl de cada cebador de trabajo, los nucleótidos dATP, dTTP, dGTP y dCTP, cada uno a una concentración 200 mM, tampón para PCR 10× (Tris/HCl 66,6 mM, (NH₄)₂SO₄ 16,6 mM, MgCl₂ 2,5 mM, BSA a 1,65 mg ml⁻¹, beta-mercaptoetanol 10 mM) y 2 U de polimerasa Taq. En la Tabla 4.2 se indican las instrucciones para la preparación del tampón para PCR 10x.

Tabla 4.2. 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 bovina 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 tampones comerciales alternativos.

Se incluyen dos controles negativos, uno que lleva el cóctel para la PCR y el segundo que lleva 5 µl de tampón TE.

Las reacciones para la obtención de MCP-1 y de 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 a 4°C.

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

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

Análisis mediante nucleasa de restricción (REA)

Se someten amplicones de PCR a REA con las enzimas descritas en la Tabla 4.3. Todas las endonucleasas deben utilizarse según las instrucciones del fabricante. Se preparan reacciones de REA añadiendo 1-4 µl del producto de la PCR, 2 U de la endonucleasa de restricción apropiada, 1,6 µl de tampón (suministrado con cada endonucleasa de restricción), 1,6 µl de solución de BSA de 100 µg ml⁻¹ (en el caso de PflM I e Hinc II) y se completa hasta un volumen final de 16 µl con agua purificada estéril. Se incuban los digestos de restricción 2-4 horas a las temperaturas recomendadas y se evalúan mediante electroforesis en gel de agarosa en geles al 3%. En la Tabla 4.4 se indican los tamaños de banda previstos tras la restricción.

Tabla 4.3. Análisis mediante endonucleasa de restricción de amplicones de MCP de ranavirus

PCR	Enzima de restricción	Tamaños de banda previstos tras la restricción (pb)	Patrón aplicable a
MCP-1 (321bp)	<i>PflM I</i>	321	VNHE, IVB
		131, 190	VR3, IVW
MCP-2 (625bp)	<i>Hinc II</i>	100, 138, 387	VNHE
		100, 525	IVB, VR3
		100, 240, 285	IVW
	<i>Acc I</i>	238, 387	VNHE
		625	IVB, VSE, VBE, IVW
		164, 461	VR3, VG
<i>Fnu4H I</i>	33, 38, 44, 239, 271	VNHE	
	3, 33, 38, 44, 108, 399	IVB	
	3, 38, 44, 108, 432	VR3, VG	
	3, 9, 38, 44, 108, 151, 272	VSE, VBE	
	3, 44, 71, 108, 399	IVW	

VG: Virus Gutapo (Hyatt *et al.*, 2000).

Se distribuye en alícuotas de 500 µl y se guarda a -20°C. Para obtener una solución de trabajo, se añaden 3,5 µl de beta-mercaptoetanol por cada 500 µl de tampón 10x. Tras preparar el cóctel para la PCR, el tampón sobrante debe desecharse.

Se está evaluando cuál es la sensibilidad de la PCR en las aplicaciones diagnósticas a tejidos de pescado.

Los protocolos detallados de la prueba completa, hojas de trabajo y ADN control de VNHE pueden conseguirse en el Laboratorio de Referencia de la OIE.

4.3.1.2.3.2. PCR alternativa y secuenciación para la identificación del virus

En esta prueba se utilizan dos cebadores, un cebador directo (5'-AAA-GAC-CCG-TTT-TGC-AGC-AAA-C-3') y un cebador inverso (5'-CGC-AGT-CAA-GGC-CTT-GAT-GT-3'), para la amplificación de la secuencia diana de la MCP (580 pares de bases [pb]) del ADN del VNHE mediante PCR. Esta PCR se puede utilizar para la detección específica de ranavirus de percas, truchas arcoiris, siluros, bagres, *Poecilia reticulata*, navajón cirujano (*Labroides dimidiatus*) y de varios ranavirus de los anfibios (Eaton *et al.*, 1991). Se añade ácido nucleico (1 µl) a tampón polimerasa Taq que contenga cada cebador a una concentración 0,1 µM, 2,5 U de polimerasa Taq (Promega) y MgCl₂ 2,5 mM. La mezcla se incubaba en un ciclador térmico automático programado para 35 ciclos a 95°C

durante 60 segundos, 55°C durante 60 segundos y 72°C durante 60 segundos, y finalmente se mantiene a 72°C durante 15 minutos. Se analiza ADN amplificado (580 pb) mediante electroforesis en gel de agarosa, se extrae y se secuencía utilizando varios métodos estándar). Cada especie vírica se identifica por su secuencia de ADN específica, que puede consultarse en el GenBank. Pueden enviarse muestras al Laboratorio de Referencia de la OIE para llevar a cabo una identificación específica.

