

SEPTICEMIA HEMORRÁGICA VIRAL

1. Ámbito de aplicación

A efectos de este capítulo, la septicemia hemorrágica viral (SHV) se considera una enfermedad causada por el virus de la septicemia hemorrágica viral (VSHV), sinónimo: virus Egtved).

La SHV es una enfermedad de la trucha arco iris de piscifactoría, el rodaballo de piscifactoría y el falso halibut del Japón, así como de una amplia variedad de especies salvajes tanto de agua dulce como marina (EFSA, 2008; Meyers y Winton, 1995; Skall *et al.*, 2005) causada por el VSHV, un virus que pertenece al género *Novirhabdovirus*, de la familia Rhabdoviridae (Walker *et al.*, 2000). Todas las cepas del virus de la SHV pueden identificarse mediante pruebas inmunológicas utilizando el anticuerpo monoclonal IP5B11 (Lorenzen *et al.*, 1988).

Los peces enfermos pueden presentar signos clínicos inespecíficos en las primeras fases de la infección, como una aparición rápida de mortalidad (que puede alcanzar el 100% de la población en los alevines), letargia, oscurecimiento de la piel, exoftalmia, anemia (branquias pálidas), hemorragias en la base de las aletas, las branquias, los ojos y la piel, y una distensión abdominal debida a edema en la cavidad peritoneal. En el estado crónico de la infección, los peces afectados en general no presentan signos externos. La SHV también puede causar un cuadro nervioso, que se caracteriza por una natación muy anómala, como constantes movimientos fugaces y/o en espiral. Los criterios de diagnóstico confirmativo se resumen en el apartado 7 de este capítulo.

2. Información sobre la enfermedad

2.1. Factores del agente

2.1.1. El agente patógeno, cepas del agente

El agente patógeno de la SHV es un rhabdovirus (VSHV) que pertenece al género *Novirhabdovirus*, de la familia Rhabdoviridae, que también incluye el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (VNHI) y el rhabdovirus Hirame del falso halibut del Japón (*Paralichthys olivaceus*). Los viriones tienen forma de bala (miden unos 70 nm de diámetro y 180 nm de longitud), contienen un genoma de ARN de sentido negativo y monocatenario de unos 11.000 nucleótidos y poseen una envoltura que contiene la glucoproteína de membrana, que es el antígeno de superficie contra el cual se generan los anticuerpos neutralizantes. El genoma codifica seis proteínas: una nucleoproteína, N; una fosfoproteína, P (antes se denominaba M1); una proteína de la matriz, M (antes se denominaba M2); una glucoproteína, G; una proteína no virión, NV, y una polimerasa, L (Walker *et al.*, 2000).

La trucha arco iris, en la que el VSHV puede causar graves brotes de la enfermedad, es un hospedador típico del virus, pero muchas de las demás especies de peces, tanto marinas como de agua dulce, también son susceptibles a la enfermedad. Se han notificado brotes naturales en rodaballo de piscifactoría (Ross *et al.*, 1994; Schlotfeldt *et al.*, 1991) y en falso halibut del Japón tanto de piscifactoría como salvaje (Isshiki *et al.*, 2001; Takano *et al.*, 2000). Se ha observado mortalidad por una infección natural en especies de peces marinos de vida libre a lo largo de la costa del Pacífico de Norteamérica (Meyers *et al.*, 1999; Traxler *et al.*, 1999). Además, se ha observado que ciertas cepas del virus aisladas en arenque del Pacífico son patógenas en el arenque del Pacífico en condiciones experimentales (Kocan *et al.*, 1997). Skall *et al.*, 2005 ha publicado una revisión sobre este tema. Asimismo, se han producido brotes de SHV en especies salvajes de agua dulce de los Grandes Lagos (Elsayed *et al.*, 2006; Grocock *et al.*, 2007; Lumsden *et al.*, 2007).

La gran variedad de hospedadores y las importantes diferencias en cuanto a patogenicidad en cada especie hospedadora pueden causar problemas a los programas de control de la SHV, que se basan principalmente en la protección de la importante industria de producción de la trucha arco iris. El principal problema es decidir si el hallazgo de VSHV marino en peces de vida libre en una zona considerada libre del VSHV debe comportar la retirada de dicha calificación. No obstante, se ha observado en una gran parte de Europa que la SHV en peces de vida libre en el medio marino afecta al estado de ausencia reconocida de SHV solo en unos pocos casos. No obstante, un brote reciente en trucha arco iris de Noruega se debió al genotipo III del VSHV, un genotipo marino hasta entonces no considerado patógeno en la trucha arco iris (Dale *et al.*, 2009), lo cual indica que las cepas marinas también son importantes para la producción de trucha arco iris.

El anticuerpo monoclonal (MAb) IP5B11 (Lorenzen *et al.*, 1988) reacciona con todas las cepas del VSHV de todos los genotipos y serotipos conocidos.

La mayoría de anticuerpos policlonales generados contra el VSHV de Tipo I (DK-F1) presentan reacción cruzada con todas las cepas conocidas del VSHV en la prueba de la inmunofluorescencia indirecta (IFAT) y en los ensayos de inmunoenzimología (ELISA). Sin embargo, en la prueba de la neutralización vírica (VN), el VSHV se puede clasificar en tres subgrupos en función del patrón de neutralización frente a un conjunto de cuatro MABs neutralizantes y un anticuerpo policlonal (Olesen *et al.*, 1993). Así, el VSHV tiene en común varios epítomos antigénicos, aunque los serogrupos no se correlacionan con los genotipos identificados mediante análisis de la secuencia del ácido nucleico. Se han desarrollado MABs que reaccionan específicamente con distintos grupos de VSHV, como por ejemplo cepas del genogrupo IVa y del genogrupo Ib americanas/japonesas (Ito *et al.*, 2010; Ito *et al.*, manuscrito en prep.).

La forma más discriminatoria de tipificar el VSHV es mediante la secuenciación del ácido nucleico. Comparaciones entre las secuencias de varias cepas del VSHV realizadas por distintos laboratorios han puesto de manifiesto que las diferencias genéticas parecen estar más relacionadas con la ubicación geográfica que con el año de aislamiento o con la especie hospedadora (Skall *et al.*, 2005). Se han clasificado cuatro genotipos principales, en base a la secuencia de toda la longitud y/o parte del gen de la nucleoproteína, N (Einer-Jensen *et al.*, 2005; Snow *et al.*, 1999; 2004), de la glucoproteína, G (Einer-Jensen *et al.*, 2004; 2005) y de la proteína no virión, NV (Einer-Jensen *et al.*, 2005):

- Genotipo I: Varios sublinajes (Ia-Ie) que contienen cepas de VSHV europeas de agua dulce, cepas de la zona del Mar Negro y un grupo de cepas marinas del Mar Báltico, los estrechos de Kattegat y de Skagerrak, el Mar del Norte y el Canal de la Mancha. Recientemente se han descubierto cepas del Genotipo Ib tan al norte como a la latitud 70°N, cerca del Cabo Norte, en Noruega (www.fishpathogens.eu, informe nº 2902).
- Genotipo II: Un grupo de cepas del Mar Báltico
- Genotipo III: Cepas de la parte del atlántico del Mar del Norte (desde el Cabo Flemish (López-Vázquez *et al.*, 2006) a la costa noruega (Dale *et al.*, 2009), el Mar del Norte y los estrechos de Skagerrak y de Kattegat.
- Genotipo IV: Cepas de Norteamérica y japonesas/coreanas (dos sublinajes, IVa y IVb [Elsayed *et al.*, 2006]).

El genotipo I se divide en varios sublinajes, y las cepas marinas de peces salvajes se encuentran en el sublinaje Ib. La mejor resolución de sublinajes del genotipo I se obtiene al analizar el gen completo que codifica la glucoproteína, G (Einer-Jensen *et al.*, 2005).

Dado que el genotipo I incluye VSHV aislados de peces marinos salvajes, así como cepas que causan mortalidad en trucha arco iris de Europa continental, se ha sugerido una posible relación entre los tipos de agua dulce y de agua marina (Skall *et al.*, 2005).

Todas las cepas japonesas y otras cepas asiáticas excepto una se clasifican en el genotipo IVa americano. La otra cepa se clasifica en el genotipo IB europeo tradicional (Nishizawa *et al.*, 2002). Se considera que esta cepa se ha introducido procedente de algún lugar de fuera de Japón.

En Norteamérica, se han encontrado al menos dos sublinajes: el genotipo IVa en la costa del Pacífico y el genotipo IVb en la costa del Atlántico y en la zona de los Grandes Lagos.

2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

La supervivencia del VSHV fuera del hospedador depende de las condiciones físico-químicas del medio acuoso (Ahne, 1982) y de la temperatura: el virus sobrevive durante periodos más largos a 4°C que a 20°C (Parry y Dixon, 1997). Se ha documentado que el virus persiste en agua dulce durante 28–35 días a 4°C (Parry y Dixon, 1997) y se ha observado que es infectivo durante 1 año a 4°C en agua dulce filtrada (Hawley y Garver, 2008). Además, puede durar más tiempo si se añaden sustancias orgánicas al agua, como líquidos ováricos o productos hemáticos, como suero bovino. En agua dulce sin tratar a 15°C, el tiempo necesario para una inactivación del 99,9% fue de 13 días, pero en agua marina el virus se inactiva en un plazo de 4 días (Hawley y Garver, 2008). En otros estudios en los que se ha utilizado agua marina a 15°C, la infectividad del virus se ha reducido en un 50% pasadas 10 horas, pero se podía seguir recuperando pasadas 40 horas (Kocan *et al.*, 2001).

La congelación de peces infectados por el VSHV a temperaturas de congelación comerciales y la posterior descongelación no matan completamente el virus, pero reducen su infectividad o título en un

90% o más (Artkush *et al.*, 2006). Estos autores observaron que el virus infeccioso restante se encontraba en el tejido de los peces y no perdido en el agua descongelada procedente del pez congelado.

2.1.3. Estabilidad del agente (métodos eficaces de inactivación)

El VSHV es sensible a varios desinfectantes de uso frecuente. Pueden consultarse las revisiones de Bovo *et al.*, 2005b; Wolf, 1988.

2.2. Factores del hospedador

Los reservorios del VSHV son peces infectados clínicamente, así como portadores subclínicos que pueden ser peces de piscifactoría, asilvestrados o salvajes. Existen varios factores que influyen en la susceptibilidad a la SHV. En la trucha arco iris se ha observado una variabilidad genética de la susceptibilidad (Henryon *et al.*, 2002a; 2002b), y la edad del pez parece tener cierta importancia (cuanto más joven es el pez, más susceptibilidad presenta). En general, los peces de mayor edad que presentan una alta mortalidad debida a la SHV nunca antes han contactado con la enfermedad.

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Durante las dos últimas décadas, se ha aislado VSHV de varias especies de peces marinos y de agua dulce (véanse las Tablas 2.1 y 2.2). (En la Tabla 2.1 se expone una lista de las especies para las cuales existen pruebas científicas concluyentes de susceptibilidad, y en la Tabla 2.2., una lista de las especies para las cuales existen ciertos indicios de susceptibilidad). Es probable que el VSHV sea endémico en poblaciones de peces en grandes zonas del hemisferio norte, de aguas templadas. Hasta ahora, se ha aislado el VSHV de unas 80 especies diferentes de peces de todo el hemisferio norte, incluida Norteamérica, Asia y Europa. Se ha observado que varias especies son susceptibles al VSHV en condiciones experimentales. El número de posibles especies hospedadoras aumenta a medida que aumentan los esfuerzos por llevar a cabo un seguimiento. No obstante, la especie de pez de piscifactoría más susceptible es la trucha arco iris de genotipo la, aunque también se ha observado que la SHV causa mortalidad en rodaballo de piscifactoría y en el falso halibut del Japón. En los peces salvajes, durante los últimos años se han producido varias extinciones en la zona de los Grandes Lagos de EE.UU. y Canadá, que han afectado al menos a 28 especies de peces de agua dulce. Todas las cepas del VSHV de estos brotes pertenecían al genotipo IVb (USDA; Thompson *et al.*, 2011).

