

## CAPÍTULO 2.3.11.

# ENCEFALOPATÍA Y RETINOPATÍA VIRALES

## 1. Ámbito de aplicación

A efectos de este capítulo, la enfermedad de la encefalopatía y retinopatía virales (ERV), también denominada necrosis nerviosa viral (NNV), se considera una enfermedad grave de varias especies de peces marinos, caracterizada por importantes pérdidas asociadas a lesiones de vacuolación del sistema nervioso central y de la retina.

## 2. Información sobre la enfermedad

### 2.1. Factores del agente

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

El agente causal de la ERV o NNV se identificó por primera vez como nuevo miembro de la familia Nodaviridae tras la purificación de tejidos encefálicos de larvas de jurel dentón afectadas, y se adoptó la denominación de virus de la necrosis nerviosa del jurel dentón (VNNJD) (Mori *et al.*, 1992). Posteriormente, se han purificado otros agentes causales de la ERV/NNV de algunas especies de peces afectados (Chi *et al.*, 2001; Comps *et al.*, 1994). La taxonomía actual clasifica los virus en el género Betanodavirus, dentro de la familia Nodaviridae (Schneemann *et al.*, 2005). Los betanodavirus son virus sin envoltura y esféricos, y miden unos 25 nm de diámetro. El genoma está formado por dos moléculas de ARNss de sentido positivo: ARN1 (3,1 kb) codifica la replicasa (110 kDa) y ARN2 (1,4 kb) codifica la proteína de recubrimiento (42 kDa). Están documentadas las secuencias de nucleótidos completas tanto del ARN1 como del ARN2 del VNNJD y de otros virus (Iwamoto *et al.*, 2001; 2004; Sommerset & Nerland, 2004; Tan *et al.*, 2001). En base al análisis filogenético de la región variable T4 del ARN 1, se han identificado virus de tipo VNNJD (virus de la necrosis nerviosa del jurel dentón), virus de tipo VNNTR (virus de la necrosis nerviosa de Takifugu rubripes [especie de pez globo]), virus de tipo VNNVM (virus de la necrosis nerviosa de Veasper moseri), y virus de tipo VNNEA (virus de la necrosis nerviosa de mero de pintas rojas [*Epinephelus akaara*]) (Nishizawa *et al.*, 1997). Los genotipos identificados se correlacionan en parte con tres serotipos distintos que se han identificado mediante neutralización del virus con anticuerpos policlonales, con distintas especies hospedadoras y con la temperatura óptima de crecimiento in vitro (Iwamoto *et al.* 2000; Mori *et al.* 2003). Además, se ha propuesto otro genotipo, que incluye una cepa de betanodavirus de rodaballo (VNR) (Johansen *et al.*, 2004). Para evitar confusión respecto a la taxonomía, Thiéry *et al.* (2004) han propuesto una nomenclatura numérica (agrupación I, II, III y IV), independiente del origen de la especie hospedadora. En la Tabla 2.1., se indican los genotipos oficiales, las especies hospedadoras diana y la temperatura óptima de crecimiento in vitro (Iwamoto *et al.*, 2000).

**Tabla 2.1.** Variantes genotípicas y fenotípicas de betanodavirus

Genotipo	Serotipo	Pez hospedador diana	Temperatura óptima de crecimiento
VNNJD	A	Jurel dentón	20–25°C
VNNTR	B	<i>Takifugu rubripes</i> (especie de pez globo)	20°C
VNNVM	C	Peces de aguas frías: halibut, bacalao del Atlántico, lenguados, etc.	15–20°C
VNNEA	C	Peces de aguas cálidas: perca gigante, lubina, meros, etc.	25–30°C

### 2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

Los betanodavirus son muy resistentes en el medio acuático y pueden sobrevivir durante mucho tiempo en aguas marinas a bajas temperaturas (Frerichs *et al.*, 2000), mientras que a 25°C o más, la supervivencia resulta considerablemente afectada. La contaminación del medio acuático tras la aparición de un brote puede persistir durante largos periodos y suponer una fuente de infección para especies salvajes susceptibles. En peces congelados, el virus puede persistir durante largos periodos y puede representar un posible riesgo si se utiliza este pescado crudo para alimentar a otros peces (Mori *et al.*, 2005). Fuera del ambiente acuático, los betanodavirus parecen perder su citopatogenicidad muy fácilmente. En condiciones de desecación, se ha observado >99% de inactivación tras un periodo de 7 días a 21°C (Maltese *et al.*, 2007).

