

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 y Bang 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.*, 1987), 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 sometidas a 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 infeccioso 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 $10^{2,2}$ DICT₅₀ (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 DICT₅₀ ml⁻¹ (Langdon *et al.*, 1988). Podrían existir diferencias 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 DICT₅₀ 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 enzimoimmunoanálisis (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 paracrystalinas) 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 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de estreptomycin y 4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 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 tubo.
- 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 centrifuga 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 $^{\circ}\text{C}$ (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 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de estreptomycin y 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 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 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de

estreptomycin 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 incubaba 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 granulosa 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 proteínas 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-hidroxiethyl-piperazina-N-2-etanosulfónico [HEPES] 10 mM, glutamina 2 mM, 100 IU de penicilina y 100 µg de estreptomycin) y se incuban durante toda la noche en una atmósfera con un 5% de CO₂ a 22°C. (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 de tejido triturado al 10% (por ejemplo, de hígado, riñón o bazo), se incuban 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 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 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 positiva: 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 ₂ HPO ₄	11,5 g
KCl	2,0 g
KH ₂ PO 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 Na₂HPO₄·2H₂O 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 10³–10⁴ DICT₅₀/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-benzotiazolona)-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 utilizar 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 $\pm 10\%$:

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 positivo-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 H₂O₂) (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:

$PCF = (OD \text{ media del control A} / OD \text{ real} + OD \text{ media del control B} / OD \text{ real} + OD \text{ media del control D} / OD \text{ real} + OD \text{ media del control F} / OD \text{ real}) / 4$. Se multiplica la OD media real de cada muestra por el PCF 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 ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O)	9,54 g
NaCl	4,38 g
Agua tratada con MQ, hasta	1 litro
Se esteriliza en autoclave	

Solución salina tamponada con fosfato 10x

NaCl	80,00 g
KCl	2,00 g
Na ₂ HPO ₄	11,50 g
KH ₂ PO 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 ₂ HPO 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 ₂ O ₂ por cada alícuota de 22-ml.	

Solución de ABTS de parada de la reacción (NaN₃ 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 #14-23-06¹

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 Spurr's 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 paracrystalinas.

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 N° 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 DAKO². El anticuerpo primario anti-VNHE de conejo purificado por afinidad (Lote N° 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 N° 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 las 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 secuenciará 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 *PfM 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 *Fnu4H 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, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 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)	<i>PfM I</i>	321	VNHE, IVB
		131, 190	VF3, WV
MCP-2 (625pb)	<i>Hinc II</i>	100, 138, 387	VNHE
		100, 525	IVB, VF3
		100, 240, 285	WV
	<i>Acc I</i>	238, 387	VNHE
		625	IVB, VSE, VB, WV
		164, 461	VF3, GV
	<i>Fnu4H I</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.*, 20007). 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 MgCl₂ 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/e sperma	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 = enzimoimmunoanálisis; PCR = reacción en cadena de la polimerasa; REA = análisis mediante endonucleasa de restricción; na = no aplicable.

6. Prueba(s) recomendada(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 positivo 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 microscopía 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 *Silurus glanis*. *J. Vet. Med. [B]*, **37**, 187–190.

AHNE W., SCHLOTFELDT H.J. & THOMSEN I. (1989). Fish viruses: isolation of an icosahedral cytoplasmic deoxyribovirus from sheatfish (*Silurus glanis*). *J. Vet. Med. [B]*, **36**, 333–336.

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

ARIEL E., NICOLAISEN 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 (*Stizostedion lucioperca*), Cod (*Gadus morhua*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) 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 *Scophthalmus maximus* fry in Denmark. *Dis. Aquat. Org.*, **15**, 235–240.

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.

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 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.

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.

DRURY S.E.N., GOUGH R.E. & CALVERT I. (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., VALPOTIC I. & ZWILLENBERG L.O. (1991). Isolation of an iridovirus-like agent from the green frog (*Rana esculenta* L.). *Veterinarski Arhiv*, **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., BERGMANN S.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. & 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.

LANGDON J.S. (1989). Experimental transmission and pathogenicity of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) in redfin perch, *Perca fluviatilis* 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 *Perca fluviatilis* 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, *Salmo gairdneri* 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, *Perca fluviatilis* 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 (*Ictalurus melas*). *Dis. Aquat. Org.*, **14**, 35–42.

REDDA CLIFF L.A. & WHITTINGTON R.J. (1996). Pathology of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) and redfin perch (*Perca fluviatilis* 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 *Limnodynastes ornatus* 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.

WHITTINGTON R.J., BECKER J.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 (*Perca fluviatilis*) in southern Australia. *Aust. Vet. J.*, **73**, 112–114.

WHITTINGTON R.J., PHILBEY A., REDDA CLIFF G.L. & MACGOWN A.R. (1994). Epidemiology of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) infection in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): findings based on virus isolation, antigen capture ELISA and serology. *J. Fish Dis.*, **17**, 205–218.

WHITTINGTON R.J. & REDDA CLIFF G.L. (1995). Influence of environmental temperature on experimental infection of redfin perch (*Perca fluviatilis*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with epizootic haematopoietic necrosis virus, an Australian iridovirus. *Aust. Vet. J.*, **72**, 421–424.

WHITTINGTON R.J., REDDA CLIFF L.A., MARSH L., 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 *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 (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 viscerotropic 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 *Bufo marinus* 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.