Tabla 2.1. Especies de peces para las cuales existen pruebas concluyentes de susceptibilidad (Autoridad Europea en Seguridad Alimentaria [EFSA], 2008)

Especies susceptibles según las normas de la Autoridad Europea en Seguridad Alimentaria (EFSA)			
Orden	Familia	Nombre común	Nombre científico
Salmoniformes (Salmones)	Salmonidae (salmónidos)	Trucha arco iris	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
		Salmón real	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>
		Salmón coho	<i>Oncorhynchus kisutch</i>
		Salmón del Atlántico	<i>Salmo salar</i>
		Trucha marina	<i>Salmo trutta</i>
		Tímalo	<i>Thymallus thymallus</i>
		Lavareto* ¹	<i>Coregonus lavaretus</i>
		Coregonos	<i>Coregonus spp.</i>
		Trucha arco iris x Coho* ¹	<i>O. mykiss</i> x <i>O. kisutch</i>
		Trucha arco iris x salvelino* ¹	<i>O. mykiss</i> x <i>S. fontinalis triploid</i>
Trucha arco iris x Trucha alpina* ¹	<i>O. mykiss</i> x <i>S. alpinus triploid</i>		
Esociformes	Esocidae	Lucio de aletas rojas	<i>Esox masquinongy</i>
		Lucio	<i>Esox lucius</i>
Clupeiformes	Clupeidae	Arenque del Atlántico	<i>Clupea harengus</i>
		Arenque del Pacífico	<i>Clupea pallasii</i>
		Sardina	<i>Sardinops sagax</i>
		Espadín	<i>Sprattus sprattus</i>

Especies susceptibles según las normas de la Autoridad Europea en Seguridad Alimentaria (EFSA)			
Orden	Familia	Nombre común	Nombre científico
Gadiformes (bacalao)	Gadidae	Bacalao del Atlántico	<i>Gadus morhua</i>
		Capellán	<i>Trisopterus minutus</i>
		Plegonero	<i>Merlangius merlangus</i>
		Bacaladilla	<i>Micromesistius poutassou</i>
		Faneca noruega	<i>Trisopterus esmarkii</i>
		Colín de Alaska	<i>Theragra chalcogramma</i>
	Lotidae (merluzas y lotas)	-	<i>Enchelyopus cimbrius</i>
		Lota	<i>Lota lota</i>
Merlucciidae	Merluza del Pacífico Norte	<i>Merluccius productus</i>	
Pleuronectiformes (peces planos)	Pleuronectidae	Lenguadina	<i>Limanda limanda</i>
		Platija europea	<i>Platichthys flesus</i>
		Solla europea	<i>Pleuronectes platessa</i>
		Fletán negro	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>
		Halibut* ¹	<i>Hippoglossus hippoglossus</i> ²
	Scophthalmidae	Turbot	<i>Scophthalmus maximus</i>
Paralichthyidae	Falso halibut del Japón	<i>Paralichthys olivaceus</i>	
Osmeriformes	Argentidae	Argentina	<i>Argentina sphyraena</i>
	Osmeridae (eperlanos)	Eperlano del Pacífico	<i>Hypomesus pretiosus</i>
Perciformes (con forma de perca)	Ammodytidae	-	<i>Ammodytes hexapterus</i>
		Lanzones	<i>Ammodytes</i> spp.
		Lanzón del Pacífico	<i>Ammodytes personatus</i>
	Gobiidae	-	<i>Pomatoschistus minutus</i>
		Gobio pintado	<i>Neogobius melanostomus</i>
	Embiotocidae	-	<i>Cymatogaster aggregata</i>
	Sciaenidae	-	<i>Aplodinotus grunniens</i>
	Scombridae	Estornino	<i>Scomber japonicus</i>
	Percidae (percas)	Perca canadiense	<i>Perca flavescens</i> ³
Moronidae (lubinas)	Lubina* ¹	<i>Dicentrarchus labrax</i>	
Gasterosteiformes		Espinosillo	<i>Gasterosteus aculeatus</i>
Cypriniformes (carpas)	Cyprinidae (chispas o carpas)	Piscardo* ¹	<i>Pimephales promelas</i> ⁴
Petromyzontiformes (lamprea)	Petromyzontidae (lamprea)	Lamprea de río	<i>Lampetra fluviatilis</i> ⁵

*¹Prueba de infección por inmersión; ± ²Skall *et al.*, 2005; ³Kane-Sutton *et al.*, 2010; ⁴Al-Hussinee *et al.*, 2010; ⁵Gadd *et al.*, 2010.

Table 2.2. Especies de peces para las cuales existe algún indicio de susceptibilidad (EFSA, 2008)

Orden	Familia	Nombre común	Nombre científico
Salmoniformes (Salmones)	Salmonidae (salmónidos)	Keta* ³	<i>Oncorhynchus keta</i>
		Salmón rojo* ³	<i>Oncorhynchus nerka</i>
		Trucha lacustre* ^{1, 2}	<i>Salvelinus namaycush</i> ⁴
		Trucha de arroyo* ^{1, 2}	<i>Salvelinus fontinalis</i> ⁴
		Coregono de lago	<i>Coregonus clupeaformis</i>

Orden	Familia	Nombre común	Nombre científico
		_*2	<i>Oncorhynchus aguabonita</i>
		Trucha alpina*1	<i>Salvelinus alpinus</i>
		_*2	<i>Salvelinus namaycush</i> × <i>Salvelinus fontinalis</i> ⁴
		*1	<i>O. mykiss</i> × <i>S. namaycush</i>
		*1	<i>O. mykiss</i> × <i>O. kisutch</i> triploid
Clupeiformes	Clupeidae	Sábalo molleja	<i>Dorosoma cepedianum</i>
Gadiformes (bacalao)	Gadidae	Bacalao del Pacífico	<i>Gadus macrocephalus</i>
		Eglefino	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>
		-	<i>Microgadus proximus</i>
	Lotidae (merluzas y lotas)	Lota	<i>Lota lota</i>
Siluriformes (bagres)	Ictaluridae (bagres de agua dulce de Norteamérica)	Bagre pardo	<i>Ictalurus nebulosus</i>
		Bagre de canal	<i>Ictalurus punctatus</i>
Osmeriformes	Osmeridae (eperlanos)	Eulacón	<i>Thaleichthys pacificus</i>
Perciformes (con forma de perca)	Centrarchidae (peces sol)	Perca atruchada	<i>Micropterus salmoides</i>
		Perca atruchada*2	<i>Micropterus salmoides</i> ⁴
		Perca americana de boca pequeña	<i>Micropterus dolomieu</i>
		-	<i>Lepomis macrochirus</i>
		Perca sol	<i>Lepomis gibbosus</i>
		Perca plateada	<i>Pomoxis nigromaculatus</i>
		-	<i>Ambloplites rupestris</i>
	Percidae (percas)	Lucioperca americana	<i>Sander vitreus</i>
		Perca	<i>Perca fluviatilis</i>
	Moronidae (lubinas de aguas templadas)	-	<i>Morone chrysops</i>
		Lubina estriada	<i>Morone saxatilis</i>
		Lubina blanca	<i>Morone americana</i>
		_*2	<i>Acanthopagrus schlegelii</i>
		Dorada del Japón*2	<i>Pagrus major</i>
		Sparidae	Dorada
	Serranidae	Mero de pintas rojas*2	<i>Epinephelus akaara</i>
	Carangidae	Medregal del Japón*2	<i>Seriola quinqueradiata</i>
	Sciaenidae	_*3	<i>Larimichthys polyactis</i> ⁵
	Sparidae	_*3	<i>Dentex tumifrons</i> ⁵
	Trichiuridae	Pez sable*3	<i>Trichiurus lepturus</i> ⁵
Stromateidae	-	<i>Pampus argentus</i> ⁵	
Scorpaeniformes (rascacios y platicefálicos)	Anoplopomatidae (bacalao negro)	Bacalao negro	<i>Anoplopoma fimbria</i>
	Sebastidae (gallineta, trama y <i>Sebastes</i> spp.)	-	<i>Sebastes inermis</i>
		_*2	<i>Sebastes schlegelii</i>
	Liparidae	_*3	<i>Liparis tessellatus</i> ⁵
	Scorpaenidae	_*3	<i>Scorpaena izensis</i> ⁵
Anguilliformes	Anguillidae	Anguila	<i>Anguilla anguilla</i>
		Anguila americana*3	<i>Anguilla rostrata</i> ⁶

Orden	Familia	Nombre común	Nombre científico
Cyprinodontiformes	Fundulidae	Fúndulo	<i>Fundulus heteroclitus</i>
Gasterosteiformes	Aulorhynchidae	-	<i>Aulorhynchus flavidus</i>
Cypriniformes (carpas)	Catostomidae	-	<i>Moxostoma anisurum</i>
		-	<i>Moxostoma macrolepidotum</i>
	Cyprinidae (chispas o carpas)	-	<i>Barbus graellsii</i>
		-	<i>Pimephales notatus</i>
		-	<i>Notropis atherinoides</i>
		-	<i>Notropis hudsonius</i>
		Boga de río	<i>Chondrostoma polylepis</i>
		Pez cebra*2	<i>Danio rerio</i>
Pez rojo*1	<i>Carassius auratus</i>		
Percopsiformes (<i>Percopsis omiscomaycus</i> , <i>Aphredoderus sayanus</i> y peces de cueva)	Percopsidae (<i>Percopsis omiscomaycus</i>)	-	<i>Percopsis omiscomaycus</i>
Pleuronectiformes (peces planos)	Soleidae	-	<i>Solea senegalensis</i>
		Lenguado senegalés*1,2	<i>Solea senegalensis</i> ⁷
	Pleuronectidae	_*2	<i>Pleuronectes yokohamae</i>
		-	<i>Parophrys vetula</i>
_*3	<i>Glyptocephalus steller</i> ⁵		
Mugiliformes	Mugilidae	Mugil	<i>Mugil cephalus</i> ⁴
		Mugil*3	<i>Mugil cephalus</i> ⁵
Ophidiiformes	Ophidiidae	_*3	<i>Hoplobrotula armata</i> ⁵
Carcharhiniformes	Scyliorhinidae	_*3	<i>Scyliorhinus torozame</i> ⁵
No peces		-	<i>Myzobdella lugubris</i> ⁸
No peces		-	<i>Diporeia</i> spp. ⁹

*1Prueba de infección por inmersión; *2Prueba de infección por inyección IP; *3solo reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR); ⁴Kim y Faisal, 2010; ⁵Lee *et al.*, 2007; ⁶Al-Hussinee *et al.*, 2011; ⁷López-Vázquez *et al.*, 2011; ⁸Faisal y Schulz, 2009; ⁹Faisal y Winters, 2011.

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

La infección por el VSHV puede causar enfermedad y mortalidad en todas las fases de vida de los peces susceptibles. La infección puede dar lugar al desarrollo de una inmunidad protectora en zonas endémicas; por tanto, la enfermedad es más abundante en poblaciones de peces jóvenes, previamente no infectados. No se conocen casos de infección de huevos de peces con el VSHV.

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

En estudios de peces salvajes marinos, se ha aislado el VSHV de la mayoría de segmentos de edad. Sin embargo, se han analizado pocos alevines, ya normalmente no se capturan durante los estudios. La mayor prevalencia del virus se ha observado en peces que vivían formando bancos, como el arenque, el espadín, la faneca noruega, etc. (Skall *et al.*, 2005).

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

En las fases sépticas de la enfermedad, el virus es abundante en todos los tejidos, incluidos piel y músculos. Los órganos diana son el riñón, el corazón y el bazo, puesto que estos son los lugares donde el virus es más abundante. En las fases crónicas, los títulos del virus pueden llegar a ser altos en el encéfalo (Smail y Snow, 2011; Wolf, 1988).

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

Algunos supervivientes de epizootias se convertirán en portadores del virus durante largos periodos de tiempo.

2.2.6. Vectores

Dado el gran número de especies susceptibles, puede suponerse que el virus es capaz de multiplicarse en una variedad suficientemente amplia de hospedadores como para no precisar vectores. No obstante, en muchas especies de peces nunca se han observado signos clínicos en ejemplares infectados.

Se ha aislado el VSHV de la sanguijuela, *Myzobdella lugubris*, y de *Diporeia* spp, en los Grandes Lagos, en Norteamérica. Por el momento no se sabe si la sanguijuela y *Diporeia* tipo camarón pueden transmitir el VSHV entre peces (Faisal y Schulz, 2009; Faisal y Winters, 2011).