### 2.1.3. Estabilidad del agente (métodos eficaces de inactivación)

Los desinfectantes de uso común, como el hipoclorito de sodio, el yodo, el peróxido de hidrógeno y el cloruro de benzalconio son muy útiles para inactivar betanodavirus, mientras que la formalina no es demasiado útil (Frerichs *et al.* 2000). Se ha utilizado ozono para evitar o reducir la contaminación vírica en la superficie de los huevos (Grotmol & Totland, 2000), y el agua contaminada por virus puede esterilizarse de forma eficaz mediante exposición a luz UV (Frerichs *et al.*, 2000).

### 2.1.4. Ciclo de vida

La presencia de reservorios en la naturaleza es muy razonablemente la fuente original de infección de poblaciones de piscifactoría, mientras que el comercio de juveniles infectados supone la forma más frecuente de propagación de grandes cantidades de partículas víricas en el medio. Se sabe poco sobre el ciclo de vida de los betanodavirus. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en infecciones experimentales llevadas a cabo por distintos autores, lo más probable es que el virus invada el hospedador por el epitelio intestinal y el sistema nervioso periférico, y que alcance muy pronto los tejidos del sistema nervioso central, donde puede inducir la muerte del hospedador o permanecer durante varios años en los supervivientes (Johansen *et al.*, 2004). Los peces muertos descompuestos pueden diseminar el virus en el medio, que desde ahí llegará a distintos vectores biológicos. Además, los peces enfermos pueden resultar fácilmente ingeridos por depredadores que, además de poder resultar infectados, pueden diseminar el virus con las heces contaminadas. Se ha sospechado mucho de la transmisión vertical en algunas especies (Arimoto *et al.*, 1992; Comps *et al.*, 1994; Grotmol & Totland, 2000; Mushiake *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 2000); en este caso, el virus puede alcanzar las gónadas en desarrollo, donde se ha detectado con frecuencia (Dalla Valle *et al.*, 2000; Mushiake *et al.*, 1994; Nishizawa *et al.*, 1996) e infectar los huevos y el líquido seminal (Nishizawa *et al.*, 1994). Fuera del hospedador, los betanodavirus pueden persistir durante largos periodos de tiempo en el medio acuático solo a bajas temperaturas (Frerichs *et al.*, 2000).

## 2.2. Factores del hospedador

### 2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Hasta la fecha, esta enfermedad se ha notificado en más de 50 especies de peces, principalmente marinas, y las más afectadas has sido el jurel dentón, la lubina, los meros y los peces planos. También se han documentado unos pocos brotes en piscifactorías de agua dulce (Bovo *et al.*, 2011; Chi *et al.*, 2003). Las especies de peces afectadas de forma natural por la ERV se indican en la Tabla 2.2; otras especies de peces de agua dulce han desarrollado signos clínicos tras una infección experimental (Furusawa *et al.*, 2007), lo cual sugiere la posibilidad de nuevos hospedadores, en concreto en el futuro cuando se escojan nuevas especies para acuicultura.

