

HERPESVIROSIS DE LA CARPA KOI

1. **Ámbito de aplicación**

La herpesvirosis de la carpa koi (HCK) es una infección por un herpesvirus (Hedrick *et al.*, 2000) capaz de inducir una viremia contagiosa y aguda en la carpa común (*Cyprinus carpio*) y en variedades como la carpa koi o la carpa goi (Haenen *et al.*, 2004).

2. **Información sobre la enfermedad**

2.1. **Factores del agente**

2.1.1. **El agente patógeno, cepas del agente**

El agente patógeno es el herpesvirus de la carpa koi (HVK) de la familia Alloherpesviridae (Haramoto *et al.*, 2007; Waltzek *et al.*, 2009), aunque antes de la clasificación taxonómica, también se denominaba virus de la nefritis intersticial y la necrosis de las branquias de la carpa (Ilouze *et al.*, 2010). Waltzek *et al.* (2005) proporcionaron indicios que respaldaron la clasificación de este virus como un herpesvirus, y lo denominaron herpesvirus de los ciprínidos tipo 3 (HVCy-3), siguiendo la nomenclatura de otros herpesvirus de ciprínidos: HVCy-1 (virus de la viruela de la carpa, virus del papiloma de los peces) y HVCy-2 (virus de la necrosis hematopoyética del pez rojo). El análisis de la secuencia de una parte del genoma ha puesto de manifiesto que el HVK está estrechamente relacionado con el HVCy-1 y el HVCy-2, y lejanamente relacionado con el virus del bagre de canal (herpesvirus de los ictalúridos tipo 1: ICHV-1) y herpesvirus de los ránidos tipo 1 (ranas) (RaHV-1) (Waltzek *et al.*, 2005). Aoki *et al.* (2007) han descrito la secuencia del genoma completo del HVK y han identificado 156 genes que codifican proteínas únicas. Sugirieron que el hallazgo de que los 15 genes del HVK son homólogos con genes del ICHV-1 confirma la propuesta de clasificar al HVK en la familia Herpesviridae. En los viriones maduros hay cuarenta proteínas víricas y 18 proteínas celulares (Michel *et al.*, 2010). Recientemente, el HVCy-3 se ha designado la especie tipo del nuevo género *Cyprinivirus* dentro de la familia Alloherpesviridae, que también contiene HVCy-1 y HVCy-2. Las primeras estimaciones del tamaño del genoma del HVK oscilaban entre al menos 150 kpb y 277 kpb, pero ahora se ha confirmado que tiene un tamaño de 295 kpb. Se ha observado que el tamaño de las nucleocápsidas del virus es de 100-110 nm de diámetro y están envueltos por una envoltura (Ilouze *et al.*, 2010).

Las comparaciones de los genomas de las cepas del HVK de distintas zonas geográficas mediante análisis por enzima de restricción (Haenen *et al.*, 2004) o análisis de la secuencia de nucleótidos (Sano *et al.*, 2004) han mostrado que son prácticamente idénticos. De igual forma, los polipéptidos de cepas del HVK de distintas zonas geográficas eran similares, aunque una cepa de Israel tenía dos polipéptidos adicionales (Gilad *et al.*, 2003). Aoki *et al.* (2007) compararon las secuencias del genoma completo de tres cepas del HVK aisladas de Japón, Israel y EE.UU. Se observó que los genomas eran muy similares entre ellos a nivel de secuencia (>99%), estando las cepas de Israel y de EE.UU. más estrechamente relacionadas entre ellas que ninguna de las dos con la de Japón. Las tres cepas se interpretaron como originadas a modo de dos linajes (J y U/I) a partir de una cepa progenitora tipo salvaje. No obstante, estudios posteriores realizados en Japón sugieren que los linajes no tienen relación genética directa y que llegaron por vías independientes a esas zonas y causaron epidemias del HVK (Revisado por Ilouze *et al.* 2010). Un estudio más reciente realizado en Francia ha identificado un tercer intermediario entre los linajes J y U/I y ha sugerido que los tres linajes del HVCy-3 se introdujeron en Europa el año 2001 mediante carpas koi importadas (Bigarré *et al.*, 2009). Más recientemente, se ha descubierto otro linaje intermediario que podría haber emergido en Indonesia (Sunarto *et al.*, 2011).

2.1.2. **Supervivencia fuera del hospedador**

Estudios llevados a cabo en Israel han mostrado que el HVK sigue activo en agua durante al menos 4 horas, pero durante 21 horas, a temperaturas del agua de 23-25°C (Perelberg *et al.*, 2003). Estudios realizados en Japón han mostrado una significativa reducción del título infectivo del HVK en un plazo de 3 días en muestras de agua o sedimento del ambiente a 15°C. No obstante, la infectividad se mantuvo más de 7 días cuando el HVK se expuso a muestras de agua similares que habían sido esterilizadas mediante autoclave o filtración (Shimizu *et al.*, 2006). El estudio también presentó indicios de la presencia de cepas bacterianas en el agua con actividad antivírica. Más recientemente, se ha detectado ADN de HVK en muestras de agua de río a temperaturas de 9-11°C, 4 meses antes de un brote de HCK en un río

(Haramoto *et al.*, 2007). No obstante, la persistencia del virus podría haber contribuido a la presencia de vectores vivos y la detección del ADN puede no siempre ser indicativa de la presencia de virus infeccioso.

2.1.3. Estabilidad del agente

El virus se inactiva por radiación UV y temperaturas superiores a los 50°C durante 1 minuto. Los siguientes desinfectantes también son eficaces para la inactivación: yodóforo a 200 mg/litro durante 20 minutos, cloruro de benzalconio a 60 mg/litro durante 20 minutos, alcohol etílico al 30% durante 20 minutos e hipoclorito de sodio a 200 mg/litro durante 30 segundos, todos ellos a 15°C (Kasai *et al.*, 2005).

2.1.4. Ciclo de vida

En informes anteriores, los investigadores han sugerido que las branquias constituyen la principal puerta de entrada del virus en la carpa (Dishon *et al.*, 2005; Gilad *et al.*, 2004; Pikarsky *et al.*, 2004). Sin embargo, un estudio experimental más reciente ha puesto de manifiesto que la piel que recubre las aletas y el cuerpo de la carpa es la principal vía de entrada del HVK (Costes *et al.*, 2009). A continuación, se produce una diseminación sistémica del virus desde la piel y las branquias a los órganos internos y se han detectado altos niveles de ADN del HVK en el tejido de riñón, bazo, hígado e intestino (Dishon *et al.*, 2005; Pikarsky *et al.*, 2004). Se ha descrito que la estructuración y morfogénesis del HVK en las células infectadas son iguales a las de otros herpesvirus. Un examen de la ultraestructura de carpas infectadas experimentalmente ha proporcionado indicios de que cápsidas inmaduras y nucleocápsidas maduras se estructuran en el núcleo y que el virión madura a continuación en el citoplasma de las células infectadas. Es muy evidente una hipersecreción de mucus en las primeras fases de infección por el HVK y se han detectado altos niveles de ADN del HVK en muestras de mucus tomadas de carpas infectadas experimentalmente (Gilad *et al.*, 2004). Este es un indicio más de la intervención activa de la piel en la patogenia vírica y de que constituye un importante lugar de excreción de virus. La excreción de virus por la orina y las heces también podría ser un importante mecanismo de excreción de virus. Se han detectado altos niveles de ADN del HVK en tejido intestinal y renal, y se ha detectado virus infeccioso en heces de carpas infectadas (Dishon *et al.*, 2005; Gilad *et al.*, 2004).

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Solo se han registrado infecciones por el HVK de forma natural en la carpa común (*Cyprinus carpio*) y variedades de esta especie (por ejemplo, la carpa koi). Se ha observado que híbridos de pez rojo x carpa común, obtenidos por hibridación de machos de pez rojo x hembras de carpa común, presentan cierta susceptibilidad a la infección por el HVK. Aunque la mortalidad fue baja (del 5%), alrededor de un 50% de estos híbridos examinados 25 días después de la inyección intraperitoneal de una dosis alta de HVK poseían ADN genómico vírico, que se detectó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Hedrick *et al.*, 2006). En un estudio más reciente, la infección mediante inmersión en baño con distintas cepas del HVK causó una mortalidad del 35-42% en híbridos de pez rojo x carpa koi y de un 91-100% en un cruce de carpa cruciana x carpa koi. Los signos clínicos más destacados fueron úlceras cutáneas, producción excesiva de mucus y hemorragias en las aletas, y los signos más extensos se observaron en los híbridos de carpa cruciana x carpa koi. Se detectó ADN vírico en todos los casos de mortalidad de híbridos mediante PCR (Bergmann *et al.*, 2010).

Estudios recientes aportan cada vez más pruebas que indican que el pez rojo (*Carassius auratus*) es susceptible a la infección por el HVK. El transcrito de ARN del gen de la timidina kinasa vírica se ha detectado en branquias, encéfalo e intestino de pez rojo expuesto al HVK por cohabitación con carpas koi infectadas. A continuación, se observó que peces rojos de la misma población transmitían el HVK a carpas comunes nunca antes expuestas al virus al utilizar la fluctuación de las temperaturas del agua como factor estresante (El-Matbouli y Soliman, 2010). Bergmann *et al.* (2010a) también han observado la replicación del HVK en pez rojo tras la infección experimental por inmersión. Mediante PCR se detectó ADN de HVK en leucocitos extraídos de muestras de sangre de pez rojo (a los 45 días post-infección), así como por inmunofluorescencia indirecta (a los 60 días post-infección).