El VSHV se puede transmitir por aves piscívoras, que actúan como vectores mecánicos (Olesen y Vestergård Jørgensen, 1982; Peters y Neukirch, 1986).

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

Véanse la Tablas 2.1 y 2.2, donde se indican las especies de las que se ha aislado el VSHV. Actualmente, no se dispone de suficientes datos científicos como para incluir todas las especies de los Grandes Lagos en esta lista de las consideradas susceptibles al VSHV (EFSA, 2008).

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mecanismos de transmisión

Los conocimientos sobre el mecanismo de transmisión del virus proceden principalmente de estudios de cepas del VSHV aisladas en truchas arco iris de Europa, en las cuales se ha observado una transmisión horizontal por contacto con otros peces o con agua contaminada, etc. El virus se excreta de peces infectados por la orina (Wolf, 1988) y líquidos reproductivos. La transmisión tiene lugar fácilmente en el intervalo de entre 1 y 15°C, pero puede producirse incluso a 20°C. El periodo de incubación depende de la temperatura y de la dosis infectiva, y dura 5 a 12 días a temperaturas más altas.

Durante e inmediatamente después de un brotes, el virus se puede aislar fácilmente en cultivo celular (Wolf, 1988). El riñón, el corazón y el bazo son los tejidos que dan los títulos víricos más altos.

En peces portadores (clínicamente sanos), la detección del VSHV es más problemática (Skall *et al.*, 2005). El VSHV crece en varias líneas celulares de peces, entre las cuales BF-2 es la más sensible a la infección por cepas europeas de agua dulce (Skall *et al.*, 2005). Las siguientes líneas celulares, en orden decreciente de susceptibilidad, son FHM, RTG-2 y EPC (Lorenzen *et al.*, 1999), pero otras líneas celulares de peces, como CHSE-214 y SSN-1, también son susceptibles. La susceptibilidad de una línea celular a la infección dependerá de varios parámetros, como el linaje de la línea celular y diferencias en la cepa vírica; por tanto, parece ser que la línea celular EPC podría ser más susceptible a las cepas del genotipo IV del VSHV que a las cepas de tipo I, II o III (Skall *et al.*, 2005).

El estado de portador del VSHV en especies de peces de agua dulce está bien estudiado (Enzmann y Konrad, 1985; Jørgensen, 1982). El estado virológico de estos portadores dependerá de varios parámetros, como el tiempo que haya transcurrido desde la exposición inicial y la proximidad geográfica a salidas de agua procedentes de piscifactorías de peces. Desde el descubrimiento de cepas del VSHV en especies marinas, se han llevado a cabo muchos estudios en los que se ha realizado un exhaustivo muestreo de una gran variedad de especies de peces de aguas costeras de la Europa continental (Skall *et al.*, 2005), del Reino Unido (Skall *et al.*, 2005), de Norteamérica (Hedrick *et al.*, 2003) y de Asia (Kim y Park, 2004; Takano *et al.*, 2000). En estos estudios, se ha comprobado si las muestras contenían virus inoculando líneas celulares de peces. En algunos, se han combinado varias muestras y, por tanto, la determinación de la prevalencia exacta ha sido difícil. No obstante, en base al aislamiento del virus en cultivo celular y fuera cual fuera la especie de pez estudiada, la prevalencia del VSHV en especies marinas de peces muestreadas en estos estudios se ha encontrado en el intervalo de entre el 0,0% y el 16,7% (intervalo de confianza del 95%, 8,7–27,5%) (Skall *et al.*, 2005).

La enfermedad en general tiene lugar a temperaturas de entre 4°C y 14°C. A temperaturas del agua de entre 15°C y 18°C, la enfermedad en general tiene un curso rápido y poca mortalidad acumulada.

Las temperaturas del agua bajas (1-5°C) en general dan lugar a un largo curso de la enfermedad, con baja mortalidad diaria pero con una alta mortalidad acumulada. Surgen brotes de la SHV en cualquier

estación del año, pero son más frecuentes en primavera, cuando las temperaturas del agua están aumentando o fluctuando. En las revisiones de Wolf (1988) y de Smail y Snow (2011) se pueden consultar más detalles sobre este trastorno.

La transmisión tiene lugar principalmente de forma horizontal por el agua, debido a la excreción del virus con la orina (Smail y Snow, 2011). En estudios en los que se ha utilizado el diagnóstico por imagen mediante bioluminiscencia de truchas vivas infectadas con VNHI virulento recombinante, un virus muy similar al VSHV, portador de un gen indicador, ha ilustrado de forma muy clara que la replicación del virus sobre la piel del pez era muy alta (Bremont, 2005). Esto todavía no se ha estudiado en peces infectados por la SHV, pero la excreción directa del virus de la piel podría constituir una fuente de transmisión del virus (Smail y Snow, 2011).

No se dispone de indicios ni pruebas de una verdadera transmisión vertical del VSHV (Bovo *et al.*, 2005a).

2.3.2. Prevalencia

Hasta finales de los años 1980, la SHV se consideró que se restringía a la trucha arco iris de piscifactorías de la Europa continental, con el aislamiento ocasional en algunas otras especies de peces de agua dulce (como la trucha marina, el lucio [Meier y Jørgensen, 1980; Schlotfeldt y Ahne, 1988]), considerándose libres de SHV Escandinavia (excepto Dinamarca), Gran Bretaña e Irlanda. A partir de la detección y aislamiento del VSHV del salmón del Pacífico mar adentro frente a la costa norteamericana del Pacífico a finales de los años 1980, estudios posteriores han puesto de manifiesto que el VSHV tiene lugar en muchas especies de peces de piscifactoría y salvajes a lo largo de la costa norteamericana tanto del Pacífico como del Atlántico (Skall *et al.*, 2005), en la zona de los Grandes Lagos de Norteamérica (Thompson *et al.*, 2011), en mares del Reino Unido (Skall *et al.*, 2005), en el Mar Báltico, en los estrechos de Skagerrak y Kattegat (Skall *et al.*, 2005), en las aguas de Japón (Skall *et al.*, 2005), y en la zona del Mar Negro, con un genotipo le claramente diferenciado (Nishizawa *et al.*, 2006).

2.3.3. Distribución geográfica

Durante las dos últimas décadas, el VSHV se ha aislado de peces salvajes de toda la zona templada del hemisferio norte, tanto en aguas dulces como marinas (Skall *et al.*, 2005). No obstante, solo en Europa se han observado brotes de la SHV en trucha arco iris de piscifactoría, donde se sigue considerando una de las enfermedades víricas más graves en peces de acuicultura. En América, la SHV causa mortalidad principalmente en peces salvajes (Meyers y Winton, 1995; Skall *et al.*, 2005; USDA, 2007). En Asia, ha habido informes de brotes clínicos en el falso halibut del Japón de piscifactoría, así como aislamientos en especies de peces salvajes (Lee *et al.*, 2007; Skall *et al.*, 2005).

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

La mortalidad varía en función de muchas condiciones ambientales y fisiológicas, la mayoría de las cuales no están del todo determinadas. Esta enfermedad, en general es de aguas frescas o frías, y la máxima mortalidad tiene lugar a los 9-12°C. Los alevines pequeños de trucha arco iris (0,0-3 g) son más susceptibles al genotipo Ia, en los que causa mortalidades cercanas al 100%, pero todos los tamaños de la trucha arco iris pueden resultar afectados, con mortalidades que oscilan entre el 5% y el 90%. En pruebas de infección por inmersión también se ha inducido una mortalidad de hasta el 100% en arenques del Pacífico cuando se han infectado con el genotipo IVa (Skall *et al.*, 2005).

2.3.5. Factores ambientales

Se han notificado brotes de la SHV en ambientes tanto de agua dulce como de agua marina con salinidades de hasta 36 partes por mil (ppmil) y a temperaturas de entre los 2°C y los 20°C. La mayoría de brotes de la enfermedad se observan en primavera, cuando las temperaturas fluctúan.

En pruebas de laboratorio se ha observado que el intervalo de temperaturas del genotipo IVb del VSHV parece ser el mismo que el del genotipo I, con un óptimo en los 9-12°C y un límite superior en los 18-20°C (Goodwin y Merry, 2011).

2.4. Control y prevención

En ausencia de tratamiento antivíricos, los métodos de control de la SHV actualmente se basan en programas oficiales de vigilancia sanitaria, junto con medidas de seguimiento. Ciertas prácticas que han funcionado para reducir el número de piscifactorías infectadas en una zona endémica y para prevenir la reinfección, como el sacrificio sanitario y el descanso de las instalaciones, han sido revisadas previamente (Olesen, 1998; Olesen y Korsholm, 1997). Recientemente se han podido erradicar con éxito los brotes de enfermedad aguda en el Reino Unido en 2006 (Stone *et al.*, 2008) y en Noruega en 2007 (Dale *et al.*, 2009), puesto que no se han

observado otros brotes desde entonces, y Dinamarca, que tenía más de 400 piscifactorías infectadas de forma endémica, se libró por sí sola de la SHV tras 45 años de vigilancia y control, sufriendo el último brote de enfermedad en febrero de 2009 (Manuscrito en preparación).

2.4.1. Vacunación

Aunque durante más de tres décadas se ha investigado para desarrollar una vacuna contra la SHV, todavía no se dispone de ninguna. Ha habido varias vacunas candidatas, como vacunas inactivadas, vacunas vivas atenuadas, una vacuna recombinante en sistemas de expresión procariotas y eucariotas, y una vacuna basada en el ADN. Sin embargo, se ha observado que esta última es muy prometedora para inducir una buena protección frente a la SHV. Lorenzen y LaPatra, 2005 han publicado una revisión al respecto.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

Actualmente no se dispone de ninguno.

2.4.3. Inmunoestimulación

Para potenciar la protección frente a la SHV se han evaluado varios inmunoestimulantes, como beta-glucanos derivados de levaduras, péptidos derivados de IL-1 β y probióticos (Peddie *et al.*, 2003). Varios autores han observado efectos positivos, pero no se dispone de ningún inmunoestimulante dirigido específicamente a potenciar la resistencia frente a la SHV.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

Se ha detectado una variación genética en la trucha arco iris en cuanto a la resistencia a la SHV (Dorson *et al.*, 1995; Henryon *et al.*, 2002a, b). En un estudio realizado por Henryon *et al.* (2005), la heredabilidad de la resistencia a la SHV fue de 0,11 medida por el tiempo restante hasta la muerte del animal, en una escala de tiempo logarítmica. Por tanto, se ha observado que hay un buen potencial de seleccionar genéticamente a favor de la resistencia. No obstante, todavía no se comercializa ninguna cepa de trucha arco iris resistente.

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

En algunas piscifactorías de Dinamarca, con mortalidades altas recurrentes causadas por la SHV, se ha intentado la repoblación con especies más resistentes, como la trucha marina (*Salmo trutta*) o la lucioperca (*Sander lucioperca*) (H. Korsholm, comunicación personal).

2.4.6. Desinfección de huevos y larvas

La desinfección de huevos embrionados y de huevos verdes es una medida preventiva eficiente y rentable de detener la propagación de la enfermedad (se indican los procedimientos detallados en Bovo *et al.*, 2005b).

2.4.8. Prácticas generales de manejo

Una mala calidad del agua, una alta densidad de peces, una alta frecuencia de alimentación, otras enfermedades, como la enfermedad renal proliferativa (ERP), la ictiofiriasis, la enfermedad renal bacteriana (ERB), etc. pueden influir en el curso y la gravedad de la enfermedad. En general, un aumento de la temperatura, una restricción alimentaria, una reducción de la densidad de peces y una restricción de la manipulación pueden reducir la mortalidad. En piscifactorías infectadas de forma endémica, normalmente se repuebla con alevines nunca antes expuestos a la enfermedad a temperaturas del agua tan altas como sea posible.

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

Deben realizarse inspecciones clínicas durante un periodo en que la temperatura del agua sea inferior a los 14°C o siempre que la temperatura del agua pueda alcanzar su mínimo anual. En todas las unidades de producción (estanques, tanques, jaulas de red, etc.) debe comprobarse si hay peces muertos, débiles o que presenten un comportamiento anómalo, y debe prestarse especial atención a la zona de salida de agua, donde tienden a acumularse peces débiles debido a la corriente de agua.