4.3.1.2.4. Purificación del agente

Se ha descrito la purificación del VNHE (Drury *et al.*, 1995; Hyatt *et al.*, 2000) y el Laboratorio de Referencia dispone del protocolo.

4.3.2. Métodos serológicos

No se han detectado anticuerpos neutralizantes en peces ni mamíferos expuestos a ranavirus. Se ha descrito un ELISA indirecto para la detección de anticuerpos inducidos tras la exposición de *Bufo marinus* a ranavirus. En el Laboratorio de Referencia se dispone de los protocolos y los reactivos de anti-inmunoglobulina específicos necesarios para llevar a cabo estas pruebas.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

Los métodos actualmente disponibles para la vigilancia, la detección y el diagnóstico de ranavirus 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; y NA = no es 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 dirigida y diagnóstico

Método	Vigilancia dirigida				Diagnóstico preliminar	Diagnóstico confirmativo
	Huevos/esperma	Renacuajos	Metamorfos	Adultos		
Anatomopatología macroscópica	na	d	d	d	d	d
Histopatología	na	d	d	d	b	d
Tinción por inmunoperoxidasa	na	c	c	c	b	b
ME de transmisión	na	d	d	d	c	c
Microscopía inmunoelectrónica	na	d	d	d	c	c
Cultivo celular	na	a	a	a	a	a
ELISA de captura de antígeno	na	a	a	a	b	b
ELISA de captura de anticuerpo	na	d	d	c	c	d
PCR-REA	na	d	a	d	c	a
Análisis de la secuencia del producto de la PCR	na	d	d	d	c	a

ME = microscopía electrónica; ELISA = enzimoimmunoanálisis; PCR = reacción en cadena de la polimerasa; REA: análisis por endonucleasa de restricción; na: no es aplicable

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

Deben utilizarse prácticas de obtención de muestras estadísticamente válidas, pero actualmente no pueden definirse para los anfibios.

Deben obtenerse los órganos/muestras correctos.

Debe aplicarse las pruebas estandarizadas de sensibilidad y especificidad especificadas. Esto restringe las pruebas de certificación al cultivo celular, que es la prueba de referencia.

En estudios en los que se pretende identificar poblaciones de anfibios infectadas también podría intervenir de forma útil la serología. Se precisan más estudios para confirmar la validez de esta propuesta.

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

Anfibios aparentemente sanos, moribundos o muertos cuya piel y/o tejidos parenquimatosos contengan indicios histológicos de necrosis por licuefacción o coagulación multifocal o localmente extensa con o sin cuerpos de inclusión basófilos intracitoplasmáticos.

7.2. Definición de caso confirmado

Anfibios aparentemente sanos, moribundos o muertos cuya piel y/o tejidos parenquimatosos contengan indicios histológicos de necrosis por licuefacción o coagulación multifocal o localmente extensa con o sin cuerpos de inclusión basófilos intracitoplasmáticos y/o en los cuales se haya observado la presencia de ranavirus por los siguientes medios:

1. ECF característico en el cultivo celular y cultivo celular positivo para ranavirus en la prueba de la inmunoperoxidasa o el ELISA de captura de antígeno o la PCR,
 - o
2. Tejidos positivos en el ELISA de captura de antígeno o en la tinción por inmunoperoxidasa o en la microscopía inmunoelectrónica o en la PCR
 - Y tanto en 1 como en 2, cuando se utilice PCR
3. Observación de una secuencia compatible con ranavirus mediante REA o secuenciación del producto de la PCR.