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

Todos los grupos de edad de los peces, desde los juveniles en adelante, parecen ser susceptibles a la HCK (Bretzinger *et al.*, 1999; Sano *et al.*, 2004) pero, en condiciones experimentales, peces de entre 2,5 y 6 gramos fueron más susceptibles que peces de 230 g (Perelberg *et al.*, 2003). Las larvas de carpa son resistentes a la infección por el HVK, pero las mismas carpas fueron susceptibles a la infección al llegar a la edad adulta (Ito *et al.*, 2007).

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

La carpa común o variedades de la misma, como la carpa koi o la carpa goi (koi x común) son más susceptibles y son las de elección para la detección del virus, seguidas de cualquier híbrido de carpa común que se encuentre en el lugar, como los de pez rojo x carpa común o los de carpa cruciana x carpa común.

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

Las branquias, el riñón y el bazo son los órganos en los que el HVK es más abundante durante el curso de una infección manifiesta (Gilad *et al.*, 2004).

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

Existen indicios que apuntan a que los supervivientes a la HCK quedan infectados con el virus de manera persistente y que pueden retener el virus durante largos periodos de tiempo. Se ha observado que el virus persisten en carpas comunes infectadas experimentalmente a una temperatura permisiva y mantenidas a continuación a una temperatura inferior a la permisiva (St-Hilaire *et al.*, 2005). Más recientemente, se han presentado indicios de persistencia del HVK en la carpa común en un estudio en el que se ha determinado la distribución del virus en una población salvaje de carpa común. Investigadores japoneses llevaron a cabo en 2006 un estudio, mediante PCR y serología, del HVK en el lago Biwa en 2006 (Uchii *et al.*, 2009), donde se habían notificado brotes episódicos de HCK en los 2 años posteriores a un brote importante que había tenido lugar en el 2004. Análisis posteriores de la población superviviente mostraron que el 54% de las carpas más viejas eran seropositivas y que un 31% eran positivas según la PCR. El mantenimiento de altos niveles de anticuerpos contra el virus sugiere que podría estar reactivándose virus latente periódicamente, reforzando la respuesta inmunitaria.

2.2.6. Vectores

El agua es el principal vector abiótico. Sin embargo, en la transmisión también pueden intervenir vectores vivos (como otras especies de peces, invertebrados parásitos y aves y mamíferos piscívoros) y fómites.

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

Existen indicios que apuntan a que otras especies de peces y ciertos invertebrados acuáticos son posibles vectores del HVK. Se ha detectado el ADN vírico en tejidos de pez rojo sano tras la cohabitación con carpa koi infectada experimentalmente con el HVK y también en pez rojo expuesto durante epizootias naturales del HVK en carpa koi (Ilouze *et al.*, 2010). En estudios realizados en Alemania, se ha detectado HVK mediante PCR anidada en distintas variedades de pez rojo (rojo, cabeza de león y shubunkin) así como en carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*), cacho (*Leuciscus idus*) y bagre ornamental (*Ancistrus sp.*) (Bergmann *et al.*, 2009). La detección en el pez rojo y en la carpa herbívora se confirmó mediante hibridación *in-situ* utilizando distintos cebadores de los utilizados en la PCR. Además, en un estudio reciente realizado en Polonia, se detectó HVK mediante PCR en esturión ruso (*Acipenser gueldenstaedtii*) y en esturión del Atlántico (*A. oxyrinchus*) de piscifactorías de peces del norte de Polonia (Kempter *et al.*, 2009). Todas las muestras de esturiones se tomaron de piscifactorías en las que se criaba carpa común con antecedentes de brotes de HCK. La presencia, en branquias y tejido renal de esturiones, de proteína y genoma vírico del HVK se confirmaron mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta y la de hibridación *in-situ*, respectivamente.

También hay cada vez más indicios que apuntan a que invertebrados acuáticos podrían ser vectores del HVK. En estudios realizados en Japón se ha descrito la detección de ADN del HVK en muestras de plancton y en concreto en especies rotíferos (Minamoto *et al.*, 2010). Las muestras de plancton se obtuvieron en 2008 de Iba-naiko, una laguna poco profunda conectada con el lago Biwa, que es una zona que favorece el desove de las carpas. Análisis estadísticos pusieron de manifiesto una correlación positiva significativa entre el HVK del plancton y los números de rotíferos, y los autores sugirieron que el HVK se vincula al comportamiento de filtro alimentador de las especies rotíferas y/o se concentra debido a este comportamiento. En un informe anterior de un pequeño estudio realizado en Polonia, se detectó HVK en anodontes (*Anodonta cygnea*) y gambas de agua dulce (*Gammarus pulex*) (Kielpinski *et al.*, 2010). Los invertebrados se obtuvieron de estanques del sur de Polonia que habían sufrido brotes de HCK en sus poblaciones de carpa común a lo largo de 5 o 6 años. Se precisan otros estudios para determinar durante cuánto tiempo persiste el virus infeccioso en los invertebrados en ausencia de la especie hospedadora y también si el virus sigue se mantiene viable.

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mecanismos de transmisión

El mecanismo de transmisión del HVK es horizontal, pero actualmente no se puede descartar la transmisión “asociada a huevos” (que normalmente se denomina transmisión “vertical”). La transmisión horizontal puede ser directa (de pez a pez) o vectorial, en la cual el agua es el principal vector abiótico. Los reservorios de la HCK son peces infectados clínicamente y portadores ocultos del virus entre peces de piscifactoría, asilvestrados o salvajes. Se excreta virus virulento por las heces, la orina, las branquias y el mucus cutáneo. En condiciones experimentales, se ha observado que la carpa común infectada a 16°C excreta continuamente virus infeccioso durante periodos más largos de tiempo que a 23°C o a 28°C (Yuasa *et al.*, 2008). El curso de la enfermedad puede ser rápido, en concreto a temperaturas óptimas (23-25°C), pero menos rápido a temperaturas inferiores a los 23°C. La enfermedad se podría manifestar por sí misma 3 días después de añadir peces no expuestos anteriormente al virus a un estanque con peces enfermos, pero otros investigadores han indicado que se tardan 8 a 21 días en observar la enfermedad en dichos peces no expuestos anteriormente al virus (Bretzinger *et al.*, 1999; Hedrick *et al.*, 2000).

2.3.2. Prevalencia

Hay pocas observaciones publicadas sobre la prevalencia del virus en poblaciones de carpa salvajes ni de piscifactoría. Existen indicios observados en pruebas experimentales de la persistencia del virus en carpas comunes infectadas a una temperatura permisiva y posteriormente mantenidas a una temperatura inferior a la permisiva (St-Hilaire *et al.*, 2005; véase el apartado 2.2.5). El análisis de muestras de suero sanguíneo del estudio mostró que una parte de las carpas (al menos un 10-25%) presentó altos títulos de anticuerpos y que la respuesta inmunitaria fue detectable durante varios meses (St-Hilaire *et al.*, 2009). En otros estudios, se detectó ADN vírico en carpas mediante PCR, en ausencia de enfermedad, a 13°C y es posible que peces infectados supervivientes a bajas temperaturas puedan actuar como reservorios del virus (Gilad *et al.*, 2004). En poblaciones salvajes que han sobrevivido a un brote de HVK hay indicios de una alta prevalencia de carpas seropositivas. En el estudio realizado con PCR sobre los anticuerpos contra el HVK en el lago Biwa del 2006, análisis posteriores de la población de carpas supervivientes mostraron que un 54% de las carpas más viejas eran seropositivas y que un 31% eran positivas según la PCR (Uchii *et al.*, 2009). Como parte de un estudio de la distribución del HVK en el Inglaterra y Gales, en 2007 se visitaron cuatro lugares en los que habían tenido lugar brotes clínicos del HVK en 2006 y en los que no se habían realizado introducciones de peces desde ese momento, y en ellos se comprobó si había anticuerpos contra el HVK mediante enzimoimmunoanálisis (ELISA) (Talyor *et al.*, 2010). Tres de estos lugares produjeron resultados positivos y mostraron un 85 a 93% de seroprevalencia en las muestras de la población de carpas supervivientes. El cuarto lugar dio resultados negativos.

2.3.3. Distribución geográfica

Tras los primeros informes de la HCK en Israel y Alemania en 1998 y la detección de ADN del HVK en muestras de tejido tomadas durante un episodio de mortalidad masiva de carpas en el Reino Unido en 1996 (Bretzinger *et al.*, 1999; Perelberg *et al.*, 2003), la distribución geográfica de la enfermedad se ha ampliado. La enfermedad se ha extendido a muchos países de todo el mundo, sobre todo a través del comercio en la carpa koi, antes de que se supiera lo que se conoce actualmente sobre la enfermedad y de que se dispusiera de medios para detectarla. Ahora se sabe que tiene lugar, o se ha registrado, en peces importados al menos a 28 países distintos. En Europa, el HVK se ha detectado en muchos países de todo el continente (Bergmann *et al.*, 2006; Haenen *et al.*, 2004; Novotny *et al.*, 2010). Más recientemente, se han notificado a la OIE brotes de HCK desde Rumanía, Eslovenia, España y Suecia. En Asia, China (Hong Kong), Taipei chino, Indonesia, Japón, Corea (Rep. de), Malasia (), Singapur (en peces importados de Malasia) y Tailandia (Haenen *et al.*, 2004; Ilouze *et al.*, 2010; Pikulkaew *et al.*, 2009; Sano *et al.*, 2004). En cuanto al resto del mundo, en Sudáfrica, Canadá y EE.UU. (Garver *et al.*, 2010; Haenen *et al.*, 2004; Hedrick *et al.*, 2000) se han registrado casos de HCK. Es probable que el virus esté presente en muchos más países, pero hasta ahora no se ha identificado ni notificado.