Los peces se elegirán en función de lo siguiente:

- En el caso del genotipo I: en piscifactorías con salmónidos, si hay truchas arco iris, solo se podrán escoger ejemplares de esta especie. Si no hay truchas arco iris, la muestra debe obtenerse de peces de todas las demás especies susceptibles al VSHV presentes, que se indican en en las Tablas 2.1 y 2.2. No obstante, todas las especies deben estar representadas de forma proporcional en la muestra. En el caso de otros genotipos: deben escogerse especies de susceptibilidad conocida al genotipo en cuestión. Deben escogerse ejemplares de especies susceptibles de forma proporcional, o siguiendo criterios de selección dirigida basados en el riesgo, de lotes o poblaciones con antecedentes de mortalidades anómalas o posibles episodios de exposición (por ejemplo, por agua superficial no tratada, recogida de peces salvajes o repoblación con poblaciones cuyo riesgo se desconozca).
- Si para la producción de peces se utiliza más de un origen de agua, en la muestra deben incluirse peces de todos los orígenes.
- Si hay peces débiles, con comportamientos anómalos o que acaban de morir (no descompuestos), estos deben escogerse. Si no hay este tipo de peces, los peces deben escogerse de entre los que presentan un comportamiento normal y parecen sanos, de tal forma que todas las partes de la piscifactoría, así como todos los segmentos de edad estén representados de forma proporcional en la muestra.

3.2. Conservación de las muestras para su envío

Antes ser enviados o transferidos al laboratorio, partes de los órganos que tienen que examinarse deben extraerse del pez con instrumental de disección estéril e introducirse en tubos de plástico estériles que contengan medio de transporte, es decir, medio de cultivo celular con suero fetal bovino (FBS) al 10% y antibióticos. Se recomienda la combinación de 200 Unidades Internacionales (UI) de penicilina, 200 µg de estreptomina y 200 µg de kanamicina por ml, aunque también pueden utilizarse otros antibióticos cuya eficacia se haya demostrado.

3.3. Combinación de varias muestras

Pueden combinarse en un solo tubo estéril líquido ovárico o trozos de órganos de un máximo de diez peces; dichos tubos deben contener al menos 4 ml de medio de transporte, y cada uno representará una muestra combinada. El tejido de cada muestra debe pesar al menos 0,5 g. Los tubos deben situarse en recipientes (por ejemplo, cajas de poliestireno de pared gruesa) todos juntos con suficiente hielo o “bloques de congelador” para garantizar la refrigeración de las muestras durante el transporte hasta el laboratorio. Debe evitarse la congelación. La temperatura de una muestra durante el transporte nunca debe superar los 10°C, y cuando la caja llegue a su destino debe seguir quedando hielo en su interior, o bien uno o más bloques de congelador debe estar todavía parcial o totalmente congelados. El examen virológico debe empezar cuanto antes y no después de 48 horas tras la obtención de las muestras. En casos excepcionales, el examen virológico puede empezar como muy tarde a las 72 horas de la obtención del material, siempre que las muestras a examinar estén protegidas por medio de transporte y que durante el transporte se hayan cumplido los requisitos de temperatura.

Se pueden enviar peces enteros al laboratorio si pueden cumplirse los requisitos de temperatura durante el transporte. Los peces enteros pueden envolverse en papel con capacidad absorben y tienen que enviarse en una bolsa de plástico, refrigerados como se ha explicado anteriormente. También pueden enviarse peces vivos. Todo el embalaje y etiquetado tienen que realizarse de acuerdo con las normas de transporte nacional e internacional, según corresponda.

3.4. Órganos y tejidos de elección

El material tisular óptimo para el examen es el bazo, el riñón anterior y, o bien el corazón o bien el encéfalo. En algunos casos, tiene que examinarse el líquido ovárico y el esperma.

En el caso de alevines pequeños, pueden trocearse finamente peces enteros de menos de 4 cm de largo con tijeras o una hoja de bisturí estériles tras retirar la parte del cuerpo situada por detrás del orificio de salida intestinal. Si una muestra está formada por un pez entero cuya longitud corporal se sitúe entre los 4 y los 6 cm, deberán obtenerse las vísceras, incluido el riñón.

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

El VSHV es muy sensible a la degradación enzimática, y por tanto debe evitarse tomar tejidos con altas actividades enzimáticas, como vísceras o hígado.

4. Métodos de diagnóstico

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

La aparición de los siguientes signos debe comportar un examen clínico detenido para averiguar si el pez presenta SHV: una aparición rápida de mortalidad, letargia, oscurecimiento de la piel, exoftalmia, anemia (palidez de branquias), hemorragias en la base de las aletas, las branquias, los ojos y la piel, natación anómala, por ejemplo con movimientos fugaces y en espiral, y distensión abdominal debida a edema en la cavidad peritoneal.

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

La forma nerviosa de la enfermedad se caracteriza por una natación muy anómala, con movimientos fugaces y en espiral constantes, debido al tropismo del virus por el encéfalo. A diferencia de los peces con septicemia bacteriana, los peces infectados por el SHV tenderán a no escapar de las redes.

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

La anatomopatología macroscópica incluye hemorragias petequiales generalizadas en la piel, el tejido muscular (sobre todo en músculos dorsales) y órganos internos. Es importante comprobar si en la musculatura dorsal hay sangrado petequial, que es un signo muy frecuente de infección por el VSHV. El riñón es de color rojo oscuro en la fase aguda, pero puede presentar una intensa necrosis en los peces moribundos. El bazo está moderadamente hinchado. El hígado a menudo está pálido y moteado. El tracto gastrointestinal, sobre todo el intestino caudal, está pálido y no contiene alimento.

4.2.2. Bioquímica clínica

El nivel de glóbulos rojos es muy bajo en la fase aguda de la SHV y la sangre es de color rojo claro y transparente.

4.2.3. Anatomopatología microscópica

La inmunohistoquímica pone de manifiesto células endoteliales positivas al VSHV, principalmente en el sistema vascular (Evensen *et al.*, 1994). El riñón, el hígado y el bazo presentan necrosis focal extensa y degeneración (vacuolas citoplásmicas, picnosis, cariólisis e invasión linfocitaria). Aunque el músculo esquelético no parece un lugar de infección, pueden acumularse eritrocitos en los haces y fibras del músculo esquelético sin causar daños al músculo en sí.

4.2.4. Microscopía electrónica/citopatología

El VSHV es un rhabdovirus típico en forma de bala, de 60-75 nm de diámetro y 180-240 nm de longitud. Anteriormente se han descritos aspectos ultraestructurales del desarrollo de la infección vírica en cultivo celular (Baroni *et al.*, 1982).

4.3. Métodos de detección e identificación del agente

El método estándar de vigilancia (para detectar peces portadores) de la SHV se basa en métodos directos, es decir, el aislamiento del VSHV en cultivo celular seguido de la identificación con métodos basados en anticuerpos (IFAT, ELISA) o métodos basados en el ácido nucleico (como la reacción en cadena la polimerasa con transcripción inversa [RT-PCR]). Dado que la demostración inmunológica directa del antígeno del VSHV en tejidos de peces infectados (por la prueba de unión a anticuerpos) tiene baja sensibilidad, solo puede utilizarse cuando se sospecha de infección por SHV (en base a los signos clínicos, a datos epidemiológicos y a la histopatología). Se ha observado que una RT-PCR en tiempo real recientemente publicada validada para la identificación directa del genoma del VSHV en tejido de peces tiene valores de sensibilidad y de especificidad muy similares al cultivo celular seguido de la identificación (Garver *et al.*, 2011; Jonstrup *et al.*, 2012). Esta técnica podría llegar a utilizarse en programas de vigilancia directa destinados a conseguir el reconocimiento de ausencia de SHV si, en el futuro, los Países Miembros de la OIE aprueban su utilización para este fin.

4.3.1. Métodos directos de detección

4.3.1.1. Métodos microscópicos

El riñón y el hígado son las principales dianas, y el examen de cortes histológicos de peces enfermos pone de manifiesto una degeneración y necrosis de tejidos hematopoyéticos en el riñón (y el bazo) con degeneración focal y necrosis hepática. En cortes de músculo esquelético se pueden observar muchos focos de glóbulos rojos, mientras que las fibras musculares permanecen inalteradas.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

El aislamiento del virus de la SHV en cultivos de varias líneas celulares de peces establecidas está bien documentado (Lorenzen *et al.*, 1999; Olesen y Vestergård Jørgensen, 1992). Aunque la inoculación de líneas celulares de peces con tejidos de peces procesados para el aislamiento del virus se considera el método de referencia en programas de vigilancia (para detectar peces portadores) en cuanto a sensibilidad, la sensibilidad exacta de este procedimiento se desconoce. El tejido de peces infectados más adecuado para el examen virológico se escogerá en función del tamaño del pez. Así, en los alevines enteros (de menos de 4 cm de longitud), las vísceras, incluido el riñón (4 cm < longitud corporal < 6 cm) o, en el caso de peces más grandes, el riñón, el bazo, el corazón y el encéfalo, y el líquido ovárico de reproductores en el momento del desovado, son muestras adecuadas.

Se recomienda la línea celular de pez BF-2. Como alternativa, pueden utilizarse las líneas celulares EPC o FHM (Lorenzen *et al.*, 1999; Olesen y Vestergård Jørgensen, 1992; Departamento de Interior de EE.UU., 2007). En el caso de los genotipos I, II y III, en general la línea EPC es menos susceptible que la BF-2 (Lorenzen *et al.*, 1999; Olesen y Vestergård Jørgensen, 1992). Sin embargo, la línea celular EPC muy sensible a varias cepas del genotipo IV (Departamento de Interior de EE.UU., 207).

La detección del virus por la observación de efecto citopático (ECP) en el cultivo celular va seguida de una identificación del virus mediante pruebas basadas en anticuerpo o bien basadas en el ácido nucleico. Cualquier prueba basada en anticuerpos requeriría utilizar anticuerpos validados para ser sensible y específica (Ariel y Olesen, 2001). El uso de MAb IP5B11 (Lorenzen *et al.*, 1988) se recomienda como reactivo de referencia, por que todas las cepas de VSHV aisladas hasta ahora reaccionan con este MAb.

4.3.1.2.1.1. Extracción del virus

En el laboratorio, el tejido de los tubos debe estar totalmente homogenizado (mediante digestor, mezcladora, homogeneizador validado o, lo que resulta más eficiente, mortero con arena estéril) y posteriormente debe suspenderse en el medio de transporte inicial. Si una muestra está formada por peces enteros de menos de 4 cm de largo, deben trocearse finamente con tijeras o una hoja de bisturí estériles tras retirar la parte del cuerpo situada por detrás del orificio intestinal. Si una muestra está formada por peces enteros de entre 4 y 6 cm de largo, debe obtenerse las vísceras, incluido el riñón. Si una muestra está formada por peces enteros de más de 6 cm de longitud, debe obtenerse muestras de tejido como se describe en el apartado 3.4. Las muestras de tejido deben trocearse finamente con tijeras o una hoja de bisturí estériles y homogeneizarse, como se ha descrito anteriormente, y después suspenderse en medio de transporte. La proporción final de tejido respecto a medio de transporte debe ajustarse en el laboratorio a 1:10.

El homogenado se centrifuga en una centrífuga refrigerada a 2-5°C a 2.000-4.000 **g** durante 15 minutos y el sobrenadante se recoge y se trata durante 4 horas a 15°C o durante toda la noche a 4°C con antibióticos, 1 mg ml⁻¹ de gentamicina, por ejemplo, puede ser útil en esta fase. Si la muestra se envía en medio de transporte (es decir, expuesta a antibióticos), el tratamiento del sobrenadante con antibióticos puede omitirse. El tratamiento con antibióticos tiene por objetivo controlar la contaminación bacteriana de las muestras y permite prescindir de la filtración por filtros de membrana.

Si el sobrenadante recogido se guarda a -80°C en un plazo de 48 horas tras la obtención de la muestra, puede volver a utilizarse solo una vez para el examen virológico.

Cuando surgen dificultades prácticas (como avería de la incubadora, problemas con los cultivos celulares, etc.) que imposibilitan la inoculación de células en un plazo de 48 horas tras la obtención de las muestras de tejido, es aceptable congelar el sobrenadante a -80°C y llevar a cabo el examen virológico en un plazo de 14 días.