8. Bibliografía

- ARIEL E., KIELGAST J., SVART H.E., LARSEN K., TAPIOVAARA H., JENSEN B.B. & HOLOPAINEN R. (2009). Ranavirus in wild edible frogs (*Pelophylax kl. esculentus*) in Denmark. *Dis. Aquat. Org.*, **85**, 7–14.
- BOLLINGER T.K.M., SCHOCK J., BRIGHAM D. & GREGORY R.M. (1999). Pathology, isolation, and preliminary molecular characterization of a novel iridovirus from tiger salamanders in Saskatchewan. *J. Wildl. Dis.*, **35**, 413–429.
- BRUNNER J., SCHOCK D., DAVIDSON E. & COLLINS J. (2004). Intraspecific reservoirs: complex life history and the persistence of a lethal ranavirus. *Ecology*, **85**, 560–566.
- BRUNNER J.L., SCHOCK D.M. & COLLIN J.P. (2007). Transmission dynamics of the amphibian ranavirus *Ambystoma tigrinum* virus. *Dis. Aquat. Org.*, **77**, 87–95.
- BRYAN L.K., BALDWIN C.A., GRAY M.J. & MILLER D.L. (2009). Efficacy of select disinfectants at inactivating Ranavirus. *Dis. Aquat. Org.*, **84**, 89–94.
- CAREY C., BRADFORD D.F., BRUNNER J.L., COLLINS J.P., DAVIDSON E.W., LONGCORE J.E., OUELLET M., PESSIER A.P. & SCHOCK D.M. (2003a). Biotic factors in amphibian population declines. Multiple stressors and declining amphibian populations Linder G., Sparling D.W. & Krest S.K., eds. Society for Environmental Chemistry and Toxicology Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) Press, Pensacola, Florida, USA.

- CAREY C., PESSIER A.P., & PEACE A.D. (2003b). Pathogens, infectious disease, and immune defenses. *In: Semlitsch R.D., ed. Amphibian conservation. Smithsonian Institute, Washington, DC, USA, 127–136.*
- CHINCHAR V.G. (2002). Ranaviruses (family Iridoviridae): emerging cold-blooded killers – brief review. *Arch. Virol., 147, 447–470.*
- CHINCHAR G., ESSBAUER S., HE J.G., HYATT A., MIYAZAKI T., SELIGY V. & WILLIAMS T. (2005). Family Iridoviridae. *In: Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature 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.*
- CRANE M.S.J., YOUNG J. & WILLIAMS L. (2005). Epizootic haematopoietic necrosis virus (VNHE): growth in fish cell lines at different temperatures. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol., 25, 228–231.*
- CULLEN B.R. & OWENS L. (2002). Experimental challenge and clinical cases of Iridovirus Bohle (IVB) in native Australian anurans. *Dis. Aquat. Org., 49, 83–92.*
- CUNNINGHAM A.A., HYATT A.D., RUSSELL P. & BENNETT P.M. (2007). Emerging epidemic diseases of frogs in Britain are dependent on the source of ranavirus agent and the route of exposure. *Epidemiol. Infect., 135, 1200–1212.*
- CUNNINGHAM A.A., LANGTON T.E.S., BENNETT P.M., LEWIN J.F., DRURY S.E.N., GOUGH R.E. & MACGREGOR S.K. (1996). Pathological and microbiological findings from incidents of unusual mortality of the common frog (*Rana temporaria*). *Phil. Trans. R. Soc. B, 351, 1539–1557.*
- CUNNINGHAM A.A., TEMS C.A. & RUSSELL P.H. (2008). Immunohistochemical demonstration of Ranavirus antigen in the tissues of infected frogs (*Rana temporaria*) with systemic haemorrhagic or cutaneous ulcerative disease. *J. Comp. Pathol., 138 (1), 3–11.*
- DASZAK P., CUNNINGHAM A.A. & HYATT A.D. (2003). Infectious disease and amphibian population declines. *Divers Distrib., 9, 141–150.*
- DOCHERTY D.E., METEYER C.U., WANG J., MAO J., CASE S.T. & CHINCHAR V.G. (2003). Diagnostic and molecular evaluation of three iridovirus-associated salamander mortality events. *J. Wildl. Dis., 39, 556–566.*
- DRURY S.E.N., GOUGH R.E. & CUNNINGHAM A.A. (1995). Isolation of an iridovirus-like agent from common frogs (*Rana temporaria*). *Vet. Rec., 137, 72–73.*
- 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., VALPOTIC I. & ZWILLENBERG L.O. (1991). Isolation of an iridovirus-like agent from the green frog (*Rana esculenta* L.). *Veterinarski Arhiv, 61, 151–158.*
- FIJAN N., SULIMANOVIC D., BEARZOTTI M., MUZINIC D., ZWILLENBERG L., CHILMONCZYK S., VAUTHEROT J. & DE KINKELIN P. (1983). Some properties of the epithelioma papulosum cyprini (EPC) cell line from carp (*Cyprinus carpio*). *Ann. Virol. Institut Pasteur, 134E.*
- FOX S.F., GREER A.L., TORRES-CERVANTES R. & COLLINS J.P. (2006). First case of ranavirus-associated morbidity and mortality in natural populations of the South American frog *Atelognathus patagonicus*. *Dis. Aquat. Org., 72, 87–92.*
- GREEN D.E., CONVERSE K.A. & SCHRADER A.K. (2002). Epizootiology of sixty-four amphibian morbidity and mortality events in the USA, 1996–2001. *Ann. N.Y. Acad. Sci., 969, 323–339.*
- GREER A.L., BRIGGS C.J. & COLLINS J.P. (2008). Testing a key assumption of host-pathogen theory: density and disease transmission. *Oikos, 117, 1667–1673.*
- GREER A.L. & COLLINS J.P. (2008). Habitat fragmentation as a result of biotic and abiotic factors controls pathogen transmission throughout a host population *J. Anim. Ecol., 77, 364–369.*
- GRAY M.J., MILLER D.L. & HOVERMAN J.T. (2009). Ecology and pathology of amphibian ranaviruses. *Dis. Aquat. Org., 87 (3), 243–266.*