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

La morbilidad de las poblaciones afectadas puede ser del 100% y la mortalidad, del 70-80%, pero esta última puede alcanzar incluso el 90 o el 100% (Bretzinger *et al.*, 1999; Haenen *et al.*, 2004). En carpas enfermedad a menudo se observan infecciones bacterianas y/o parasitarias secundarias y concomitantes, y pueden afectar a la mortalidad y a la presentación de signos clínicos de la enfermedad (Haenen *et al.*, 2004).

2.3.5. Factores ambientales

Los patrones de la enfermedad están influidos por la temperatura del agua, la virulencia del virus, la edad y el estado de los peces, la densidad de población y factores estresantes (como el transporte, el desove

o una mala calidad del agua). La enfermedad depende de la temperatura, y tiene lugar a 16 a 25°C (Haenen *et al.*, 2004; Hedrick *et al.*, 2000; Perelberg *et al.*, 2003; Sano *et al.*, 2004). En condiciones experimentales, la enfermedad ha causado alta mortalidad a 28°C pero no a 29 ni a 30°C, así como tampoco a 13°C (Gilad *et al.*, 2004; Ilouze *et al.*, 2010). Sin embargo, se detectó ADN vírico en los peces mediante PCR a 13°C, y es posible que peces infectados que sobreviven a bajas temperaturas puedan ser reservorios del virus (Gilad *et al.*, 2004).

2.4. Control y prevención

Los métodos de control y prevención de la HCK deben basarse principalmente en evitar la exposición al virus y en unas buenas prácticas de higiene y bioseguridad. Esto es factible en piscifactorías pequeñas a las que se suministra agua de pozos entubados o de manantial y que dispongan de un sistema de seguridad para evitar que entren peces a la piscifactoría con el agua de descarga.

2.4.1. Vacunación

Actualmente no se dispone de ninguna vacuna inocua y eficaz. Sin embargo, se han utilizado virus vivos atenuados para vacunar carpas y proteger a los peces de la exposición al virus. La preparación de la vacuna indujo la formación de anticuerpos contra el virus y la protección duró al menos 8 meses (Ilouze *et al.*, 2010). La vacuna se autorizó para una utilización de emergencia en Israel y se ha utilizado mucho en piscifactorías de carpas de todo el país. En estudios realizados en Japón se observó que la administración por vía oral de una vacuna basada en lisosomas que contenía HVK inactivado era eficaz para proteger a las carpas contra la infección por el HVK (Ilouze *et al.*, 2010).

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

No es aplicable.

2.4.3. Inmunoestimulación

Actualmente no se dispone de información publicada sobre la utilización de inmunoestimulantes para el control de la HCK en las carpas. Sin embargo, se sabe que existe un campo de interés en la investigación.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

Se ha observado una resistencia distinta en cada cepa de carpa. En estudios de selección genética a favor de la resistencia, se expuso a infección experimental o natural la descendencia de cruces de dos cepas de carpas domesticadas y una cepa de carpa salvaje. La menor supervivencia observada fue de alrededor del 8%, pero la supervivencia de la cepa más resistente fue del 61-64% (Aspira *et al.*, 2005). En un estudio más reciente sobre la resistencia, 96 familias derivadas de un cruce de dos alelos de cuatro cepas europeas/asiáticas de carpa común fueron expuestas experimentalmente al HVK. Las supervivencias de los cinco cruces más resistentes en la prueba final de exposición al virus oscilaron entre el 42,9 y el 53,4% (Dixon *et al.*, 2009).

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

No se han notificado brotes naturales de la HCK en las especies de carpas herbívoras criadas más habituales, como la carpa plateada (*Hypophthalmichthys molitrix*), la carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*), o la carpa cabezona (*Aristichthys nobilis*). Las especies de carpas herbívoras a menudo se crían en policultivo con carpa común, pero en estas especies no se han observado signos de la enfermedad ni mortalidad, ni en condiciones de policultivo normal ni tras la cohabitación experimental con peces infectados, ni tras la exposición directa al virus (Ilouze *et al.*, 2010). Los híbridos de carpa común también constituyen un posible método de control para prevenir pérdidas importantes debidas a la HCK. En estudios sobre una población de híbridos de macho de pez rojos x hembras de carpa común se observó que eran resistentes a la HCK (Hedrick *et al.*, 2006). Estos híbridos presentan un crecimiento rápido y tienen un aspecto morfológico más similar a sus progenitores maternos. Sin embargo, se ha detectado ADN del HVK mediante PCR en híbridos supervivientes, lo cual sugiere que son posibles portadores del virus (Hedrick *et al.*, 2006). Por el contrario, en un estudio realizado en Polonia se observó una mortalidad del 35-42% en híbridos de pez rojo x carpa koi y del 91-100% en híbridos de carpa cruciana x carpa koi, expuestos al HVK mediante inmersión en baño (Bergmann *et al.*, 2010; véase el apartado 2.2.1). Puede haber un alto nivel de variación genética entre híbridos de distintos cruces y, en consecuencia, una variación en la resistencia al HVK. Esto dependería en gran medida de la cepa de carpa común o carpa koi utilizada. Se ha observado que los niveles de resistencia a la HCK varían en función de las cepas de carpa común utilizadas (Dixon *et al.*, 2009; Shapira *et al.*, 2005).

2.4.6. Agentes bloqueantes

No son aplicables.

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

Los huevos y las larvas pueden desinfectarse mediante un tratamiento con iodóforos. Se ha observado que el HVK se inactiva mediante iodóforos a razón de 200 mg/litro durante 30 segundos a 15°C (Kasai *et al.*, 2005).

2.4.8. Prácticas generales de manejo

Las medidas de bioseguridad deben incluir la garantía de que las nuevas introducciones de peces procedan de fuentes libres de la enfermedad y la instalación de un sistema de cuarentena donde puedan mantenerse los peces nuevos con peces centinela a temperaturas permisivas para la HCK. Así, los peces pasan por una cuarentena de un mínimo de 4 semanas a 2 meses antes de ser transferidos al estanque principal y mezclados con peces nunca antes expuestos al virus. Las medidas de higiene del lugar deben ser similares a las recomendadas para el virus de la viremia primaveral de la carpa e incluir desinfección de huevos, desinfección periódica de estanques, desinfección química del equipo de la piscifactoría, manipulación cuidadosa de los peces, evitación del estrés y desechado seguro de los peces muertos.

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

Todos los grupos de edad de las carpas parecen ser susceptibles a la HCK, aunque en general los peces más jóvenes, de hasta 1 año, son más susceptibles a la enfermedad clínica y son los que se recomienda tomar como muestra. La idoneidad de las muestras de peces escogidos durante un brote sospechoso de HCK dependerá de la prueba de diagnóstico utilizada. Las carpas moribundas o que acaban de morir y que presentan signos clínicos característicos de la enfermedad son adecuadas para un análisis mediante la mayoría de pruebas descritas en el apartado 4. Los peces muertos que presentan signos de descomposición tisular pueden ser adecuados solo cuando se analiza mediante métodos basados en la PCR. De igual forma, las muestras tomadas de peces aparentemente sanos, en una población sospechosa de estar enferma, tal vez solo puedan analizarse de manera fiable mediante métodos basados en la PCR más sensibles.

3.2. Conservación de muestras para su envío

Deben enviarse peces enteros al laboratorio, vivos o sacrificados y empaquetados por separado en recipientes asépticos herméticos. Sin embargo, es claramente preferible y muy recomendable obtener muestras de órganos de los peces inmediatamente después de la obtención en los lugares de producción de peces. Las muestras de peces enteros o de órganos escogidos deben enviarse al laboratorio en recipientes refrigerados o sobre hielo. Debe evitarse la congelación de los peces u órganos diseccionados escogidos. Sin embargo, si se reciben peces u órganos congelados, pueden ser útiles para ser analizados, aunque solo mediante métodos basados en la PCR. Las muestras pequeñas de tejido también pueden enviarse conservadas en alcohol (por ejemplo, etanol al 80-100%) para ser analizadas mediante métodos basados en la PCR.

3.3. Combinación de varias muestras

Cuando se analizan peces afectados clínicamente mediante métodos basados en la PCR, y en concreto si se intenta el aislamiento del virus, debe evitarse la combinación de muestras o restringirse a un máximo de dos peces por muestra compuesta. Para las pruebas de vigilancia sanitaria, mediante métodos basados en la PCR, la combinación debe restringirse a un máximo de cinco peces por muestra compuesta.

3.4. Órganos y tejidos de elección

Al analizar peces afectados clínicamente mediante métodos basados en la PCR, y en concreto si se intenta aislar el virus, se recomienda tomar muestras de tejido de branquia, riñón y bazo. El virus es más abundante en estos tejidos durante el curso de una infección manifiesta y también se han detectado altos niveles de virus en tejido encefálico e intestinal (Dishon *et al.*, 2005; Gilad *et al.*, 2004). Cuando se analizan peces infectados de forma subclínica y aparentemente sanos mediante métodos basados en la PCR, se recomienda incluir también intestino y encéfalo.

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

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

4. Métodos de diagnóstico

El diagnóstico de la HCK en peces afectados clínicamente puede realizarse mediante muchos métodos. Actualmente, el aislamiento del HVK en cultivo celular no se considera tan sensible como los métodos basados en la PCR publicados para detectar el ADN del HVK. El virus se aísla solo en unas pocas líneas celulares y estas células pueden ser difíciles de manejar. Como consecuencia, el aislamiento del virus en cultivo celular no es un método fiable de diagnóstico para la HCK (Haenen *et al.*, 2004). Los métodos de inmunodiagnóstico, similares a los utilizados para el diagnóstico de la viremia de primavera de la carpa (como la inmunofluorescencia [IF] o el ELISA), pueden ser adecuados para una identificación y diagnóstico rápidos de la HCK, pero no se han documentado, comparado ni validado ampliamente. Hasta que no se disponga de pruebas validadas, el diagnóstico de la HCK no debe basarse en una sola prueba, sino en una combinación de dos o tres (Haenen *et al.*, 2004).