Antes de inocular las células, el sobrenadante se mezcla con partes iguales de una combinación diluida adecuada de antisueros contra los serotipos autóctonos del virus de la necrosis

pancreática infecciosa (VNPI) y la solución se incuba durante un mínimo de 1 hora a 15°C o un máximo de 18 horas a 4°C. El título del antisuero debe ser de al menos 1/2000 en una prueba de neutralización en placa del 50%.

El tratamiento de todos los inóculos con antisuero contra el VNPI (un virus que en algunas partes de Europa aparece en el 50% de las muestras de peces) tiene por objetivo impedir que se desarrolle el ECP causado por el VNPI en cultivos celulares inoculados. Esto reducirá la duración del examen virológico así como el número de casos en los que la aparición de ECP tendría que haberse considerado potencialmente indicadora de VSHV. Cuando las muestras proceden de unidades de producción que se consideran libres de la NPI, el tratamiento de los inóculos con antisuero contra el VNPI puede omitirse.

4.3.1.2.1.2. Inoculación de monocapas celulares

Se cultivan células de la línea BF-2 a 20-40°C en medio adecuado, por ejemplo el medio mínimo esencial de Eagle (o modificaciones del mismo) con un suplemento de un 10% de suero fetal bovino y antibióticos a las concentraciones estándar. Cuando las células se cultivan en viales cerrados, se recomienda tamponar el medio con bicarbonato. El medio utilizado para el cultivo de células en unidades abiertas puede tamponarse con Tris/HCl (23 mM) y bicarbonato de sodio (6 mM), o con medio tamponado con HEPES (HEPES= ácido N-2-hidroxi-etil-piperazina-N-2-etanosulfónico). El pH debe mantenerse a $7,6 \pm 0,2$. Los cultivos celulares que van a utilizarse para la inoculación con material tisular deben ser jóvenes (4-48 horas de edad), y en el momento de la inoculación deben estar en crecimiento activo (no confluentes).

Se inoculan suspensiones de órganos tratados con antibióticos en cultivos celulares al menos a dos diluciones, es decir, la dilución madre y una dilución de esta a 1/10, que da lugar a diluciones finales de material tisular en el medio de cultivo celular de 1/100 y de 1/1000, respectivamente (para prevenir interferencia por homólogos). La proporción entre el tamaño del inóculo y el volumen de medio de cultivo celular debe ser de aproximadamente 1:10. Para cada dilución y cada línea celular, tiene que utilizarse un mínimo de aproximadamente 2 cm² de área celular, correspondiente a un pocillo de una bandeja de cultivo celular de 24 pocillos. Se recomienda utilizar bandejas de cultivo celular, pero también son aceptables otras unidades con áreas de crecimiento similares o mayores.

4.3.1.2.1.3. Incubación de cultivos celulares

Los cultivos celulares inoculados se incuban a 15°C durante 7-10 días. Si el color del medio de cultivo celular pasa de rojo a amarillo, indicando una acidificación del medio, debe realizarse un ajuste del pH con solución de bicarbonato estéril o sustancias equivalentes para garantizar la susceptibilidad de las células a la infección vírica.

Al menos cada 6 meses, o cuando se sospeche de disminución de la susceptibilidad celular, se lleva a cabo una titulación de los stocks congelados de VSHV para verificar la susceptibilidad de los cultivos celulares a la infección.

4.3.1.2.1.4. Microscopía

Los cultivos celulares inoculados deben inspeccionarse periódicamente (al menos tres veces a la semana) para comprobar si presentan ECP a 40-150 aumentos. Si se observa un ECP evidente, deben iniciarse de inmediato los procedimientos de identificación del virus. Se recomienda utilizar un microscopio de contraste de fases.

4.3.1.2.1.5. Subcultivo

Si pasados 7 a 10 días de la incubación inicial no se ha observado ECP, se lleva a cabo un subcultivo con cultivos celulares nuevos utilizando una zona celular similar a la del cultivo primario.

Se combinan alícuotas de medio (sobrenadante) de todos los cultivos/pocillos que constituyan el cultivo primario, según la línea celular, 7-10 días después de la inoculación. Las alícuotas combinadas se inoculan en cultivos celulares homólogos no diluidas y diluidas a 1/10 (obteniendo diluciones finales de 1/10 y 1/100, respectivamente, del sobrenadante) como se describe arriba (Inoculación de monocapas celulares).

Como alternativa, se inoculan alícuotas de un 10% del medio que constituye el cultivo primario directamente en un pocillo con cultivo celular nuevo (subcultivo de pocillo a pocillo). En el caso de muestras de salmónidos, la inoculación puede ir precedida de una preincubación de las diluciones con un antisuero anti-VNPI a una dilución adecuada, como se describe arriba (apartado 4.3.1.2.1.1 Extracción del virus).

A continuación, los cultivos inoculados se incuban 7 a 10 días a 15°C, observándolos, como se describe arriba (apartado 4.3.1.2.1.4 Microscopía). Si aparece ECP en los primeros 3 días de

incubación, puede realizarse un subcultivo en esa fase, pero después las células tienen que incubarse durante 7 días y subcultivarse de nuevo con otra incubación de 7 días. Cuando aparece ECP tóxico pasados 3 días, las células pueden pasarse una vez e incubarse para alcanzar un total de 14 días desde la inoculación primaria. No debe haber indicios de toxicidad en los últimos 7 días de incubación.

Si se produce contaminación bacteriana a pesar del tratamiento con antibióticos, el subcultivo debe ir precedido de una centrifugación a 2.000-4.000 **g** de 15–30 minutos a 2–5°C, y/o una filtración del sobrenadante por un filtro de 0,45 µm (membrana de baja unión de proteínas). Además de esto, los procedimientos de subcultivo son los mismos que en el caso del ECP tóxico.

Si no aparece ECP, la prueba puede declararse negativa.

4.3.1.2.1.6. Identificación del virus

Prueba de neutralización

- i) Se recoge el medio de cultivo de las monocapas celulares que presenten ECP y se centrifuga a 2.000 **g** durante 15 minutos a 4°C, o se filtra por una membrana de 0,45 µm (o 450 nm) de tamaño de poro para eliminar detritos celulares.
- ii) Se diluye el medio que contiene el virus, pasando de 10⁻² a 10⁻⁴.
- iii) Se mezclan las alícuotas (por ejemplo, de 200 µl) de cada dilución con volúmenes iguales de solución de anticuerpos anti-VSHV y, de igual forma, se tratan las alícuotas de cada dilución de virus con medio de cultivo celular. La solución de anticuerpos neutralizantes (NAb) debe tener un título de reducción del 50% en placa de al menos 2000.
- iv) Paralelamente, debe realizarse otra prueba de neutralización contra una cepa vírica homóloga (prueba de neutralización positiva).
- v) Si es necesario, puede realizarse una prueba de neutralización similar utilizando anticuerpos contra el VNPI.
- vi) Se incuban todas las mezclas a 15°C durante 1 hora.
- vii) Se transfieren las alícuotas de cada una de las mezclas anteriores a monocapas de 24-48 horas de edad cubiertas con medio de cultivo celular que contenga FBS al 10% (se inoculan dos pocillos por dilución) y se incuban a 15°C; para este fin, son adecuadas las placas de cultivo celular de 24 o de 12 pocillos, utilizando un inóculo de 50 µl.
- viii) Se observan los cultivos celulares para comprobar si ha empezado el ECP y se lee el resultado en cuanto se produce en controles no neutralizados (en los controles positivos de neutralización las monocapas celulares estarán protegidas). Los resultados se registran o bien tras un examen microscópico simple (preferiblemente de contraste de fases) o bien tras desechar el medio de cultivo celular y teñir las monocapas celulares con un solución de cristal violeta al 1% en etanol al 20%.
- ix) El virus analizado se identifica como VSHV cuando se previene el ECP o se retrasa considerablemente en los cultivos celulares que han recibido la suspensión de virus tratada con el anticuerpo específico contra el VSHV, mientras que sí se observa ECP en todos los demás cultivos celulares.
- x) En ausencia de neutralización alguna mediante NAb contra el VSHV, es obligatorio llevar a cabo una IFAT, una prueba de inmunoperoxidasa, un ELISA o una RT-PCR en la muestra sospechosa. Se han observado algunos casos de deriva antigénica del antígeno de superficie, que han dado lugar a fracasos ocasionales de la prueba de neutralización con NAb contra el VSHV.

Como alternativa se pueden utilizar otras pruebas de neutralización cuya eficacia se haya demostrado.

4.3.1.2.2. Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos

Para la detección del VSHV, a lo largo de los años se han desarrollado métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos, como la IFAT, el ELISA y varios procedimientos de inmunohistoquímica. En general se acepta que los órganos diana principales son el riñón, el corazón y el bazo. Estas técnicas permiten una detección e identificación relativamente rápidas en comparación con el aislamiento en cultivo celular. No obstante, existen distintos parámetros, como la sensibilidad y la especificidad del anticuerpo o la preparación de la muestra, que pueden influir en los resultados, de modo que un resultado negativo debe interpretarse con cautela. Estas técnicas no deben utilizarse en intentos de detectar peces portadores.

4.3.1.2.2.1 *Pruebas de inmunofluorescencia indirecta en improntas*

- i) Se desangra el pez por completo.
- ii) Se realizan improntas de riñón en portas de vidrio limpios o en el fondo de los pocillos de una placa de cultivo celular de plástico.
- iii) Se guardan trozos de riñón junto con los otros órganos necesarios para el aislamiento del virus por si tuvieran que utilizarse en otro momento.
- iv) Se deja secar la impronta al aire durante 20 minutos.
- v) Se fija con acetona o etanol/acetona y seca como se indica en el apartado 4.3.1.2.2.3, pasos v–vii.
- vi) Se rehidratan las preparaciones anteriores (véase el apartado 4.3.1.2.2.3, paso ix) y se bloquean con una solución de leche desnatada al 5% o de albúmina de suero bovino al 1% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) 0,01 M, pH 7,2, que contenga Tween-80 al 0,05% (PBST), durante 30 minutos a 37°C.
- vii) Se enjuagan cuatro veces con PBST.
- viii) Se tratan las improntas con la solución de anticuerpos anti-VSHV y se enjuagan como se indica en el apartado 4.3.1.2.2.3.
- ix) Se bloquean y se enjuagan como se ha descrito previamente en los pasos vi y vii.
- x) Se revela la reacción con un anticuerpo adecuado y específico conjugado con ITCF, se enjuagan y se observan como se indica en el apartado 4.3.1.2.2.3, pasos xii–xv.
- xi) Si la prueba es negativa, se procesan las muestras de órgano guardadas a 4°C para el aislamiento del virus en cultivo celular, como se ha descrito arriba.

4.3.1.2.2.2 *Enzimoinmunoanálisis (modificado por Olesen y Jørgensen, 1991)**Procedimiento del ELISA en material tisular*

Procedimientos de obtención de muestras: Véase el Capítulo 2.3.0. del *Manual de la OIE sobre la Vigilancia Sanitaria de los Animales Acuáticos* (2009).

Procesado de muestras de órganos: Véase el Capítulo 2.3.0. del *Manual de la OIE sobre la Vigilancia Sanitaria de los Animales Acuáticos* (2009).

Se sigue el procedimiento descrito a continuación (procedimiento del ELISA en sobrenadante de cultivo celular)

- i) Se aparta una alícuota de una dilución a ¼ de cada homogenado por si se necesita otro aislamiento del virus en cultivo celular.
- ii) Se trata la parte restante del homogenado con un Triton X-100 al 2%; se mezcla con cuidado.
- iii) Se completan los otros pasos del procedimiento descrito en “Procedimiento del ELISA en sobrenadante de cultivo celular”
- v) 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 arriba.

Procedimiento del ELISA en sobrenadante de cultivo celular

- i) Se cubren los pocillos de microplacas diseñadas para ELISA con diluciones adecuadas de inmunoglobulinas (Ig) contra proteína A purificadas de antisueros de conejo anti-VSHV, en tampón carbonato, a pH 9,6 (50 µl/pocillo).
- ii) Se incuban toda la noche a 4°C.
- iii) Se enjuagan con PBS que contenga Tween-20 al 0,05% (PBST).
- iv) Se añade Triton X-100 al 1% a la suspensión vírica problema.
- v) Se distribuyen 50 µl/pocillo de diluciones de dos o cuatro pasos (en PBST que contenga albúmina de suero bovino al 1%) del virus problema y del VSHV control, así como un control negativo (por ejemplo, virus de la necrosis hematopoyética infecciosa), y se deja reaccionar con el anticuerpo de recubrimiento contra el VSHV durante 1 hora a 37°C.
- vi) Se enjuagan en PBST.