**Tabla 2.2.** Especies de peces afectadas por VER/NNV

Orden	Familia	Nombre común	Nombre científico
Acipenseriformes	Acipenseridae	Esturión del Danubio	<i>Acipenser gueldenstaedti</i>
Anguilliformes	Anguillidae	Anguila europea	<i>Anguilla anguilla</i>
Gonorynchiformes	Chanidae	Sabalote	<i>Chanos chanos</i>
Siluriformes	Siluridae	-	<i>Parasilurus asotus</i>
	Siluridae	-	<i>Tandanus tandanus</i>
Gadiformes	Gadidae	Bacalao del Atlántico	<i>Gadus morhua</i>

<b>Orden</b>	<b>Familia</b>	<b>Nombre común</b>	<b>Nombre científico</b>
	Gadidae	Eglefino	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>
Cyprinodontiformes	Poeciliidae	-	<i>Poecilia reticulata</i>
Perciformes	Acanthuridae	Navajón carcelario	<i>Acanthurus triostegus</i>
	Apogonidae	-	<i>Apogon exostigma</i>
	Anarhichadidae	Perro pintado	<i>Anarhichas minor</i>
	Carangidae	Jurel dentón	<i>Pseudocaranx dentex</i>
Perciformes		pez de limón	<i>Seriola dumerili</i>
		pámpano palometa	<i>Trachinotus falcatus</i>
		-	<i>Trachinotus blochii</i>
	Centropomatidae	Perca gigante	<i>Lates calcarifer</i>
		Serránido japonés	<i>Lateolabrax japonicus</i>
	Cichlidae	Tilapia	<i>Oreochromis niloticus</i>
	Eleotridae	-	<i>Oxyeleotris lineolata</i>
	Ephippidae	-	<i>Platax orbicularis</i>
	Latridae	-	<i>Latris Lineata</i>
	Lutjanidae	Pargo carmesí	<i>Lutjanus erythropterus</i>
		Pargo de manglar	<i>Lutjanus argentimaculatus</i>
	Malacanthidae	-	<i>Branchiostegus japonicus</i>
	Mugilidae	Mugil	<i>Mugil cephalus</i>
		Galupe	<i>Liza aurata</i>
		Salmonete de roca	<i>Mullus barbatus</i>
	Oplegnathidae	Sama de roca	<i>Oplegnathus fasciatus</i>
		-	<i>Oplegnathus punctatus</i>
	Percichthyidae	Lubina	<i>Dicentrarchus labrax</i>
	Rachicentridae	Cobia	<i>Rachycentron canadum</i>
	Sciaenidae	Corvinón ocelado	<i>Sciaenops ocellatus</i>
	Sciaenidae	Verrugato fusco	<i>Umbrina cirrosa</i>
	Sciaenidae	Corvinata blanca	<i>Atractoscion nobilis</i>
	Scombridae	Atún de aleta azul del Pacífico	<i>Thunnus orientalis</i>
	Serranidae	Mero de pintas rojas	<i>Epinephelus akaara</i>
		-	<i>E. awoara</i>
		-	<i>E. septemfasciatus</i>
		-	<i>E. fuscoguttatus</i>
		Mero malabárico	<i>E. malabaricus</i>
		-	<i>E. marginatus</i>
		-	<i>E. moara</i>
		Mero lutria	<i>E. tauvina</i>
		Obispo coronado	<i>E. lanceolatus</i>
		-	<i>Chromileptes altivelis</i>

Orden	Familia	Nombre común	Nombre científico
		Cherna de ley	<i>Epinephelus aeneus</i>
		-	<i>E. coioides</i>
	Sparidae	Dorada	<i>Sparus aurata</i>
	Cichlidae	Tilapia del Nilo	<i>Oreochromis niloticus niloticus</i>
Tetraodontiformes	Monacantidae	-	<i>Stephanolepis cirrifer</i>
Tetraodontiformes	Tetraodontidae	Pez globo (especie de)	<i>Takifugu rubripes</i>
Pleuronectiformes	Pleuronectidae	-	<i>Verasper moseri</i>
	Soleidae	Lenguado común	<i>Solea solea</i>
	Scophthalmidae	Rodaballo	<i>Psetta maxima</i>
	Scophthalmidae	Falso halibut del Japón	<i>Paralichthys olivaceus</i>
	Scophthalmidae	Halibut	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>
Scorpaeniformes	Sebastidae	Corvinata blanca	<i>Sebastes oblongus</i>

Para conocer las fuentes, por favor contáctese con el Laboratorio de Referencia de la OIE.