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

Durante un brote de HCK se producirá un considerable aumento de la mortalidad en la población. Todos los grupos de edad de los peces parecen ser susceptibles a la HCK, aunque, en infecciones experimentales, los peces de hasta 1 año de edad son más susceptibles a la enfermedad. Al examinar con más detalle los peces, se observa que los signos clínicos característicos son una palidez o enrojecimiento de la piel, que también puede tener una textura rugosa (tipo papel de lija), una pérdida focal o total de la epidermis, una excesiva o insuficiente producción de mucus en la piel y las branquias, y una palidez de las branquias. Otros signos macroscópicos son una endoftalmia (ojos hundidos) y hemorragias en la piel y la base de las aletas, así como erosión en las aletas.

4.1.2. Cambios de comportamiento

Los peces se vuelven letárgicos, se separan del banco y se reúnen en la entrada del agua o en los márgenes de un estanque y jadean en la superficie del agua. Algunos peces pueden experimentar pérdida de equilibrio y desorientación, pero también pueden presentar signos de hiperactividad.

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

No hay lesiones macroscópicas patognomónicas. El diagnóstico definitivo debe esperar a la detección directa de ADN vírico o al aislamiento e identificación del virus. Sin embargo, la lesión anatomopatológica macroscópica más habitual se observa en las branquias y puede variar en cuanto a extensión desde zonas necróticas pálidas a una gran área de cambio de color, necrosis e inflamación intensas. Otros signos anatomopatológicos macroscópicos observados son unas manchas pálidas e irregulares en la piel, asociadas a un exceso de secreción de mucus y también una deficiencia de producción de mucus cuando las manchas cutáneas tienen una textura tipo papel de lija. Otros signos clínicos observados con frecuencia son anorexia, endoftalmia (ojos hundidos) y hemorragia superficial en la base de las aletas. En un examen más detallado se puede observar erosión de las láminas primarias, fusión de láminas secundarias e hinchazón en las puntas de las láminas primarias y secundarias. Otras lesiones internas aparecen de forma variable y a menudo están ausentes en casos de muerte súbita. Otras lesiones anatomopatológicas macroscópicas que se han descrito son adherencias en la cavidad abdominal con o sin coloración anómala en los órganos internos (más clara o más oscura). El riñón o el hígado pueden presentar aumento de tamaño, y también pueden presentar hemorragias petequiales. La presencia de lesiones macroscópicas también puede complicarse porque los peces enfermos, en concreto la carpa común, también están infestados con ectoparásitos, como *Argulus* sp., *Chilodonella* sp., *Cryptobia* sp., *Dactylogyrus* sp., *Gyrodactylus* sp., *Ichthyobodo* sp., *Ichthyophthirius* sp., *Trichodina* sp. y monogeneas de las branquias, así como por muchas especies de bacterias, sobre todo *Flavobacterium columnare* a temperaturas del agua más cálidas.

4.2.2. Bioquímica clínica

No se dispone de información publicada.

4.2.3. Anatomopatología microscópica

Al examinar las branquias con mayor detalle, mediante microscopía de bajos aumentos, se puede observar erosión de las láminas primarias, fusión de las láminas secundarias e hinchazón de las puntas de las láminas tanto primarias como secundarias.

La histopatología de la enfermedad puede ser inespecífica y variable, pero la inflamación y necrosis de las branquias es una característica constante. Las branquias también presentan hiperplasia e hipertrofia del epitelio branquial, y puede observarse fusión de láminas secundarias y adherencia de los filamentos de las branquias. Se observa necrosis de las branquias, que oscila entre pequeñas zonas de células epiteliales necróticas de láminas secundarias y la pérdida completa de las láminas. Las células epiteliales y los leucocitos de las branquias pueden presentar una destacada hinchazón nuclear, y a menudo se observa una marginación de la cromatina que confiere un aspecto de “anillo grabado” e inclusiones intranucleares eosinófilas difusas pálidas. Se ha observado inflamación, necrosis e inclusiones nucleares (individualmente o combinadas) en otros órganos, sobre todo en el riñón, pero también en el páncreas, el hígado, el encéfalo, el intestino y el epitelio oral.

4.2.4. Preparaciones húmedas

No son aplicables

4.2.5. Frotis

El HVK se ha identificado en improntas de contacto y en frotis de hígado, riñón y encéfalo de peces infectados, mediante inmunofluorescencia (IF). En el riñón se observaron niveles más altos de IF positiva y el virus se pudo detectar mediante IF de una impronta de riñón 1 día post-infección (Pikarsky *et al.*, 2004; Shapira *et al.*, 2005).

4.2.6. Microscopía electrónica/citopatología

La detección de partículas víricas mediante el examen de tejidos de carpas infectadas clínicamente por microscopía electrónica de transmisión (MET) no es un método de diagnóstico fiable. Deben tomarse muestras de trozos de branquia y tejido renal fijados en glutaraldehído de carpas intensamente infectadas (>10⁶ partículas víricas). Los mejores resultados se obtienen recogiendo varias carpas de una población afectada que se encuentren en distintos estadios de la infección. Esto contribuirá a garantizar que algunas de las muestras de tejido pertenezcan a ejemplares intensamente infectados.

4.3. Métodos de detección e identificación del agente

En este apartado, no todos los métodos se describen con demasiado detalle porque no ha habido una comparación y validación completas de los métodos de detección e identificación del HVK. En los casos en los que sí se ha realizado, se proporciona una breve descripción de los métodos publicados de los que se dispone. Las recomendaciones en cuanto al método se basarán en otras pruebas y validaciones, y en los datos que se vayan obteniendo de los laboratorios que hayan desarrollado los métodos, con el fin de decidir si son adecuados para este fin.

4.3.1. Métodos directos de detección

Se ha identificado el HVK en improntas de contacto de hígado, riñón y encéfalo de peces infectados, mediante inmunofluorescencia (IF). Los niveles más altos de IF positiva se observaron en el riñón y el virus se pudo detectar mediante IF en una impronta de riñón 1 día después de la infección (Pikarsky *et al.*, 2004; Shapira *et al.*, 2005). También se ha detectado antígeno vírico en tejidos infectados mediante un método de tinción por inmunoperoxidasa. El antígeno vírico se detectó 2 días después de la infección en el riñón, y también se observó en las branquias y el hígado (Pikarsky *et al.*, 2004). Sin embargo, la detección del HVK mediante inmunotinción debe interpretarse con cuidado, dado que pueden teñirse células positivamente como consecuencia de una reacción cruzada con virus serológicamente relacionados (como el HVCy-1) o una proteína no vírica (Pikarsky *et al.*, 2004). A continuación se describe un método de detección directa del HVK a partir de improntas de riñón mediante la prueba de la inmunofluorescencia indirecta (IFAT).

Se han utilizado métodos de inmunofluorescencia (IF) e hibridación *in-situ* (ISH), llevados a cabo en leucocitos extraídos de peces, para aplicaciones de investigación cuyo objetivo ha sido la detección o identificación del HVK. Aunque estos métodos no se han comparado exhaustivamente con otras técnicas, son técnicas no destructivas (no letales) y algunos laboratorios podría encontrarlas útiles en un contexto de diagnóstico. En este texto no se indican los detalles de estos métodos, pero pueden hallarse los protocolos detallados de separación de los leucocitos de la sangre y de la IF y la ISH en informes publicados por Bergmann *et al.* (2009, 2010a).

En muchos laboratorios de todo el mundo se están desarrollando métodos de detección directa del HVK basados en ELISA en tejidos infectados, pero hasta ahora no se ha publicado ningún método validado. Actualmente, se dispone de un método de ELISA publicado que se desarrolló en Israel para detectar el HVK en deyecciones (heces) de peces (Dishon *et al.*, 2005). Los ELISA desarrollados tendrán una sensibilidad baja que puede ser adecuada para la detección de los altos niveles de HVK hallados en tejidos de peces clínicamente enfermos, pero no para la vigilancia del HVK en poblaciones sanas.

El método de detección del HVK más habitualmente utilizado directamente en tejidos de peces son las pruebas basadas en la PCR específicas del HVK.

4.3.1.1. Métodos microscópicos

4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

No son aplicables.