- HARP E.M. & PETRANKA J.W. (2006). Ranavirus in wood frogs (*Rana sylvatica*): potential sources of transmission within and between ponds. *J. Wildl. Dis.*, **42**, 307–318.
- HENGSTBERGER S.G., HYATT A.D., SPEARE R. & COUPAR B.E.H. (1993). Comparison of epizootic haematopoietic necrosis and Iridovirus Bohlees, recently isolated Australian iridoviruses. *Dis. Aquat. Org.*, **15**, 93–107.
- HE J.G., LU L., DENG M., HE H.H., WENG S.P., WANG X.H., ZHOU S.Y., LONG Q.X., WANG X.Z. & CHAN S.M. (2002). Sequence analysis of the complete genome of an iridovirus isolated from the tiger frog. *Virology*, **292**, 185–197.
- 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., PARKES H. & ZUPANOVIC Z. (1998). Identification, characterisation and assessment of Venezuelan viruses for potential use as biological control agents against the cane toad (*Bufo marinus*) in Australia. Available at <http://www.environment.gov.au/biodiversity/invasive/publications/cane-toad-maintenance/index.html>
- HYATT A.D., GOULD A.R., ZUPANOVIC Z., CUNNINGHAM A.A., HENGSTBERGER S., WHITTINGTON R.J., KATTENBELT J. & COUPAR B.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 (*Chondropython viridis*). *J. Wildl. Dis.*, **38**, 239–252.
- JANCOVICH J.K., DAVIDS E.W., SEILER A., JACOBS B.L. & COLLINS J.P. (2001) Transmission of the *Ambystoma tigrinum* virus to alternative hosts. *Dis. Aquat. Org.*, **46**, 159–163.
- JANCOVICH J.K., DAVIDSON E.W., MORADO J.F., JACOBS B.L. & COLLINS J.P. (1997). Isolation of a lethal virus from the endangered tiger salamander *Ambystoma tigrinum stebbinsi*. *Dis. Aquat. Org.*, **31**, 161–167.
- JANCOVICH J.K., MAO J.H., CHINCHAR V.G., WYATT C., CASE S.T., KUMAR S., VALENTE G., SUBRAMANIAN S., DAVIDSON E.W., COLLINS J.P. & JACOBS B.L. (2003.) Genomic sequence of a ranavirus (family Iridoviridae) associated with salamander mortalities in North America. *Virology*, **316**, 90–103.
- JANCOVICH J.K., DAVIDSON E.W., PARAMESWARAN N., MAO J., CHINCHAR V.G., COLLINS J.P., JACOBS B.L. & STORFER A. (2005). Evidence for emergence of an amphibian iridoviral disease because of human-enhanced spread. *Molecular Ecology*, **14**, 213–224.
- LANGDON J.S. (1989). Experimental transmission and pathogenicity of epizootic haematopoietic necrosis virus (VNHE) in redfin perch, *Perca fluviatilis* L., and 11 other teleosts. *J. Fish Dis.*, **12**, 295–310.
- 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.
- MARSCHANG R.E., BECHER P., POSTHAUS H., WILD P., THIEL H.-J., MULLER-DOBILES U., KALETA E.F. & BACCARINI L.N. (1999). Isolation and characterization of an iridovirus from Hermann's tortoises (*Testudo hermanni*). *Arch. Virol.*, **144**, 1909–1922.
- PICCO A.M., BRUNNER J.L. & COLLINS J.P. (2007). Susceptibility of the endangered california tiger salamander, *Ambystoma californiense*, to Ranavirus infection. *J. Wildl. Dis.*, **43** (2), 286–290.
- PICCO A.M. & COLLINS J.P. (2008). Amphibian commerce as a likely source of pathogen pollution. *Conservation Biology*, **22**, 1582–1589.
- PEARMAN P.B., GARNER T.W.J., STRAUB M. & GREBER U.F. (2004). Response of the Italian agile frog (*Rana latasteri*) to a Ranavirus, virus de la rana tipo 3: a model for viral emergence in naïve populations. *J. Wildl. Dis.*, **40**, 660–669.
- PLUMB J.A. & ZILBERG D. (1999). The lethal dose of largemouth bass virus in juvenile largemouth bass and the comparative susceptibility of striped bass. *J. Aquat. Anim. Health*, **11**, 246–252.