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

Aunque esta enfermedad afecta principalmente a larvas y juveniles, también se han observado importantes mortalidades en peces de tamaño comercial y adultos, como en el caso de *Hippoglossus hippoglossus*, *Epinephelus septemfasciatus* y *Dicentrarchus labrax*.

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

En piscifactorías infectadas, la probabilidad de detectar el agente causal normalmente es más alta en juveniles que en peces de más edad, mientras que durante la época del desove, el virus puede hallarse en las gónadas de los reproductores (Dalla Valle *et al.*, 2000; Mushiake *et al.*, 1994). Por ello, los programas de vigilancia deben incluir peces jóvenes, tejidos gonadales, líquido ovárico y líquido espermático.

### 2.2.4. Órganos diana y tejidos afectados

El encéfalo, la medula espinal y la retina se consideran los órganos diana en los que el virus se replica activamente, causando una gran vacuolación tisular. Se han descrito inclusiones intracitoplasmáticas en las células encefálicas de lubina (*Dicentrarchus labrax*), perca gigante (*Lates calcarifer*), *Oplegnathus fasciatus* y mero malabárico (*Epinephelus malabaricus*) (Munday *et al.*, 2002). El virus también se ha detectado en gónadas de reproductores (Dalla Valle *et al.*, 2000; Mushiake *et al.*, 1994; Nishizawa *et al.*, 1996). En algunas especies, como el jurel dentón, la lubina, *Verasper moseri*, *E. septemfasciatus* y halibut, es probable que los reproductores sean el reservorio de virus más constante y la fuente más importante de infección para larvas y juveniles de peces (Mushiake *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 2000). Es posible que el virus no se replique ni resida en los órganos reproductores en todo momento, sino que se halle ahí tras la aparición de condiciones estresantes (Mushiake *et al.*, 1994).

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

En el perro pintado (Anarhichas minor) infectado experimentalmente por inmersión, el virus se ha detectado en el encéfalo al menos hasta las 16 semanas post-exposición (Johansen *et al.*, 2003). Tras un brote natural en halibut, se ha estudiado el avance de la infección en supervivientes a lo largo de un periodo de observación de 1 año (Johansen *et al.*, 2002). El porcentaje de peces que han dado positivo en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y en el enzimoimmunoanálisis (ELISA) ha permanecido alto a lo largo de todo el periodo, y el virus se ha vuelto a aislar de un pez infectado subclínicamente al final del año, lo cual sugiere que los peces que sobreviven a la infección pueden portar el virus durante un largo periodo de tiempo y podrían llegar a transmitir la infección a otros peces. Recientemente se ha establecido una línea celular (BB) derivada de tejido encefálico de perca gigante y ofrecerá un modelo válido para estudiar la infección vírica y los mecanismos de replicación tanto in vivo como in vitro (Chi *et al.*, 2005).

### 2.2.6. Vectores

Teniendo en cuenta que el agua es el principal vector abiótico, los betanodavirus se pueden propagar fácilmente, durante un brote clínico, de una parte de la piscifactoría a otra directamente por el agua y contaminando personal, redes, botas y demás equipo. Deben establecerse medidas de bioseguridad suficientes, en concreto dentro de los viveros (Mori *et al.*, 1998). En mar abierto, la transmisión de la infección de un lugar a otro deriva de la marea, de las corrientes dominantes, de los barcos que visitan distintas piscifactorías y de los peces salvajes migratorios. Debido a la alta resistencia del virus a las condiciones ácidas y a temperaturas de 37°C (Frerichs *et al.*, 2000), las aves ictiófagas deben considerarse posibles vectores. Además, dado el gran volumen de comercio, debe prestarse especial atención a los moluscos procedentes de zonas contaminadas. Este virus también se ha detectado en gusanos de arena pertenecientes a la familia Nereidae, género *Nereis*, recogidos cerca de una piscifactoría infectada (Bovo *et al.*, observaciones no publicadas). El gran mercado internacional de este tipo de gusanos como cebo también debe considerarse un riesgo añadido de propagación de betanodavirus de una zona a otra.