- vii) Se añaden a los pocillos MAb contra la proteína N del VSHV (IP5B11) a razón de 50 µl/pocillo.
- viii) Se incuban durante 1 hora a 37°C.
- ix) Se enjuagan en PBST.
- x) Anticuerpos monoclonales anti-ratón conjugados a peroxidasa de rábano (HRP).
- xi) Se incuban durante 1 hora a 37°C.
- xii) Se enjuagan en PBST.
- xiii) Se visualiza la reacción utilizando ortofenildiamina y se mide la absorbancia a una longitud de onda de 492 nm.

Esta versión de ELISA se indica como ejemplo, pero en su lugar pueden utilizarse otras versiones de ELISA cuya eficacia se haya demostrado.

4.3.1.2.2.3 Prueba de inmunofluorescencia indirecta

- i) Se preparan monocapas de células en pocillos de 2 cm² de placas de plástico de cultivo celular o en cubreobjetos con el fin de alcanzar alrededor de un 80% de confluencia, que normalmente se logra en un plazo de 24 horas de incubación a 22°C (se siembran seis monocapas celulares por cepa vírica a identificar, más de para los controles positivos y dos para los negativos). El contenido en FBS del medio de cultivo celular pueden reducirse al 2-4%. Si tienen que identificarse muchas cepas víricas, se recomienda vivamente utilizar placas Terasaki.
- ii) Cuando las monocapas 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 realizando pasos de dilución decimal directamente en los pocillos o frascos de cultivo celular.
- iii) Se diluye la suspensión de virus control de VSHV de forma similar, con el fin de obtener un título vírico de unas 5.000–10.000 unidades formadoras de placas (UFP) ml⁻¹ en el medio de cultivo celular.
- iv) Se incuba a 15°C durante 24 horas.
- v) Se retira el medio de cultivo celular, se enjuaga una vez con PBS 0,01 M, pH 7,2, y a continuación tres veces brevemente con una mezcla fría de un 30% de acetona y un 70% de etanol (v/v) (almacenada a -20°C).
- vi) Se deja actuar el fijador durante 15 minutos. Un volumen de 0,5 ml es suficiente para 2 cm² de monocapa celular.
- vii) Se dejan secar las monocapas celulares al aire durante al menos 30 minutos y se procesan de inmediato o se congelan a -20°C.
- viii) Se prepara una solución de anticuerpo anti-VSHV purificado o suero en PBST 0,01 M, pH 7,2, a la dilución adecuada (que se habrá establecido previamente o vendrá indicada por el fabricante del reactivo).
- ix) Se rehidratan las monocapas celulares secadas utilizando cuatro pasos de enjuagado con la solución de PBST, y se retira este tampón completamente tras el último enjuagado.
- x) Se tratan las monocapas celulares con la solución de anticuerpos durante 1 hora a 37°C en una cámara húmeda impidiendo la evaporación, por ejemplo añadiendo un trozo de algodón mojado en la cámara húmeda. El volumen de solución a utilizar es de 0,25 ml/pocillo de 2 cm².
- xi) Se enjuagan cuatro veces con PBS, como antes.
- xii) Se tratan las monocapas celulares durante 1 hora a 37°C con una solución de anticuerpo conjugado a isotiocianato de fluoresceína (ITCF) o a isotiocianato de tetrametilrodamina-5-(y-6) contra la inmunoglobulina utilizada como anticuerpo primario, y preparado según las instrucciones del fabricante. Estos anticuerpos conjugados normalmente son de conejo o de cabra.
- xiii) Se enjuagan cuatro veces con PBST.
- xiv) Se examinan las monocapas celulares tratadas en placas de plástico de inmediato, o se montan los cubreobjetos utilizando, por ejemplo, solución salina de glicerol, pH 8,5, antes de la observación al microscopio.

- xv) Se examinan con luz UV incidente utilizando un microscopio con oculares de 10 aumentos y objetivos de 20-40 aumentos y con una apertura numérica >0,65 y >1,3, respectivamente. Antes de proceder a observación alguna, hay que asegurarse de que los controles, positivos y negativos, dan los resultados esperados.

Como alternativa, puede utilizarse otras técnicas IFAT o inmunocitoquímicas (fosfatasa alcalina o peroxidasa) cuya eficacia se haya demostrado.

4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

Se utilizan con frecuencia pruebas moleculares (RT-PCR y RT-PCR en tiempo real) por su rapidez, sensibilidad y especificidad. Además, con la presencia de distintas cepas con distintas características de patogenicidad, descubrimiento de las distintas cepas marinas norteamericanas, asiáticas, europeas y del Atlántico, la secuenciación de los productos de la PCR puede proporcionar importantes datos epidemiológicos (Einer-Jensen *et al.*, 2002; Skall *et al.*, 2005). Las pruebas de RT-PCR en tiempo real en general son más sensibles que las de RT-PCR convencional. Aunque el uso de estas pruebas para la detección e identificación del virus durante la fase aguda de la enfermedad se ha justificado durante muchos años, la sensibilidad y especificidad de una prueba de RT-PCR en tiempo real en comparación con el aislamiento del virus mediante cultivo celular y la subsiguiente identificación hace poco que se han establecido definitivamente (Garver *et al.*, 2011; Jonstrup *et al.*, 2012). Se ha observado que estas dos pruebas son adecuadas para la identificación del VSHV de todos los genotipos.

En el momento de redactar este texto (2011), no puede recomendarse la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) para el VSHV como prueba general de detección del virus, puesto que la única técnica de LAMP publicada no está validada para todos los genotipos, y por alineación de secuencias es probable que la LAMP publicada no reconozca todos los genotipos (Soliman y El-Matbouli, 2006).

Preparación de ARN vírico

Todo el trabajo realizado con el ARN debe llevarse a cabo sobre hielo, utilizando guantes.

Se recogen alícuotas de medio de cultivo de células de monocapa infectada que presenten ECP. Se centrifugan a 1000 *g* durante 5 minutos para eliminar detritos celulares.

Se extrae ARN utilizando el método del fenol-cloroformo o mediante columnas de centrifugación por afinidad al ARN, según las instrucciones del fabricante. Debe resuspenderse ARN en agua destilada sin ARNasa (por ejemplo, agua tratada con un 0,1% de dietilpircarbonato).

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

La amplificación mediante RT-PCR puede llevarse a cabo en un paso o en dos. Ambos procedimientos se basan en un paso de amplificación mediante PCR en el que se utilizan cebadores: el cebador directo VN: 5'-ATG-GAA-GGA-GGA-ATT-CGT-GAA-GCG-3' y el cebador inverso VN: 5'-GCG-GTG-AAG-TGC-TGC-AGT-TCC-C-3' (Snow *et al.*, 2004). El cebador directo VN y el cebador VN inverso están diseñados para amplificar una región correspondiente a las bases 1 a 505 del gen N del VSHV (Snow *et al.*, 2004). **NOTA:** es posible que utilizando estos cebadores no se reconozcan cepas del genotipo IVb; por tanto, para la confirmación se recomienda el uso de la RT-PCR en tiempo real o de métodos basados en anticuerpos.

RT-PCR simple:

Puede llevarse a cabo una RT-PCR en tubo único de 50 µl utilizando, por ejemplo, el sistema de RT-PCR simple de Qiagen (Qiagen, Alemania), según las instrucciones del fabricante. En pocas palabras, la mezcla para la reacción está formada por: 5 µl de ARN vírico extraído, 2 µl de dNTP 10 mM, 10 µl tampón para la reacción de la RT-PCR 5x (con MgCl₂ 12,5 mM) y 2 µl de mezcla de enzima. La RT-PCR se puede llevar a cabo utilizando cebador los cebadores directo VN e inverso VN a una concentración final de 0,6 µM cada uno. Se recomiendan los siguientes ciclos: 50°C durante 30 minutos, 95°C durante 15 minutos, 35 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, y 68°C durante 60 segundos. A continuación, la reacción se mantiene a 68°C durante 7 minutos.

RT-PCR de dos pasos:

Puede llevarse a cabo una síntesis de 20 µl de ADNc utilizando, por ejemplo, el kit de síntesis iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) según las instrucciones del fabricante. En resumen, la mezcla para la reacción está formada por: 5 µl de ARN vírico extraído, 4 µl de mezcla de

reacción (iScript Reaction Mix) 5x, 1 µl de transcriptasa inversa (iScript Reverse Transcriptase) y 10 µl de agua sin nucleasa. Se incuban las muestras utilizando el siguiente programa: 25°C durante 5 minutos, 42°C durante 30 minutos, 85°C durante 5 minutos. Para la PCR se utilizan 5 µl.

Puede llevarse a cabo una PCR de 25 µl tras la síntesis del ADNc (descrita arriba) utilizando, por ejemplo, Go Taq Flexi Polymerase (Promega), según las instrucciones del fabricante. En resumen, la mezcla para la reacción está formada por: 5 µl de ADNc, 11,125 µl de agua Milli Q, 5 µl de tampón Green GoTaq Flexi 5x, 2,5 µl de MgCl₂ 25 mM, 0,5 µl de cebador directo VN (10 µM), 0,5 µl de cebador inverso VN (10 µM), 0,25 µl de cada una de las dNTP 25 mM, 0,125 µl de polimerasa Go Taq Flexi DNA. Se incuban las muestras utilizando el siguiente programa: 94°C durante 5 minutos, 36 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, y 68°C durante 60 segundos. A continuación, se mantiene la reacción a 68°C durante 7 minutos.

Se puede evaluar la cantidad y la especificidad de las RT-PCR simple y de dos pasos mediante electroforesis en gel de una reacción 1/10 en gel de agarosa al 1,5% con bromuro de etidio y observarse mediante transiluminación con luz UV.

Nota: la PCR puede variar en función de las condiciones en las cuales se lleve a cabo; así, los protocolos de ciclado térmico podría precisar una optimización, dependiendo del termociclador utilizado. Además, pueden producirse falsos positivos debido, por ejemplo, a una falsa hibridación del cebador o a contaminación del laboratorio. También debe tenerse cuidado cuando el virus se cultiva en células BF-2, puesto que en ocasiones, aunque muy infrecuentes, puede observarse una banda falsamente positiva de un tamaño ligeramente inferior al de una verdadera banda de VSHV. Por tanto, es importante incluir controles positivos y negativos adecuados, y en caso de duda deben secuenciarse los amplicones.

4.3.1.2.3.2 RT-PCR en tiempo real

La amplificación mediante RT-PCR puede llevarse a cabo utilizando los cebadores/sonda adaptados de Jonstrup *et al.* (2012): Cebador directo: 5'-AAA-CTC-GCA-GGA-TGT-GTG-CGT-CC-3', Cebador inverso: 5'-TCT-GCG-ATC-TCA-GTC-AGG-ATG-AA-3', y sonda: 5'-FAM-TAG-AGG-GCC-TTG-GTG-ATC-TTC-TG-BHQ1. Estos cebadores van dirigidos a los nucleótidos 532-608 según el número de acceso de GenBank Z93412. Como alternativa, pueden adaptarse los cebadores/sonda de Garver *et al.* (2011): Cebador directo (2F): 5'-ATG-AGG-CAG-GTG-TCG-GAG-G-3', Cebador inverso (2R): 5'-TGT-AGT-AGG-ACT-CTC-CCA-GCA-TCC-3', y sonda (2-MGB): 5'-FAM-TAC-GCC-ATC-ATG-ATG-AGT-MGBNFQ-3' dirigidos a los nucleótidos 787-868, según el número de acceso de GenBank Z93412

RT-PCR en tiempo real de un solo paso:

Puede llevarse a cabo una RT-PCR de un solo tubo de 25 µl utilizando, por ejemplo, el kit de RT-PCR Quantitect Probe RT-PCR kit (Qiagen, Alemania), según las instrucciones del fabricante. En resumen, la mezcla para la reacción está formada por: 5 µl de ARN vírico extraído (unos 0,05–2 µg), 12,5 µl de mezcla madre para QRT-PCR 2x, y 0,25 µl de mezcla de enzima de bloqueo RT/ARNasa. La RT-PCR en tiempo real se puede llevar a cabo utilizando cebadores directo e inverso a una concentración final de 0,9 µM cada uno, y sonda a una concentración final de 0,25 µM. El programa de la PCR depende del kit y del equipo de PCR en tiempo real utilizado. En el caso de un mx3005p (Stratagene) utilizando un kit de RT-PCR Quantitect Probe RT-PCR kit (Qiagen, Alemania) se ejecuta el siguiente programa: 50°C durante 30 minutos, 95°C durante 15 minutos, 40 ciclos de 94°C durante 15 segundos, 60°C durante 40 segundos, 72°C durante 20 segundos, y si se utiliza otra plataforma y/o kit, se realizan los ajustes necesarios.

