

## VIREMIA PRIMAVERAL DE LA CARPA

---

### 1. Ámbito de aplicación

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

### 2. Información sobre la enfermedad

#### 2.1. Factores del agente

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

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

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

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

##### 2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

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

### 2.1.3. Estabilidad del agente

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

### 2.1.4. Ciclo de vida

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

## 2.2. Factores del hospedador

### 2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

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

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

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

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

### 2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

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

### 2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

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

### 2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

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

### 2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

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

### 2.2.6. Vectores

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

### 2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

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

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

## 2.3. Patrón de la enfermedad

### 2.3.1. Mecanismos de transmisión

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

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

### 2.3.2. Prevalencia

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

### 2.3.3. Distribución geográfica

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

### 2.3.4. Mortalidad y morbilidad

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

### 2.3.5. Factores ambientales

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

## 2.4. Control prevención

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

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

#### 2.4.1. Vacunación

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

#### 2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

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

#### 2.4.3. Inmunoestimulación

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

#### 2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

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

#### 2.4.5. Repoblación con especies resistentes

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

#### 2.4.6. Agentes bloqueantes

Ninguno identificado.

#### 2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

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

#### 2.4.8. Prácticas generales de manejo

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

### 3. Obtención de muestras

#### 3.1. Elección de ejemplares

##### 3.1.1. Peces enfermos

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

##### 3.1.2. Peces que parecen clínicamente normales

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

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

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

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

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

### **3.2. Conservación de las muestras para su envío**

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

### **3.3. Combinación de varias muestras**

Pueden prepararse muestras combinadas de hasta cinco peces cada una.

### **3.4. Órganos y tejidos de elección**

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

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

### **3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados**

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

## **4. Métodos de diagnóstico**

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

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

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

#### 4.1. Métodos de diagnóstico de campo

##### 4.1.1. Signos clínicos

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

##### 4.1.2. Alteraciones del comportamiento

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

#### 4.2. Métodos clínicos

##### 4.2.1. Anatomopatología macroscópica

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

##### 4.2.2. Bioquímica clínica

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

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

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

##### 4.2.3. Anatomopatología microscópica

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

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

#### **4.2.4. Preparaciones húmedas**

No relevante.

#### **4.2.5. Frotis**

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

#### **4.2.6. Cortes fijados**

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

#### **4.2.7. Microscopía electrónica/citopatología**

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

### **4.3. Métodos de detección e identificación del agente**

Véanse los siguientes apartados del Capítulo 2.3.0:

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

#### **4.3.1. Métodos directos de detección**

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

##### **4.3.1.1. Métodos microscópicos**

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

###### *4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas*

No relevante.

###### *4.3.1.1.2. Frotis/improntas de tejidos*

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

###### *4.3.1.1.3. Cortes fijados*

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



#### 4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

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

##### 4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

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

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

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

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

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

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

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

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

##### 4.3.1.2.1.1 Confirmación de la identidad del virus mediante neutralización

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

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

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

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

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

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

#### 4.3.1.2.1.3 Confirmación de la identidad del virus mediante enzimoanálisis (ELISA)

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

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

4.3.1.2.2.1 Prueba de la inmunofluorescencia indirecta

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

4.3.1.2.2.2. Enzimoinmunoanálisis (ELISA)

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

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

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

#### 4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

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

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

- i) Se extrae ARN total de 100 µl de sobrenadante de cultivos celulares que presente ECP o 100 µl de extracto de tejido de pez y se disuelven en 40 µl de agua de grado biología molecular libre de ADNasa y de ARNasa.  
  
Existen varios kits comerciales de extracción del total del ARN que producirán un ARN de calidad para la RT-PCR. Algunos ejemplos son el Trizol ReagentT (RL, Life Technologies, Paisley, Reino Unido), el sistema de aislamiento SV Total RNA (Promega) y Nucleospin® RNA (AB gene).
- ii) Para la síntesis de ADNc, se lleva a cabo una reacción de transcripción inversa a 37°C durante 1 hora en un volumen de 20 µl formado por tampón de reacción RT del virus de la leucemia murina de Moloney (VLM-M) (Tris 50 mM, pH 8,3, KCl 75 mM, DTT 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM) 1x, que contenga dNTP 1mM, 100 pmol de cebador R2 para VVPC, 20 unidades de transcriptasa inversa del VLM-M (Promega, Southampton, Reino Unido) o una transcriptasa inversa equivalente y 1/10 del ARN total que se ha extraído antes.
- iii) La PCR se lleva a cabo en un volumen de reacción de 50 µl de tampón para PCR (KCl 50 mM, Tris/HCl 10 mM, pH 9,0, y Triton X-100 al 0,1%) que contenga MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, cada una de las dNTP a una concentración 200 µM, 50 pmol de cada uno de los cebadores para el VVPC, el R2 y el F1, 1,25 unidades de ADN polimerasa Taq, y 2,5 µl de mezcla de la reacción de la transcripción inversa. La mezcla de la reacción se recubre con aceite mineral y se somete a 35 ciclos de temperatura de: 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 55°C y 1 minuto a 72°C, seguidos de un paso de extensión final de 10 minutos a 72°C. El ADN amplificado (de 714 pb) se analiza mediante electroforesis en gel de agarosa.
- iv) Si el ECP del cultivo no es extenso, es posible que no se genere producto utilizando una sola ronda de amplificación. Para evitar estos problemas, se utiliza una prueba semi-anidada con los siguientes cebadores: 5'-TCT-TGG-AGC-CAA-ATA-GCT-CAR\*-R\*TC-3' (SVCF1) y 5'-CTG-GGG-TTT-CCN\*-CCT-CAA-AGY\*-TGY\*-3' (SVCR4) según Stone *et al.* (2003).
- v) La segunda ronda de PCR se lleva a cabo en un volumen de reacción de 50 µl de tampón para PCR (KCl 50 mM, Tris/HCl 10 mM, pH 9,0, y Triton X-100 al 0,1%) 1x que contenga MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, cada una de las dNTP a una concentración de 200 µM, 50 pmol de cada uno de los cebadores para el VVPC, el R4 y el F1, 1,25 unidades de ADN polimerasa Taq, y 2,5 µl del

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

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

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

#### 4.3.1.2.4. Purificación del agente

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

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

#### 4.3.2. Métodos serológicos

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

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

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

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

**Tabla 5.1. Métodos para la vigilancia dirigida y el diagnóstico**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## **7. Criterios de diagnóstico confirmativo**

### **7.1. Definición de caso sospechoso**

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

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

### **7.2. Definición de caso confirmado**

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

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

## **8. Bibliografía**

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

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

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

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

AHNE W. & HELD C. (1980). Untersuchungen über die viruzide Wirkung von Actomar<sup>®</sup> K<sub>30</sub> auf fischpathogene Viren. *Tierärztl. Umsch.*, **35**, 308–318.

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

\*  
\* \*

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