REDDACLIFF L.A. & WHITTINGTON R.J. (1996). Pathology of epizootic haematopoietic necrosis virus (VNHE) infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) and redfin perch (*Perca fluviatilis* L.). *J. Comp. Pathol.*, **115**, 103–115.

ROBERT J., MORALES H., BUCK W., COHEN N., MARR S. & GANTRESS J. (2005). Adaptive immunity and histopathology in virus de la rana tipo 3-infected *Xenopus*. *Virology*, **332**, 667–675.

ROJAS S, RICHARDS K, JANCOVICH J.K., DAVIDSON E.W. (2005). Influence of temperature on Ranavirus infection in larval salamanders *Ambystoma tigrinum*. *Dis. Aquat. Org.*, **63** (2–3), 95–100.

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

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

WHITTINGTON R.J., REDDAKLIFF L.A., MARSH I., KEARNS C., ZUPANOVIC Z. & CALLINAN R.B. (1999). Further observations on the epidemiology and spread of epizootic haematopoietic necrosis virus (VNHE) in farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in southeastern Australia and a recommended sampling strategy for surveillance. *Dis. Aquat. Org.*, **35**, 125–130.

WHITTINGTON R.J. & STEINER K.A. (1993). Epizootic haematopoietic necrosis virus (VNHE): 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 viscerotropic pathogen for anuran amphibians. *J. Infect. Dis.*, **118**, 253–262.

XIA L., CAO J., HUANG X. & QIN Q. (2009). Characterization of Singapore grouper iridovirus (SGIV) ORF086R, a putative homolog of ICP18 involved in cell growth control and virus replication. *Arch. Virol.*, **154** (9), 1409–1416.

ZHAN Q.Y., XIAO F., LI Z.Q., GUI J.F., MAO J. & CHINCHAR V.G. (2001) Characterization of an iridovirus from the cultured pig frog *Rana grylio* with lethal syndrome. *Dis. Aquat. Org.*, **48**, 27–36.

ZUPANOVIC Z., LOPEZ G., HYATT A.D., GREEN B., BARTRAN G., PARKES H., WHITTINGTON R.J., & SPEARE R. (1998a). Giant toads *Bufo marinus* in Australia and Venezuela have antibodies against 'ranaviruses'. *Dis. Aquat. Org.*, **32** (1), 1–8.

ZUPANOVIC Z., MUSSO C., LOPEZ G., LOURIERO C.L., HYATT A.D., HENGSTBERGER S. & ROBINSON A.J. (1998b). Isolation and characterisation of iridoviruses from the giant toad *Bufo marinus* in Venezuela. *Dis. Aquat. Org.*, **33**, 1–9.

*
* *

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