Obsérvese que la sensibilidad de la RT-PCR en tiempo real depende en gran medida del kit utilizado (consúltese Jonstrup *et al.*, 2012 para más detalles).

4.3.2. Métodos serológicos

La vigilancia basada en pruebas serológicas tiene varias ventajas respecto al aislamiento del virus, sobre todo en casos en que la temperatura del agua es demasiado alta para el aislamiento del virus y en poblaciones infectadas de forma endémica sin signos clínicos de la enfermedad. Sin embargo, la respuesta de anticuerpos detectarse por primera vez 3 a 4 semanas después de la infección. Por otra parte, los altos niveles de anticuerpos persistirán durante mucho tiempo: más de 6 meses tras la infección (Fregeneda-Grandes y Olesen, 2007; LaPatra, 1996; Lorenzen y LaPatra, 1999). El inconveniente de las pruebas serológicas es el lento desarrollo de los anticuerpos de los peces tras la infección, sobre todo a temperaturas del agua bajas. Se está llevando a cabo una evaluación final de la

sensibilidad, la especificidad y la reproducibilidad analítica de métodos serológicos para la detección de anticuerpos anti-VSHV en peces. Cuando estén adecuadamente evaluados y validados, se podrán añadir métodos a este capítulo.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

Los métodos actualmente disponibles para la vigilancia dirigida, la detección y el diagnóstico del VSHV 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, detección y diagnóstico

Método	Vigilancia dirigida			Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
	Larvas	Juveniles	Adultos		
Signos macroscópicos	d	d	d	b	d
Histopatología	d	d	d	b	d
ME de transmisión	d	d	d	c	d
Aislamiento en cultivo celular seguido de uno de los métodos de identificación	a	a	a	a	a
Pruebas basadas en anticuerpos	d	d	d	b	a
RT-PCR convencional seguida de secuenciación	c	c	c	b	a
RT-PCR en tiempo real	c	c	c	a	a

ME = microscopía electrónica; RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa.

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

La prueba recomendada para la vigilancia dirigida es el cultivo de muestras de tejido de pez en células de la línea BF-2 con la posterior identificación del virus mediante pruebas inmunoquímicas o basadas en ácidos nucleicos, como se describe en el apartado 4 de este capítulo.

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

La presencia del VSHV debe sospecharse si se cumple al menos uno de los siguientes criterios:

- i) La presencia de hallazgos post-mortem compatibles con la SHV, con o sin signos clínicos de la enfermedad. Los hallazgos post-mortem y los signos clínicos de la enfermedad deben concordar con los descritos en los apartados 4.1 y 4.2 de este capítulo;

- ii) ECP típico del VSHV en cultivos celulares antes de la confirmación;
- iii) Cuando un estudio ponga de manifiesto relaciones epidemiológicas con piscifactorías sospechosas de presentar SHV o en las que se haya confirmado;
- iv) Detección de anticuerpo contra el VSHV en peces.

La sospecha de SHV se puede descartar si estudios continuados ponen de manifiesto que ya no hay indicios de presencia del agente patógeno.

7.2. Definición de caso confirmado

La presencia del VSHV se considera confirmada si, además de los criterios del apartado 7.1, se cumple uno o más de los siguientes:

- i) se realiza aislamiento del VSHV en cultivo celular seguido de la identificación del virus por pruebas basadas en anticuerpos (IFAT, ELISA, neutralización vírica, inmunohistoquímica) y/o por RT-PCR seguida de secuenciación del amplicón o por RT-PCR en tiempo real;
- ii) se detecta el VSHV en tejidos o preparaciones de tejidos mediante inmunoanálisis utilizando anticuerpos específicos anti-VSHV;
- iii) se detecta el VSHV en preparaciones de tejido mediante RT-PCR seguida de la secuenciación del amplicón o de RT-PCR en tiempo real.

La confirmación del primer caso de SHV en piscifactorías de zonas o compartimiento no infectados no puede basarse solamente en ii) o solamente en iii).

El material tisular para el examen virológico podría, en algunos casos, ir acompañado de material suplementario para un examen bacteriológico, parasitológico, histológico o de otro tipo para disponer de un diagnóstico diferencial.

8. Bibliografía

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2008). Scientific Opinion of the panel on AHAW on a request from the European Commission on aquatic animal species susceptible to diseases listed in the Council Directive 2006/88/EC. *The EFSA Journal*, **808**, 1–144.

AHNE W. (1982). Vergleichende Untersuchung über die Stabilität von vier fischpathogenen Viren (VHSV, PFR, SVCV, IPNV) (Comparative studies on the stability of four fish-pathogenic viruses [VHSV, PFR, SVCV, IPNV]). *Zentralbl. Veterinarmed. [B]*, **29**, 457–476. (In German).

AL-HUSSINEE L., HUBER P., RUSSELL S., LEPAGE V., REID A., YOUNG K.M., NAGY E., STEVENSON R.M.W. & LUMSDEN J.S. (2010). Viral haemorrhagic septicaemia virus IVb experimental infection of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), and fathead minnow, *Pimphales promelas* (Rafinesque). *J. Fish Dis.*, **33**, 347–360.

AL-HUSSINEE L., LORD S., STEVENSON R.M.W., CASEY R.N., GROOCKOCK G.H., BRITT K.L., KOHLER K.H., WOOSTER G.A., GETCHELL R.G., BOWSER P.R. & LUMSDEN J.S. (2011). Immunohistochemistry and pathology of multiple Great Lakes fish from mortality events associated with viral hemorrhagic septicemia virus type IVb. *Dis. Aquat. Org.*, **93**, 117–127.

ARIEL E. & OLESEN J. (2001). Assessment of a commercial kit collection for diagnosis of the fish viruses: IHNV, IPNV, SVCV and VHSV. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **21**, 6–11.

ARKUSH K.D., MENDONCA H.L., MCBRIDE A.M., YUN S., MCDOWELL T.S. & HEDRICK R.P. (2006). Effects of temperature on infectivity and of commercial freezing on survival of the North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). *Dis. Aquat. Org.*, **69**, 145–151.

BARONI A., GALESSO R. & BOVO G. (1982). Ultrastructural observations on the virus of viral haemorrhagic septicaemia in culture. *J. Fish Dis.*, **5**, 439–444.

BOVO G., HÄSTEIN T., HILL B., LAPATRA S., MICHEL C., OLESEN N.J., SHCHELKUNOV I., STORSET A., WOLLFROM T. & MIDTLING P.J. (2005a). QLK2-CT-2002-01546: Fish Egg Trade Work package 1 report: Hazard identification for vertical transfer of fish disease agents, 1–35. VESO, P.O. Box 8109, Dep., N-0032 Oslo, Norway. Available at http://www.crl-fish.eu/upload/sites/eurl-fish/reports/links/fisheggtrade%20wp_1.pdf

- BOVO G., HILL B., HUSBY A., HASTEIN T., MICHEL C., OLESEN N.J., STORSET A. & MIDTLYNG P. (2005b). Fish Egg Trade Work package 3 report: Pathogen survival outside the host, and susceptibility to disinfection, 1–53. VESO, P.O. Box 8109 Dep., N-0032 Oslo, Norway. Available at: http://www.cri-fish.eu/upload/sites/eurl-fish/links/fisheggtrade%20wp_3.pdf
- BREMONT M. (2005). Reverse genetics on fish rhabdoviruses: tools to study the pathogenesis of fish rhabdoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **292**, 119–141
- DALE O.B., ØRPETVEIT I., LYGSTAD T.M., KAHNS S., SKALL H.F., OLESEN N.J. & DANNEVIG B.H. (2009). Outbreak of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in seawater-farmed rainbow trout in Norway caused by VHS virus Genotype III. *Dis. Aquat. Org.*, **85**, 93–103.
- DORSON M., QUILLET E., HOLLEBECQ M.G., TORHY C. & CHEVASSUS B. (1995). Selection of rainbow trout resistant to viral haemorrhagic septicaemia virus and transmission of resistance by gynogenesis. *Vet. Res.*, **26**, 361–368.
- EINER-JENSEN K., AHRENS P., FORSBERG R. & LORENZEN N. (2004). Evolution of the fish rhabdovirus viral haemorrhagic septicaemia virus. *J. Gen. Virol.*, **85**, 1167–1179.
- EINER-JENSEN K., AHRENS P. & LORENZEN N. (2005). Parallel phylogenetic analyses using the N, G or Nv gene from a fixed group of VHSV isolates reveal the same overall genetic typing. *Dis. Aquat. Org.*, **67**, 39–45.
- EINER-JENSEN K., BJÖRKLUND H., ORESHKOVA S., SHCHELKUNOV I., VESELY T. & LORENZEN N. (2002). Detection and typing of fish viruses. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **22**, 158–165.
- ELSAIED E., FAISAL M., THOMAS M., WHELAN G., BATTS W. & WINTON J. (2006). Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus from muskellunge, *Esox masquinongy* (Mitchill), in Lake St Clair, Michigan, USA reveals a new sublineage of the North American genotype. *J. Fish Dis.*, **29**, 611–619.
- ENZMANN P.J. & KONRAD M. (1985). Inapparent infections of brown trout with VHS-virus. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **5**, 81–83.
- EVENSEN Ø., MEIER W., WAHLI T., OLESEN N.J., JØRGENSEN P.E.V. & HASTEIN T. (1994). Comparison of immunohistochemistry and virus cultivation for detection of viral haemorrhagic septicaemia virus in experimentally infected rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Org.*, **20**, 101–109.
- FAISAL M. & SCHULZ C.A. (2009). Detection of Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from the leech *Myzobdella lugubris* Leidy, 1851. *Parasit. Vectors*, **2**, 45.
- FAISAL M. & WINTERS A.D. (2011). Detection of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from *Diporeia* spp. (Pontoporeiidae, Amphipoda) in the Laurentian Great Lakes, USA. *Parasit. Vectors*, **4**, 2.
- FREGENEDA-GRANDES J.M. & OLESEN N.J. (2007). Detection of rainbow trout antibodies against viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) by neutralisation test is highly dependent on the virus isolate used. *Dis. Aquat. Org.*, **74**, 151–158.
- GADD T., JAKAVA-VILJANEN M., EINER-JENSEN K., ARIEL E., KOSKI P. & SIHVONEN L. (2010). Viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) genotype II isolated from European river lamprey *Lampetra fluviatilis* in Finland during surveillance from 1999 to 2008. *Dis. Aquat. Org.*, **88**, 189–198.
- GARVER K.A., HAWLEY L.M., MCCLURE C.A., SCHROEDER T., ALDOUS S., DOIG F., SNOW M., EDES S., BAYNES C. & RICHARD J. (2011). Development and validation of a reverse transcription quantitative PCR for universal detection of viral hemorrhagic septicemia virus. *Dis. Aquat. Org.*, **95**, 97–112.
- GOODWIN A.E. & MERRY G.E. (2011). Mortality and carrier status of bluegills exposed to viral hemorrhagic septicemia virus genotype IVb at different temperatures. *J. Aquat. Anim. Health*, **23**, 85–91.
- GROOCCOCK G.H., GETCHELL R.G., WOOSTER G.A., BRITT K.L., BATTS W.N., WINTON J.R., CASEY R.N., CASEY J.W. & BOWSER P.R. (2007). Detection of viral hemorrhagic septicemia in round gobies in New York State (USA) waters of Lake Ontario and the St. Lawrence River. *Dis. Aquat. Org.*, **76**, 187–192.
- HAWLEY L.M. & GARVER K.A. (2008). Stability of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in freshwater and seawater at various temperatures. *Dis. Aquat. Org.*, **82**, 171–178.