4.3.1.1.2. Frotis/Improntas

4.3.1.1.2.1. Prueba de inmunofluorescencia indirecta en improntas de riñón

- i) Se sangran los peces por completo.
- ii) Se realizan improntas de riñón sobre portas de vidrio limpios o en el fondo de los pocillos de una placa de cultivo celular de plástico
- iii) Se deja secar la impronta al aire durante 20 minutos.
- iv) Se lavan una vez con solución salina tamponada con fosfato (PBS) 0,01 M, a continuación tres veces brevemente con acetona fría (conservada a -20°C) en el caso de los portas de vidrio o una mezcla de un 30% de acetona y un 70% de etanol, también a -20°C, en el caso de los pocillos de plástico.
- v) Se deja actuar el fijador durante 15 minutos. Un volumen de 0,5 ml/pocillo de 2 cm² es suficiente para improntas en placas de cultivo de celular.
- vi) Se dejan secar las improntas fijadas al aire durante al menos 30 minutos y se procesan de inmediato o bien se congelan a -20°C.
- vii) Se rehidratan las improntas secadas mediante cuatro pasos de lavado con solución de PBS 0,01 M, pH 7,2, que contenga Tween 20 al 0,05% (PBST), y se retira este tampón por completo tras el último lavado.
- viii) Se prepara una solución de anticuerpos purificados o de suero anti HVK en PBS 0,01 M, pH 7,2, que contenga Tween 20 al 0,05% (PBST), a la dilución adecuada (que se habrá establecido previamente o la que proporcione el proveedor del reactivo).
- ix) Se bloquean con leche desnatada al 5% o seroalbúmina bovina al 1%, en PBST durante 30 minutos a 37°C.
- x) Se lavan cuatro veces con PBST.
- xi) Se tratan las improntas con la solución de anticuerpos (preparada en el paso viii) durante 1 hora a 37°C en una cámara con humedad y no se permite que se produzca evaporación. Un volumen de 0,25 ml/pocillo de 2 cm² es suficiente para improntas en placas de cultivo celular.
- xii) Se lavan cuatro veces con PBST.
- xiii) Se tratan las improntas durante 1 hora a 37°C con una solución de anticuerpos anti inmunoglobulina conjugados con isotiocianato de fluoresceína (ITCF) utilizada en la primera capa y preparada según las instrucciones del fabricante. Estos anticuerpos conjugados con ITCF suelen ser anticuerpos de conejo o cabra.
- xiv) Se lavan cuatro veces con PBST.
- xv) Se añade PBS a razón de 0,5 ml/pocillo de 2 cm² a las improntas tratadas en placas de cultivo celular y se examinan de inmediato o se montan los portas de vidrio con cubres utilizando solución salina de glicerol a pH 8,5 antes de la observación microscópica.
- xvi) Se examinan bajo luz UV incidente en un microscopio con oculares de 10x y objetivos de 20-40x que tengan aperturas numéricas de >0,65 y >1,3, respectivamente. Deben incluirse controles positivos y negativos que den los resultados esperados antes de cualquier otra observación.

4.3.1.1.3. Cortes fijados

El método detallado en el apartado 4.3.1.1.2 anterior también es adecuado para la detección del HVK en cortes místicos fijados en parafina y fijados en formalina neutra tamponada al 10% (NBF). Sin embargo, los cortes desparafinados, rehidratados en PBS, podrían precisar otro tratamiento para revelar el antígeno, que podría estar enmascarado por una excesiva fijación del tejido. Un tratamiento frecuente es la incubación de los cortes con tripsina al 0,1% en PBS a 37°C durante 30 segundos. A continuación, los cortes se lavan en PBS fría antes de proceder con los pasos viii-xvi del apartado 4.3.1.1.2 anterior.

NOTA: Para la detección directa del antígeno vírico mediante IFAT o inmunohistoquímica, los tejidos deben fijarse 24 a 48 horas en NBF al 10% y a continuación el fijador debe sustituirse por etanol al 10% para un almacenaje de larga duración.

4.3.1.2. Detección, aislamiento e identificación del agente

4.3.1.2.1. Cultivo celular

El diagnóstico de la HCK en peces afectados clínicamente se puede conseguir mediante el aislamiento del virus en cultivo celular. Sin embargo, el virus solo puede aislarse en unas pocas líneas celulares y estas pueden ser difíciles de manejar. Además, el aislamiento en cultivo celular no es tan sensible como los métodos basados en la PCR publicados para detectar ADN del HVK y no se considera un método de diagnóstico fiable para la HCK (Haenen *et al.*, 2004).

Línea celular a utilizar: KF-1 o CCB

Extracción del virus

Se utiliza el procedimiento descrito en el Capítulo 2.3.0, apartado A.2.2.2.

Inoculación de monocapas celulares

- i) Antes de la inoculación, pueden tratarse los homogenados de combinaciones de órganos con antibióticos, como se detalla en el Capítulo 2.3.0, apartados A.2.2.1 y A.2.2.2.
- ii) Si se han observado efectos citotóxicos tras la inoculación de homogenados tratados con antibióticos, se filtra al menos 1 ml del sobrenadante del homogenado de órganos a una dilución de 1/10 por un filtro de acetato de celulosa desechable de 0,45 µm (o a una unidad acoplada a una membrana de filtro de baja unión a proteína similar).
- iii) Para la inoculación directa, se transfiere un volumen adecuado del homogenado tratado con antibiótico o filtrado a monocapas celulares de 24 a 48 horas de edad en frascos de cultivo tisular o a placas multipocillo. Se inoculan al menos 5 cm² de monocapa celular con 100 µl del sobrenadante filtrado. Como alternativa, se crea otra dilución decimal del sobrenadante filtrado en medio de cultivo celular, se tampona a pH 7,6 y se suplementa con un 2% de suero fetal bovino (FBS), y se deja absorber durante 30 minutos a 1 hora a 18-22°C. A continuación, sin retirar el inoculado, se añade el volumen adecuado de medio de cultivo celular (1-1,5 ml/5 cm² para frascos de cultivo celular), y se incuba a 20 - 25°C. NOTA: Cuando se utilicen placas multipocillo, la incubación en atmósfera de CO₂ o la adición de HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfónico) al medio de cultivo celular mantendrá el pH correcto durante la incubación.

Seguimiento de la incubación

- i) Se sigue el curso de la infección en controles positivos y otros cultivos celulares inoculados mediante examen microscópico diario a 40-100 aumentos durante 14 días. Se recomienda utilizar un microscopio de contraste de fases.
- ii) Se mantiene el pH del medio de cultivo celular a 7,3-7,6 durante toda la incubación. Esto se puede lograr añadiendo al medio de cultivo celular inoculado tampón bicarbonato estéril en el caso de frascos de cultivo celular cerrados con mucha fuerza, o bien medio tamponado con HEPES en el caso de placas multipocillo.
- iii) Si aparece un efecto citopático (ECP) en estos cultivos celulares inoculados con las diluciones de los sobrenadantes del homogenado analizado, los procedimientos de identificación deben llevarse a cabo de inmediato (véase el apartado 4.3.1.2.2 abajo).
- iv) Si no aparece ECP en los cultivos inoculados (a pesar de un progreso normal del ECP en los controles del virus), debe realizarse un subcultivo de los cultivos inoculados durante 14 días

más. En el caso de que el control del virus no presente ECP, el proceso debe repetirse con células susceptibles frescas y nuevas muestras.

Procedimientos de subcultivo

- i) Se transfieren alícuotas de medio de cultivo celular de todas las monocapas inoculadas con sobrenadante de homogenado de órgano a cultivos celulares frescos.
- ii) Se inoculan monocapas celulares como se ha descrito anteriormente en el apartado 4.3.1.2.1, Inoculación de monocapas celulares, paso iii.
- iii) Se incuban y controlan como se ha descrito antes en el apartado 4.3.1.2.1.

Si no se produce ECP, la prueba puede considerarse negativa.

Identificación confirmativa

El método más fiable para la identificación confirmativa de un ECP es la PCR, seguida del análisis de la secuencia del producto de la PCR. Los métodos de PCR recomendados para la identificación del HVK son los mismos que los recomendados para la detección directa en tejidos de peces (apartado 4.3.1.2.3, abajo). Para la confirmación final, los productos de la PCR del tamaño adecuado deben identificarse como HVK en origen mediante análisis de la secuencia (véase el apartado 4.3.1.2.3, abajo).

Confirmación mediante PCR

- i) Se extrae ADN del sobrenadante del cultivo del virus mediante un kit adecuado de extracción de ADN o un reactivo. Un ejemplo de extracción de ADN utilizando un método de extracción basado en las sales (reactivo DNAzol®) se describe abajo en el apartado 4.3.1.2.3.1.
- ii) A continuación, el ADN extraído se amplifica mediante los protocolos de PCR descritos abajo en el apartado 4.3.1.3.1.1.

A continuación, los productos de la PCR amplificados pueden separarse del gel y secuenciarse como se describe en el apartado 4.3.1.2.3.

4.3.1.2.2 Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos

Se están desarrollando métodos basados en el enzoinmunoanálisis (ELISA) para la detección directa del antígeno HVK en tejidos infectados en muchos laboratorios, y estos métodos también podrían ser útiles para la identificación confirmativa del HVK. Actualmente, se dispone de un método ELISA publicado que se desarrolló en Israel para detectar el HVK en deyecciones (heces) de peces (Dishon *et al.*, 2005).

Los métodos de identificación del virus que se basan en la producción de cultivos celulares infectados con el HVK (como la IFAT, la inmunoperoxidasa o la neutralización sérica) no se recomiendan, debido a que el crecimiento del virus en cultivos celulares susceptibles es lento e impredecible.

4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

De los métodos de PCR de un solo paso publicados, los protocolos que se indican a continuación se consideran actualmente los más sensibles para la detección de ADN del HVK en muestras de tejido fresco de carpas con enfermedad clínica. Los protocolos podrían permitir también la detección de niveles subclínicos del virus. En el primero se utiliza el conjunto de cebadores TK desarrollado por Bercovier *et al.* en la Facultad de Medicina de la Universidad Hebrea Hadassah, en Israel (Bercovier *et al.*, 2005). El segundo lo desarrollaron Yuasa *et al.* en el Instituto Nacional de Investigación sobre Acuicultura (NRIA), Watarai, Mie, Japón (Yuasa *et al.*, 2005) y es una importante mejora de un protocolo publicado. Si el tejido presenta señales de descomposición, tal vez tenga que utilizarse el conjunto de cebadores que tiene por diana regiones más cortas del genoma.

Algunas de las PCR que prefieren muchos laboratorios de diagnóstico respecto a la PCR convencional, son las PCR cuantitativas, como la PCR en tiempo real. La prueba cuantitativa más frecuentemente utilizada para la detección del HVK es la PCR en tiempo real Taqman de Gilad (*Gilad et al.* 2004). Hoy en día, la PCR en tiempo real de Taqman es un procedimiento diagnóstico frecuente que se ha observado que detecta y evalúa cuantitativamente cantidades muy bajas de copias de secuencias del ácido nucleico de interés. La PCR Taqman evita gran parte del riesgo de contaminación inherente a las PCR anidadas porque minimiza la manipulación de las muestras mediante la automatización durante la preparación de las mismas y mediante procedimientos de ciclado térmico.