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

Aunque el papel de los portadores salvajes todavía no se comprende del todo, se han publicado datos sobre la detección de betanodavirus en especies salvajes de distintas regiones (Barker *et al.*, 2002; Ciulli *et al.*, 2006; Gometz *et al.*, 2004). Todavía no está claro si los ejemplares infectados deben considerarse simplemente un reservorio del virus en el que el agente patógeno se puede replicar sin causar mortalidad alguna, o bien considerarse animales susceptibles. Por ello, se precisa llevar a cabo pruebas de infección experimental, con el fin de comprender mejor el significado de la infección por Betanodavirus en los peces salvajes.

## 2.3. Patrón de la enfermedad

### 2.3.1. Mecanismos de transmisión

Esta enfermedad se puede reproducir en peces sanos por co-habitación, inmersión o inyección (Munday *et al.*, 2002). La transmisión horizontal, a menudo observada en estado salvaje, debe considerarse la forma más frecuente de transmisión de la enfermedad por agua contaminada. Además, existen ciertos indicios de transmisión vertical de reproductores a su descendencia en el jurel dentón, la lubina, la perca gigante, *Verasper moseri*, halibut y *E. septemfasciatus*, como se ha mencionado anteriormente (Mori *et al.*, 1998; Mushiake *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 2000). Este hecho se refleja principalmente en la temprana aparición de la enfermedad clínica y en la detección de material genético vírico en gónadas de animales adultos (Dalla Valle *et al.*, 2000; Mushiake *et al.*, 1994; Nishizawa *et al.*, 1996); todavía no se ha demostrado definitivamente si el virus se encuentra dentro, o bien fuera de los huevos en forma de contaminante superficial. Otra posibilidad en cuanto a la transmisión de la enfermedad es la de la alimentación de reproductores con pescado crudo (Mori *et al.*, 2005). También hay muchos indicios de que la ozonación de huevos fecundados de reproductores infectados elimina o reduce la tasa de infección en la descendencia, lo cual indica que podría producirse transmisión vertical en forma de contaminación de la superficie de los huevos, al menos en algunas especies.

### 2.3.2. Prevalencia

Se dispone de muy pocos datos sobre la prevalencia de la enfermedad. En Canadá, ciertas poblaciones de peces salvajes son sospechosas de actuar como auténticos reservorios naturales; de hecho, el virus ya se ha detectado por PCR en un 0,23% de la población salvaje de *Pleuronectes americanus* (Barker *et al.*, 2002). En Japón, una muestra representativa de 30 especies recogida en dos bahías distintas confirmó que la mayoría de peces de piscifactoría y salvajes daban positivo (Gometz *et al.*, 2004).

### 2.3.3. Distribución geográfica

La enfermedad se ha notificado oficialmente en muchas regiones, como países del sur y el este asiático (China [Rep. Pop. de], Taipei chino, India, Indonesia, Irán, Japón, Corea, Malasia, Filipinas, Tailandia, Vietnam), de Oceanía (Australia, Tahití), del Mediterráneo (Francia, Grecia, Israel, Italia, Malta, Portugal, España, Túnez), el Reino Unido, Noruega, el Caribe y Norteamérica (Canadá, EE.UU.) (Munday *et al.*, 2002). Además, se ha documentado la sospecha de mortalidades causadas por betanodavirus en meros salvajes que viven a lo largo de las costas senegalesa y libia.

### 2.3.4. Mortalidad y morbilidad

Existen considerables variaciones en la edad a la cual la enfermedad se observa por primera vez y en el periodo a lo largo del cual se produce mortalidad (Munday *et al.*, 2002). En general, cuanto antes aparecen los signos clínicos, mayor es la mortalidad. En el jurel dentón (*Pseudocaranx dentex*), se observan mortalidades con más frecuencia en los primeros 10 días tras el desove, mientras que la

aparición más temprana de la enfermedad tiene lugar 2 días post-desove, lo cual da lugar a una pérdida de casi todas las larvas. En la lubina (*Dicentrarchus labrax*) no suele observarse mortalidad hasta unos 30 días post-desove, pero pueden aparecer brotes incluso en peces de tamaño comercial. La mortalidad depende de la edad. Cuando resultan afectados los estadios larvarios, se observa la mayor mortalidad, a menudo del 100%, mientras que en los juveniles y en peces de más edad en general se han comunicado menores pérdidas.