HEDRICK R.P., BATTS W.N., YUN S., TRAXLER G.S., KAUFMAN J. & WINTON J.R. (2003). Host and geographic range extensions of the North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus. *Dis. Aquat. Org.*,**55**, 211–220.

HENRYON M., BERG P., OLESEN N.J., KJÆR T.E., SLIERENDRECHT W.J., JOKUMSEN A. & LUND I. (2005). Selective breeding provides an approach to increase resistance of rainbow trout to the diseases, enteric redmouth disease, rainbow trout fry syndrome, and viral haemorrhagic septicaemia. *Aquaculture*,**250**, 621–636.

HENRYON M., JOKUMSEN A., BERG P., LUND I., PEDERSEN P.B., OLESEN N.J. & SLIERENDRECHT W.J. (2002a). Erratum to “Genetic variation for growth rate, feed conversion efficiency, and disease resistance exists within a farmed population of rainbow trout” (*Aquaculture*, 2002, **209**, 59–76). *Aquaculture*,**216**, 389–390.

HENRYON M., JOKUMSEN A., BERG P., LUND I., PEDERSEN P.B., OLESEN N.J. & SLIERENDRECHT W.J. (2002b). Genetic variation for growth rate, feed conversion efficiency, and disease resistance exists within a farmed population of rainbow trout. *Aquaculture*,**209**, 59–76.

ISSHIKI T., NISHIZAWA T., KOBAYASHI T., NAGANO T. & MIYAZAKI T. (2001). An outbreak of VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in Japan. *Dis. Aquat. Org.*,**47**, 87–99.

ITO T., OLESEN N.J., SKALL H.F., SANO M., KURITA J., NAKAJIMA K. & IIDA T. (2010). Development of a monoclonal antibody against viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) genotype IVa. *Dis. Aquat. Org.*,**89**, 17–27.

JONSTRUP S.P., KAHNS S., SKALL H.F., BOUSTRUP T.S., OLESEN N.J. (2012). Development and validation of a novel Taqman based real time RT-PCR assay suitable for demonstrating freedom from viral haemorrhagic septicaemia virus. Submitted to *J. Fish Dis.* (in Press).

JØRGENSEN P.E.V. (1982). Egtved virus: occurrence of inapparent infections with virulent virus in free-living rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, at low temperature. *J. Fish Dis.*,**5**, 251–255.

KANE-SUTTON M., KINTER B., DENNIS P.M. & KOONCE J.F. (2010). Viral hemorrhagic septicemia virus infection in yellow perch, *Perca flavescens*, in Lake Erie, *J. Great Lakes Res.*,**36**, 37–43.

KIM R. & FAISAL M. (2010). Experimental studies confirm the wide host range of the Great Lakes viral haemorrhagic septicaemia virus genotype IVb. *J. Fish Dis.*,**33**, 83–88.

KIM S.-M. & PARK S.-I. (2004). Detection of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in wild marine fishes in the coastal region of Korea. *J. Fish Pathol.*,**17**, 1–10.

KOCAN R., BRADLEY M., ELDER N., MEYERS T.R., BATTS W.N. & WINTON J.R. (1997). North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus is highly pathogenic for laboratory-reared pacific herring. *J. Aquat. Anim. Health*, **9**, 279–290.

KOCAN R.M., HERSHBERGER P.K., ELDER N.E. & WINTON J.R. (2001). Survival of the North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in filtered seawater and seawater containing ovarian fluid, crude oil and serum-enriched culture medium. *Dis. Aquat. Org.*,**44**, 75–78.

LAPATRA S.E. (1996). The use of serological techniques for virus surveillance and certification of finfish. *Ann. Rev. Fish Dis.*,**6**, 15–28.

LEE W.-L., YUN H.-M., KIM S.-R., JUNG S.-J. & OH M.-J. (2007). Detection of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from marine fish in the South Western Coastal Area and East China Sea. *J. Fish Pathol.*,**20**, 201–209.

LÓPEZ-VÁZQUEZ C., CONDE M., DOPAZO C.P., BARJA J.L. & BANDÍN I. (2011). Susceptibility of juvenile sole *Solea senegalensis* to marine isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus from wild and farmed fish. *Dis. Aquat. Org.*, **93**, 111–116.

LÓPEZ-VÁZQUEZ C., RAYNARD R.S., BAIN N., SNOW M., BANDÍN I. & DOPAZO C.P. (2006). Genotyping of marine viral haemorrhagic septicaemia virus isolated from the Flemish Cap by nucleotide sequence analysis and restriction fragment length polymorphism patterns. *Dis. Aquat. Org.*,**73**, 23–31.

LORENZEN E., CARSTENSEN B. & OLESEN N.J. (1999). Inter-laboratory comparison of cell lines for susceptibility to three viruses: VHSV, IHN and IPNV. *Dis. Aquat. Org.*,**37**, 81–88.

LORENZEN N. & LAPATRA S.E. (1999). Immunity to rhabdoviruses in rainbow trout: the antibody response. *Fish Shellfish Immunol.*,**9**, 345–360.

- LORENZEN N. & LAPATRA S.E. (2005). DNA vaccines for aquacultured fish. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **24**, 201–213.
- LORENZEN N., OLESEN N.J. & VESTERGÅRD JØRGENSEN P.E. (1988). Production and characterization of monoclonal antibodies to four Egtved virus structural proteins. *Dis. Aquat. Org.*, **4**, 35–42.
- LUMSDEN J.S., MORRISON B., YASON C., RUSSELL S., YOUNG K., YAZDANPANAH A., HUBER P., AL-HUSSINEEL., STONE D. & WAY K. (2007). Mortality event in freshwater drum *Aplodinotus grunniens* from Lake Ontario, Canada, associated with viral haemorrhagic septicaemia virus, Type IV. *Dis. Aquat. Org.*, **76**, 99–111.
- MEIER W. & JØRGENSEN P.E.V. (1980). Isolation of VHS virus from pike fry (*Esox lucius*) with hemorrhagic symptoms. *In: Fish Diseases, Third COPRAQ Session, Ahne W., ed. Springer-Verlag, Berlin, Germany and New York, USA*, 8–17.
- MEYERS T.R., SHORT S. & LIPSON K. (1999). Isolation of the North American strain of viral hemorrhagic septicaemia virus (VHSV) associated with epizootic mortality in two new host species of Alaskan marine fish. *Dis. Aquat. Org.*, **38**, 81–86.
- MEYERS T.R. & WINTON J.R. (1995). Viral hemorrhagic septicaemia virus in North America. *Ann. Rev. Fish Dis.*, **5**, 3–24.
- NISHIZAWA T., IIDA H., TAKANO R., ISSHIKI T., NAKAJIMA K. & MUROGA K. (2002). Genetic relatedness among Japanese, American and European isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) based on partial G and P genes. *Dis. Aquat. Org.*, **48**, 143–148.
- NISHIZAWA T., SAVAS H., ISIDAN H., ÜSTÜNDAG C., IWAMOTO H. & YOSHIMIZU M. (2006). Genotyping and pathogenicity of viral hemorrhagic septicaemia virus from free-living turbot (*Psetta maxima*) in a Turkish coastal area of the Black Sea. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 2373–2378.
- OLESEN N.J. (1998). Sanitation of viral haemorrhagic septicaemia (VHS). *J. Appl. Ichthyol.*, **14**, 173–177.
- OLESEN N.J. & JØRGENSEN P.E.V. (1991). Rapid detection of viral haemorrhagic septicaemia virus in fish by ELISA. *J. Appl. Ichthyol.*, **7**, 183–186.
- OLESEN N.J. & KORSHOLM H. (1997). Control measures for viral diseases in aquaculture: eradication of VHS and IHN. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **17**, 229–233.
- OLESEN N.J., LORENZEN N. & JØRGENSEN P.E.V. (1993). Serological differences among isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus detected by neutralizing monoclonal and polyclonal antibodies. *Dis. Aquat. Org.*, **16**, 163–170.
- OLESEN N.J. & VESTERGÅRD JØRGENSEN P.E. (1982). Can and do herons serve as vectors for Egtved virus? *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **2**, 48.
- OLESEN N.J. & VESTERGÅRD JØRGENSEN P.E. (1992). Comparative susceptibility of three fish cell lines to Egtved virus, the virus of viral haemorrhagic septicaemia (VHS). *Dis. Aquat. Org.*, **12**, 235–237.
- PARRY L. & DIXON P.F. (1997). Stability of nine viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) isolates in seawater. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **17**, 31–36
- PEDDIE S., MCLAUCHLAN P.E., ELLIS A.E. & SECOMBES C.J. (2003). Effect of intraperitoneally administered IL-1b-derived peptides on resistance to viral haemorrhagic septicaemia in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Org.*, **56**, 195–200.
- PETERS F. & NEUKIRCH M. (1986). Transmission of some fish pathogenic viruses by the heron, *Ardea cinerea*. *J. Fish Dis.*, **9**, 539–544.
- ROSS K., MCCARTHY U., HUNTLY P.J., WOOD B.P., STUART D., ROUGH E.I., SMAIL D.A. & BRUNO D.W. (1994). An outbreak of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in turbot (*Scophthalmus maximus*) in Scotland. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **14**, 213–214.
- SCHLOTTFELDT H.J. & AHNE W. (1988). Epizootics in brown trout (*Salmo trutta fario*) caused by VHSV-F1. *J. Appl. Ichthyol.*, **4**, 147–148.
- SCHLOTTFELDT H.-J., AHNE W., JØRGENSEN P.E.V. & GLENDE W. (1991). Occurrence of viral haemorrhagic septicaemia in turbot (*Scophthalmus maximus*) – a natural outbreak. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **11**, 105–107.

SKALL H.F., OLESEN N.J. & MELLERGAARD S. (2005). Viral haemorrhagic septicaemia virus in marine fish and its implications for fish farming – a review. *J. Fish Dis.*,**28**, 509–529.

SNOW M., BAIN N., BLACK J., TAUPIN V., CUNNINGHAM C.O., KING J.A., SKALL H.F. & RAYNARD R.S. (2004). Genetic population structure of marine viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV). *Dis. Aquat. Org.*,**61**, 11–21.

SNOW M., CUNNINGHAM C.O., MELVIN W.T. & KURATH G. (1999). Analysis of the nucleoprotein gene identifies distinct lineages of viral haemorrhagic septicaemia virus within the European marine environment. *Virus Res.*,**63**, 35–44.

SOLIMAN H. & EL-MATBOULI M. (2006). Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for rapid detection of viral hemorrhagic septicaemia virus (VHS), *Vet. Microbiol.*,**114**, 205–213.

STONE D.M., FERGUSON H.W., TYSON P.A., SAVAGE J., WOOD G., DODGE M.J., WOOLFORD G., DIXON P.F., FEIST S.W. & WAY K. (2008). The first report of viral haemorrhagic septicaemia in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in the United Kingdom, *J. Fish Dis.*,**31**, 775–784

TAKANO R., NISHIZAWA T., ARIMOTO M. & MUROGA K. (2000). Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from wild Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*,**20**, 186–192.

THOMPSON T.M., BATTS W.N., FAISAL M., BOWSER P., CASEY J.W., PHILLIPS K., GARVER K.A., WINTON J. & KURATH G. (2001). Emergence of Viral hemorrhagic septicemia virus in the North American Great Lakes region is associated with low viral genetic diversity. *Dis. Aquat. Org.*, **96** (1), 29–43.

TRAXLER G.S., KIESER D. & RICHARD J. (1999). Mass mortality of pilchard and herring associated with viral hemorrhagic septicemia virus in British Columbia, Canada. *Fish Health Sect. Am. Fish Soc. Newslett.*,**27**, 3–4.

WALKER PJ, BENMANSOUR A, DIETZGEN R *ET AL.* (2000). Family Rhabdoviridae. *In: Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L. *et al.*, eds. 563–583.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA), Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS), Veterinary Service (VS). Species affected by the Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS) Federal Order, Available at: http://dnr.wi.gov/fish/documents/vhs_fedorderModList.pdf

UNITED STATES DEPARTMENT OF THE INTERIOR, US GEOLOGICAL SURVEY(2007). Detection of viral hemorrhagic septicemia virus. USGS FS 2007-3055. US Department of the Interior, US Geological Survey. Fact Sheets.

WOLF K. (1988). Viral hemorrhagic septicemia. *In: Fish Viruses and Fish Viral Diseases*. Cornell University Press, Ithaca, New York, USA, 217–249.

*
* *

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