En el protocolo de preparación de la muestra detallado a continuación se utiliza un método de extracción basado en sales (reactivo DNAzol®) para la extracción de ADN del HVK. Es un protocolo fácil de utilizar y de corta duración que además, es relativamente barato en comparación con otros. Los laboratorios que no están familiarizados con el DNAzol® o reactivos similares de extracción basada en sales tal vez consideren que es un método menos fiable. Sin embargo, existen muchos kits comerciales de extracción de ADN basados en sales y en matriz de sílice (algunos de los fabricantes conocidos son Roche, Qiagen e Invitrogen) que producen ADN de alta calidad adecuado para su utilización con los protocolos de PCR descritos.

4.3.1.2.3.1. Detección directa mediante PCR

Preparación de la muestra y extracción de ADN utilizando el reactivo DNAzol®

La extracción de virus a partir de tejidos de órganos debe llevarse a cabo mediante el procedimiento descrito en el Capítulo 2.3.0, apartado A.2.2.2.

- i) Se añaden 100 µl de homogenado de tejido (1/10 [p/v]) a un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml que contenga 1 ml de reactivo DNAzol®
- ii) Se mezcla suavemente invirtiendo el tubo cinco veces y dejándolo reposar a temperatura ambiente 5 minutos, y después se centrifuga a 10.6000 **g** (rcf) 10 minutos mediante una microcentrifuga.
- iii) Se extrae 1 ml del sobrenadante y se introduce en un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml que contenga 0,5 ml de etanol.
- iv) Se mezcla suavemente invirtiendo el tubo cinco veces y dejándolo reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos, y a continuación se centrifuga a 18.000 **g** (fcr –fuerza centrífuga relativa-) durante 30 minutos mediante una microcentrifuga.
- v) Se retira el sobrenadante y se lava el precipitado con 250 µl de etanol al 70% en agua de grado de biología molecular.
- vi) Se centrifugan las muestras 5 minutos a 18.000 **g** (fcr).
- vii) Se retira el etanol mediante una pipeta y se seca el precipitado al aire dejando los tubos abiertos sobre la repisa de trabajo 5 minutos.
- viii) Se vuelve a suspender el precipitado en 50 µl de agua de grado de biología molecular, se precalienta a 60°C y se incuba a 60°C durante 5 minutos. Las muestras se pueden guardar a -20°C hasta que sean necesarias.

PCR

Comentarios generales

La PCR tiende a dar falsos positivos y falsos negativos. Los falsos positivos (muestras negativas que dan una reacción positiva) pueden ser consecuencia de un arrastre de producto de las muestras positivas o, lo que es más frecuente, de una contaminación cruzada con productos de la PCR de pruebas anteriores. Por tanto, cada prueba y extracción de tejido debe incluirán control negativo para descartar la contaminación. Para minimizar el riesgo de contaminación, deben utilizarse puntas de pipeta que prevengan la formación de aerosol para todos los pasos de preparación de la muestra y de la PCR. Además, todas las PCR deben prepararse en una zona limpia que sea independiente de la zona donde se llevan a cabo las amplificaciones y la electroforesis en gel. No debe compartirse equipo (como batas o material consumible) entre zonas y, a ser posible, se debe restringir el acceso entre zonas. El equipo, la ropa y el papel (como los libros) pueden contener productos de la PCR contaminantes. Además, es necesario asegurarse de que todas las superficies de trabajo y campanas de flujo de aire utilizadas para las extracciones y la PCR se limpien y descontaminen periódicamente con luz UV y lejía. Los reactivos y consumibles también deben descontaminarse sistemáticamente con radiación UV. Para garantizar la integridad de las muestras, estas deben guardarse siempre (por ejemplo en un congelador o nevera) en un lugar alejado del laboratorio o zona destinados a la biología molecular.

Protocolo 1 (con cebadores TK de Bercovier)

- i) Para cada muestra, se prepara una mezcla madre que contenga:

| | |
|--------|---|
| 10 µl | Tampón de reacción (conc. x5) |
| 5 µl | MgCl ₂ (solución madre 25 mM) |
| 0,5 µl | dNTPs (mezcla 25 mM) |
| 0,5 µl | Cebador directo (solución madre de 10 pmol µl ⁻¹) |

0,5 µl Cebador inverso (solución madre de 10 pmol µl⁻¹)
 0,25 µl ADN polimerasa 500 µ (5 µ/µl)
 30,75 µl Agua de grado biología molecular
 Cebadores TK de Bercovier:
 Directo = 5'-GGG-TTA-CCT-GTA-CGA-G-3'
 Inverso = 5'-CAC-CCA-GTA-GAT-TAT-GC-3'
 Tamaño del producto = 409 pb
 Para cada muestra, se distribuyen 47,5 µl en un tubo de microcentrífuga de pared fina de 0,5 ml.
 Se recubren con dos gotas de aceite mineral.

- ii) Se añaden 2,5 µl del ADN extraído. El resto del ADN se guarda a -20°C.
- iii) Se colocan los tubos en un termociclador y se ejecuta el siguiente programa:

1 ciclo de 5 minutos a 94°C;
 40 ciclos de: 1 minuto a 95°C
 1 minuto a 52°C (véase la nota abajo)
 1 minuto a 72°C
 Un paso de extensión final de 10 minutos a 72°C.

Nota sobre las condiciones de ciclado: Muchos laboratorios han utilizado con éxito una temperatura de hibridación de 55°C para amplificar el HVK con cebadores TK elaborados por Bercovier.

- iv) Se visualiza el amplicón de la PCR de 409 pb mediante electroforesis del producto en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio al 2% y se observa utilizando transiluminación con luz UV. Debe incluirse una escala de pesos moleculares adecuada en el gel para determinar el tamaño del producto.
- v) Los productos del tamaño adecuado deben confirmarse como HVK en origen mediante análisis de la secuencia.

Protocolo 2 (con cebadores Gray Sph /modificación de Yuasa)

- i) Para cada muestra, se prepara una mezcla madre que contenga:

2 µl Tampón de reacción (conc. x10)
 1,6 µl dNTPs (mezcla 2,5 mM)
 0,2 µl Cebador directo (solución madre de 50 pmol µl⁻¹)
 0,2 µl Cebador inverso (solución madre de 50 pmol µl⁻¹)
 0,1 µl ADN polimerasa
 14,9 µl Agua de grado de biología molecular
 (NOTA: la concentración final de MgCl₂ en la mezcla madre es 2 mM)

Cebadores Gray Sph:

Directo = 5'-GAC-ACC-ACA-TCT-GCA-AGG-AG-3'

Inverso = 5'-GAC-ACA-TGT-TAC-AAT-GGT-CGC-3'

Tamaño del producto = 292 pb

Para cada muestra, se distribuyen 19 µl en un tubo de microcentrífuga de pared fina de 0,2 ml.
 Se recubren con dos gotas de aceite mineral.

- ii) Se añade 1µl del ADN extraído
- iii) Se colocan los tubos en un termociclador y se ejecuta el siguiente programa:

1 ciclo de 30 segundos a 94°C
 40 ciclos de: 30 segundos a 94°C
 30 segundos a 63°C
 30 segundos a 72°C
 Un paso de extensión final de 7 minutos a 72°C.

- iv) Se añaden 3 µl de tampón de carga 6x a cada producto de PCR y se someten a electroforesis 7 µl en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio al 2% a 100 V durante 20 minutos y se visualizan con luz UV. Debe incluirse una escala de pesos moleculares adecuada en el gel para determinar el tamaño del producto.
- v) Los productos del tamaño correcto deben confirmarse como HVK en origen mediante análisis de la secuencia.

Análisis de la secuencia de nucleótidos de los productos de la PCR

Los productos de la PCR se separan del gel y se purifican mediante un kit comercial de purificación de gel (como el GeneClean®, Q-BIOgene, Reino Unido). Se secuencian productos de la PCR simples e intensos (brillantes) tras la purificación, directamente en ambas direcciones con los cebadores utilizados en la amplificación inicial. Como alternativa, pueden clonarse productos de la PCR menos intensos (apenas perceptibles) mediante un vector de clonación TA (como el pGEM T, Promega) y se secuencian ambas cadenas del ADN mediante los conjuntos de cebadores universales M13. La amplificación, clonación y secuenciación se llevan a cabo por duplicado para eliminar posibles errores introducidos por la polimerasa Taq. A continuación, se analizan las reacciones de la secuencia en un *Genetic Analyser* y las alineaciones y secuencias consenso generadas mediante un programa informático adecuado (como Sequencher™ 4.0 software, Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, EE.UU.). Se recomienda a los laboratorios de análisis que no disponen de instalaciones de secuenciación que la encarguen a empresas que ofrezcan servicios de secuenciación. A la hora de enviar las muestras, los laboratorios de análisis deben seguir las instrucciones del servicio de secuenciación escogido.

4.3.2. Métodos serológicos

El estado inmunitario de los peces es un factor importante ante la exposición al HVK, puesto que tanto la inmunidad inespecífica (interferón) como la específica (anticuerpos séricos, inmunidad celular) desempeñan importantes papeles en las infecciones por herpesvirus. La enfermedad clínica predomina a temperaturas del agua de 18°C y superiores cuando la respuesta inmunitaria del hospedador es óptima. Las carpas infectadas producen anticuerpos contra el virus, y se han publicado pruebas basadas en el ELISA que detectan de forma fiable estos anticuerpos a altas diluciones del suero (Adkison *et al.*, 2005; Ilouze *et al.*, 2010; St-Hilaire *et al.*, 2005). Se han detectado anticuerpos en el suero 3 semanas después de la infección experimental y en supervivientes pasado 1 año desde la infección natural (Adkison *et al.*, 2005; Ilouze *et al.*, 2010; St-Hilaire *et al.*, 2005; Talyor *et al.*, 2010).

Se ha observado que el suero de carpa koi con anticuerpos contra el HVK presenta reacción cruzada, a un nivel bajo, con el HVCy-1, una prueba más de que estos virus están estrechamente relacionados. En análisis recíprocos con ELISA e inmunoelectrotransferencia del suero de carpas koi infectadas con el HVCy-1 y el HVK se observaron anticuerpos que presentaban reacción cruzada (Adkison *et al.*, 2005). Los virólogos que llevan a cabo el diagnóstico también deben saber que los peces recientemente vacunados contra el HVK podrían dar resultados positivos en el ELISA de detección de anticuerpos.

La detección de anticuerpos podría resultar un método útil para determinar si se han producido exposiciones previas al HVK en peces aparentemente sanos, y mientras no terminen de desarrollarse métodos basados en la PCR que permitan detectar de modo fiable virus persistente en peces expuestos, las pruebas basadas en anticuerpos podrían constituir el único medio de vigilancia. No obstante, debido a que no se sabe suficiente sobre las respuestas serológicas de los peces a las infecciones víricas, hasta ahora no se ha aceptado la detección de anticuerpos de los peces contra los virus como método sistemático de análisis para evaluar el estado vírico de las poblaciones de peces. En el futuro podrían validarse ciertas técnicas serológicas para ciertas infecciones víricas de los peces, lo cual haría que la utilización de la serología en los peces se aceptara más como método de detección de enfermedades.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

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

Tabla 5.1. Métodos de vigilancia dirigida y diagnóstico

| Método | Vigilancia dirigida | | | | Diagnóstico provisional | Diagnóstico confirmativo |
|---|---------------------|----|-----------|---------|-------------------------|--------------------------|
| | Larvas | PL | Juveniles | Adultos | | |
| Signos macroscópicos | d | d | c | c | b | d |
| MO directa | d | d | c | c | b | d |
| Histopatología | d | c | c | c | b | c |
| Aislamiento en cultivo celular | d | d | d | d | b | d |
| ME de transmisión | d | d | d | d | b | c |
| Pruebas de detección del virus basadas en anticuerpos | d | d | c | c | b | b |
| Sondas de ADN – <i>in situ</i> | d | d | c | c | b | b |
| PCR | d | b | b | b | a | a |
| Secuenciación | NA | NA | NA | NA | NA | a |
| Pruebas de detección de anticuerpos (Serología) | d | d | c | b | b | d |
| Bioanálisis | NA | NA | NA | NA | NA | NA |

PL = postlarvas; MO = microscopía óptica; ME = microscopía electrónica; PCR = reacción en cadena de la polimerasa; NA = No es aplicable.

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

La vigilancia dirigida debe basarse en un seguimiento periódico de los lugares en los que se crían especies susceptibles. Deben realizarse controles de dichos lugares cuando las temperaturas del agua hayan alcanzado niveles que permiten el desarrollo de la enfermedad (>17°C) y no antes de 3 semanas después de que se hayan alcanzado estas temperaturas. Deben tomarse como muestra peces enfermos o peces que presenten un comportamiento anómalo, y analizarse mediante las pruebas más sensibles de que se disponga (como la PCR). Actualmente no existe ningún método validado que se recomiende para el análisis de poblaciones sanas de peces susceptibles con vistas a la declaración de ausencia del HVK. No obstante, muchos laboratorios utilizan métodos moleculares más sensibles, como la PCR en tiempo real o anidada, para detectar niveles bajos de ADN vírico persistentes de manera fiable. Estas pruebas podrían muy bien ser adecuadas para programas de vigilancia. No se dispone de informes publicados sobre validaciones extensas de las pruebas más sensibles, pero la prueba más utilizada es la PCR en tiempo real Taqman descrita por Gilad (Gilad *et al.*, 2004). Esta prueba está ampliamente reconocida como el método de PCR publicado más sensible del que se dispone para la detección de niveles bajos del HVK. Como alternativa, la detección de anticuerpos podría ser un método útil para averiguar si ha habido exposición previa al HVK en peces aparentemente sanos. En el futuro podrían validarse enzimoanálisis para la detección de anticuerpos contra el HVK, lo cual haría que la utilización de estas técnicas se aceptaran más como método de detección de enfermedades.

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

Debe sospecharse del HVK, en una especie de pez susceptible, si se cumple al menos uno de los siguientes criterios:

- i) Presencia de signos clínicos característicos de la HCK en una población de peces susceptibles.
- ii) Presencia de la histopatología característica en cortes histológicos compatible con la HCK.
- iii) Observación de un ECP característico en cultivos celulares susceptibles sin identificar el agente causal.
- iv) Un solo resultado positivo en una de las pruebas diagnósticas de la Tabla 5.1 clasificadas como a o b.
- v) Transferencia de peces vivos procedentes de un lugar en el que se haya confirmado la presencia del HVK, o se sospeche, debido a la presencia de enfermedad clínica, a lugares donde no se sospeche del HVK.
- vi) Existencia de otras relaciones epidemiológicas con lugares donde se haya confirmado el HVK.
- vii) Detección de anticuerpos contra el HVK.

NOTA: Cuando un lugar se ha definido como sospechoso en base a los criterios v) y vi), solo deben realizarse pruebas de detección del HVK si las temperaturas del agua han alcanzado niveles que permitan el desarrollo de la enfermedad (>17°C). Si las temperaturas del agua son inferiores a los niveles permisivos, puede tomarse una muestra de peces sospechosos vivos, mantenerlos a temperaturas altas (lo ideal son 20 a 24°C) y analizarlos 14 a 21 días después.

7.2. Definición de caso confirmado

Para confirmar el HVK deben cumplirse los siguientes criterios:

- i) Mortalidad, signos clínicos y alteraciones anatomopatológicas compatibles con la enfermedad que causa el HVK (apartado 4.2) y detección del HVK mediante uno o más de los siguientes métodos:
 - a) Detección del HVK mediante PCR por los métodos descritos en el apartado 4.3.1.2.3.
 - b) O BIEN detección del HVK en preparaciones de tejido mediante anticuerpos específicos contra el HVK (como la IFAT en improntas de tejido, según se describe en el apartado 4.3.1.1.2);
 - c) O BIEN aislamiento e identificación del HVK en cultivo celular a partir de al menos una muestra de cualquier pez del lugar, como se describe en el apartado 4.3.1.2.1.
- ii) En ausencia de mortalidad y enfermedad clínica, mediante uno o más de los siguientes métodos:
 - a) Detección y confirmación del HVK mediante PCR por los métodos descritos en el apartado 4.3.1.2.3;
 - b) Resultados positivos en dos de las pruebas diagnósticas de la Tabla 5.1 clasificadas como a o b.

8. Bibliografía

ADKISON M.A., GILAD O. & HEDRICK R.P. (2005). An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to the koi herpesvirus (KHV) in the serum of koi *Cyprinus carpio*. *Fish Pathol.*, **40**, 53–62.

AOKI T., HIRONO I., KUROKAWA K., FUKUDA H., NAHARY R., ELDAR A., DAVISON A.J., WALTZEK T.B., BERCOVIER H. & HEDRICK R.P. (2007). Genome sequences of three koi herpesvirus isolates representing the expanding distribution of an emerging disease threatening koi and common carp worldwide. *J. Virol.*, **81** (10), 5058–5065.

BERCOVIER H., FISHMAN Y., NAHARY R., SINAI S., ZLOTKIN A., EYNGOR M., GILAD O., ELDAR A. & HEDRICK R.P. (2005). Cloning of the koi herpesvirus (KHV) gene encoding thymidine kinase and its use for a highly sensitive PCR based diagnosis. *BMC Microbiol.*, **5**, 1–9.

BERGMANN S.M., KEMPTER J., SADOWSKI J. & FICHTNER D. (2006). First detection, confirmation and isolation of koi herpesvirus (KHV) in cultured common carp (*Cyprinus carpio* L.) in Poland. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **26**, 97–104.

BERGMANN S.M., LUTZE P., SCHUTZE H., FISCHER U., DAUBER M., FICHTNER D. & KEMPTER J. (2010a). Goldfish (*Carassius auratus*) is a susceptible species for koi herpesvirus (KHV) but not for KHV disease. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **30**, 74–84.

- BERGMANN S.M., SCHUTZE H., FISCHER U., FICHTNER D., RIECHARDT, M., MEYER, K., SCHRUDDE D. & KEMPTER J. (2009). Detection of koi herpes-virus (KHV) genome in apparently healthy fish. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **29**, 145-152.
- BERGMANN S.M., SADOWSKI J., KIPIŃSKI M., BARTŁOMIEJCZYK M., FICHTNER D., RIEBE R., LENK M. & KEMPTER J. (2010b). Susceptibility of koi x crucian carp and koi x goldfish hybrids to koi herpesvirus (KHV) and the development of KHV disease (KHVD). *J. Fish Dis*, **33**, 267–272.
- BIGARRÉ L., BAUD M., CABON J., ANTYCHOWICZ J., BERGMANN S.M., ENGELSMA M., POZET F., REICHERT M. & CASTRIC J. (2009). Differentiation between Cyprinid herpesvirus type-3 lineages using duplex PCR. *J. Virol. Methods* **158**, 51-57.
- BRETZINGER A., FISCHER-SCHERL T., OUMOUNA M., HOFFMANN R. & TRUYEN U. (1999). Mass mortalities in koi carp, *Cyprinus carpio*, associated with gill and skin disease. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **19**, 182–185.
- COSTES B., STALIN RAJ V., MICHEL B., FOURNIER G., THIRION M., GILLET L., MAST J., LIEFFRIG F., BREMONT M. & VANDERPLASSCHEN A. (2009). The major portal of entry of koi herpesvirus in *Cyprinus carpio* is the skin. *J. Virol.*, **83**, 2819–2830.
- DISHON A., PERELBERG A., BISHARA-SHIEBAN J., ILOUZE M., DAVIDOVICH M., WERKER S. & KOTLER M. (2005). Detection of carp interstitial nephritis and gill necrosis virus in fish droppings. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 7285–7291.
- DIXON P.F., JOINER C.L., WAY K., REESE R.A., JENEY G. & JENEY Z. (2009). Comparison of the resistance of selected families of common carp, *Cyprinus carpio* (L.), to koi herpesvirus: preliminary study. *J. Fish Dis.*, **32** 1035–1039.
- EL-MATBOULI M. & SOLIMAN H. (2010). Transmission of cyprinid herpesvirus-3 (CyHV-3) from goldfish to naïve common carp by cohabitation. *Res. Vet. Sci.* [published on-line: doi:10.1016/j.rvsc.2010.07.008.
- GARVER K.A., AL-HUSSINEE L., HAWLEY L.M., SCHROEDER T., EDES S., LE PAGE V., CONTADOR E., RUSSELLS., LORD S., STEVENSON R.M.W., SOUTER B., WRIGHT E. & LUMSDEN J.S. (2010). Mass mortality associated with koi herpesvirus in wild common carp in Canada. *J. Wildl. Dis.*, **46**, 1242–1251.
- GILAD O., YUN, S., ADKISON M.A., WAY K., WILLITS N.H., BERCOVIER H. & HEDRICK R.P. (2003). Molecular comparison of isolates of an emerging fish pathogen, koi herpesvirus, and the effect of water temperature on mortality of experimentally infected koi. *J. Gen. Virol.*, **84**, 2661–2667.
- GILAD O., YUN S., ZAGMUTT-VERGARA F.J., LEUTENEGGER C.M., BERCOVIER H. & HEDRICK R.P. (2004). Concentrations of a Koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally infected *Cyprinus carpio koi* as assessed by real-time TaqMan PCR. *Dis. Aquat. Org.*, **60**, 179–187.
- HAENEN O.L.M., WAY K., BERGMANN S.M. & ARIEL E. (2004). The emergence of koi herpesvirus and its significance to European aquaculture. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **24**, 293–307.
- HARAMOTO E., KITAJIMA M., KATAYAMA H. & OHGAKI S. (2007). Detection of koi herpesvirus DNA in river water in Japan. *J. Fish Dis.*, **30**, 59–61.
- HEDRICK R.P., GILAD O., YUN S., SPANGENBERG J.V., MARTY G.D., NORDHAUSEN R.W., KEBUS M.J., BERCOVIER H. & EL DAR A. (2000). A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp. *J. Aquat. Anim. Health*, **12**, 44–57.
- HEDRICK R.P., WALTZEK T.B. & MCDOWELL T.S. (2006). Susceptibility of koi carp, common carp, goldfish and goldfish x common carp hybrids to cyprinid herpesvirus-2 and herpesvirus-3. *J. Aquat. Anim. Health*, **18**, 26–34.
- ILOUZE M., DAVIDOVICH M., DIAMANT A., KOTLER M. & DISHON A. (2011). The outbreak of carp disease caused by CyHV-3 as a model for new emerging viral diseases in aquaculture: a review. *Ecol. Res.*, **26**, 885–892. doi: 10.1007/s11284-010-0694-2
- ITO T., SANO M., KURITA J., YUASA K. & IIDA T (2007). Carp larvae are not susceptible to koi herpesvirus. *Fish Pathol.*, **42**, 107–109.
- KASAI H., MUTO Y. & YOSHIMIZU M. (2005). Virucidal effects of ultraviolet, heat treatment and disinfectants against koi herpesvirus (KHV). *Fish Pathol.*, **40**, 137–138.

KEMPTER J., SADOWSKI J., SCHUTZE H., FISCHER U., DAUBER M., FICHTNER D., PANICZ R. & BERGMANN S.M. (2009). Koi herpesvirus: Do Acipenserid restitution programs pose a threat to carp farms in the disease free zones? *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, **39**, 119–126.

KIPLINSKI M., KEMPTER J., PANICZ R., SADOWSKI J., SCHUTZE H., OHLEMEYER S. & BERGMANN S.M. (2010). Detection of KHV in freshwater mussels and crustaceans from ponds with KHV history in common carp (*Cyprinus carpio*). *Israeli J. Aquaculture (Bamidgeh)*, **62**, 28–37.

MINAMOTO T., HONJO M.N., YAMANAKA H., TANAKA N., ITAYAMA T. & KAWABATA Z. (2010). Detection of cyprinid herpesvirus-3 DNA in lake plankton. *Res. Vet. Sci.*, **90**, 530–532.

MICHEL B., LEROY B., STALIN RAJ V., LIEFFRIG F., MAST J., WATTIEZ R., VANDERPLASSCHEN A.F. & COSTES B. (2010). The genome of cyprinid herpesvirus 3 encodes 40 proteins incorporated in mature virions. *J. Gen. Virol.*, **91**, 452–462.

NOVOTNY L., POKOROVA D., RESCHOVA S., VICENOVA M., AXMANN R., VESELY T. & MIKLER J.R. (2010). First clinically apparent koi herpesvirus infection in the Czech Republic. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **30**, 85–91.

PERELBERG A., SMIRNOV M., HUTORAN M., DIAMANT A., BEJERANO Y. & KOTLER M. (2003). Epidemiological description of a new viral disease afflicting cultured *Cyprinus carpio* in Israel. *Israeli J. Aquaculture*, **55**, 5–12.

PIKARSKY E., RONEN A., ABRAMOWITZ J., LEVAVI-SIVAN B., HUTORAN M., SHAPIRA Y., STEINITZ M., PERELBERG A., SOFFER D. & KOTLER M. (2004). Pathogenesis of acute viral disease induced in fish by carp interstitial nephritis and gill necrosis virus. *J. Virol.*, **78**, 9544–9551.

PIKULKAEW S., MEEYAM T. & BANLUNARA W. (2009). The outbreak of Koi herpesvirus (KHV) in Koi (*Cyprinus carpio*) from Chiang Mai Province, Thailand. *Thai J. Vet. Med.*, **39**, 53–58.

SANO M., ITO T., KURITA J., YANAI T., WATANABE N., MIWA S. & IIDA T. (2004). First detection of koi herpesvirus in cultured common carp *Cyprinus carpio* in Japan. *Fish Pathol.*, **39**, 165–167.

SHAPIRA Y., MAGEN Y., ZAK T., KOTLER M., HULATA G. & LEVAVI-SIVAN B. (2005). Differential resistance to koi herpes virus (KHV)/carp interstitial nephritis and gill necrosis virus (CNGV) among common carp (*Cyprinus carpio* L.) strains and crossbreds. *Aquaculture*, **245**, 1–11.

SHIMIZU T., YOSHIDA N., KASAI H. & YOSHIMIZU M. (2006). Survival of koi herpesvirus (KHV) in environmental water. *Fish Pathol.*, **41**, 153–157.

ST-HILAIRE S., BEEVERS N., JOINER C., HEDRICK R.P. & WAY K. (2009). Antibody response of two populations of common carp, *Cyprinus carpio* L., exposed to koi herpesvirus. *J. Fish Dis.*, **32**, 311–320.

ST-HILAIRE S., BEEVERS N., WAY K., LE DEUFF R.M., MARTIN P. & JOINER C. (2005). Reactivation of koi herpesvirus infections in common carp *Cyprinus carpio*. *Dis. Aquat. Org.*, **67**, 15–23.

SUNARTO A., MCCOLL K. A., CRANE M. ST J., SUMIATI T., HYATT A. D., BARNES A. C. & WALKER P. J. (2011). Isolation and characterization of koi herpesvirus (KHV) from Indonesia: identification of a new genetic lineage. *J. Fish Dis.*, **34**, 87–101.

TAYLOR N., WAY K., DIXON P.F., PEELER E.J., JEFFREY K. & DENHAM K.L. (2010). Koi herpesvirus (KHV): distribution and prospects for control in England and Wales. *J. Fish Dis.*, **33**, 221–230.

UCHII K., MATSUI K., IIDA T. & KAWABATA Z. (2009). Distribution of the introduced cyprinid herpesvirus 3 in a wild population of common carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Fish Dis.*, **32**, 857–864.

WALTZEK T.B., KELLEY G.O., STONE D.M., WAY K., HANSON L., FUKUDA H., HIRONO I., AOKI T., DAVISON A.J. & HEDRICK R.P. (2005). Koi herpesvirus represents a third cyprinid herpesvirus (CyHV-3) in the family *Herpesviridae*. *J. Gen. Virol.*, **86**, 1659–1667.

WALTZEK T.B., KELLEY G.O., ALFARO M.E., KUROBE T., DAVISON A.J. & HEDRICK R.P. (2009). Phylogenetic relationships in the family *Alloherpesviridae*. *Dis. Aquat. Org.*, **84**, 179–194.

YUASA K., ITO T. & SANO M. (2008). Effect of water temperature on mortality and virus shedding in carp experimentally infected with koi herpesvirus. *Fish Pathol.*, **43**, 83–85.

YUASA K., SANO M., KURITA J., ITO T. & IIDA T. (2005). Improvement of a PCR method with the Sph 1–5 primer set for the detection of koi herpesvirus (KHV). *Fish Pathol.*, **40**, 37–39.

*
* *

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