#### **2.3.5. Factores ambientales**

La temperatura del agua es un factor importante, que puede afectar de forma significativa a la aparición de los signos clínicos. El efecto de la temperatura está especialmente bien estudiado en el cultivo de la lubina, y anteriormente la enfermedad se denominaba Enfermedad de Verano. La correlación entre la aparición de signos clínicos y la temperatura del agua está parcialmente respaldada por estudios *in vitro* (Iwamoto *et al.*, 2000). En el genotipo VNNEA parece existir especificidad de hospedador por peces de aguas cálidas, y en el genotipo VNNVM, por peces de aguas frías. En larvas de jurel dentón afectadas por el VNNJD (temperatura óptima de crecimiento *in vitro*: 20-25°C) no se ha observado diferencia de mortalidad entre distintos grupos criados a distintas temperaturas del agua, de entre 20°C y 26°C, mientras que en *Epinephelus akaara* infectado por el VNNEA (temperatura óptima de crecimiento *in vitro*: 25-30°C) la temperatura del agua en la que se crían los peces (16-28°C) puede influir en el desarrollo de la enfermedad. En mero jorobado, se ha observado una mayor mortalidad y una aparición más temprana de la enfermedad a mayores temperaturas, mientras que a temperaturas del agua superiores a los 31°C, se ha inhibido la proliferación del VNNEA (Yuasa *et al.*, 2007). Por otra parte, la infección por NVHA (Nodavirus del halibut) (genotipo VNNVM, temperatura óptima: 15-20°C) en el halibut tiene lugar a 6°C. La salinidad no parece influir en absoluto en la aparición de la enfermedad, puesto que se han observado brotes en especies de agua dulce.

### **2.4. Control y prevención**

Es posible que solo se consiga prevenir la enfermedad evitando la exposición de poblaciones de piscifactoría a los agentes causales. Desafortunadamente, este método es muy difícil de aplicar en instalaciones de engorde, pero puede ser muy útil en viveros siempre que utilicen agua libre del virus e introduzcan larvas procedentes de reproductores libres del virus.

#### **2.4.1. Vacunación**

En distintos estudios se ha observado que la inmunización con proteína vírica recombinante de recubrimiento expresada por *Escherichia coli* o con partículas de tipo vírico en un sistema de expresión de baculovirus o con virus inactivado por formalina puede ser eficaz para controlar la enfermedad (Tanaka *et al.*, 2001; Thiéry *et al.*, 2006; Yamashita *et al.*, 2005). No obstante, actualmente no se dispone de ninguna vacuna comercial. En un estudio se observó que la infección primaria con un aquabirnavirus avirulento suprimió de forma eficaz la infección secundaria por betanodavirus, lo cual sugiere el uso del aquabirnavirus como posible inmunomodulador (Yamashita *et al.*, 2009).

#### **2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas**

No se dispone de ninguno.

#### **2.4.3. Inmunoestimulación**

No se dispone de datos.

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

No se dispone de datos.

#### **2.4.5. Repoblación con especies resistentes**

No se dispone de datos relativos a la selección de linajes resistentes entre las especies susceptibles.

#### **2.4.6. Agentes bloqueantes**

No se dispone de datos.

#### **2.4.7. Desinfección de huevos y larvas**

El lavado de huevos fecundados en agua de mar tratada con ozono o el tratamiento con ozono o cloración del agua utilizada para el cultivo parecen ser eficaces para el control de la enfermedad en la

producción de larvas de jurel dentón, *Verasper moseri* y halibut (Arimoto *et al.*, 1996; Grotmol & Totland, 2000b; Mori *et al.*, 1998; Watanabe *et al.*, 2000).

#### 2.4.8. Prácticas generales de manejo

Además de las prácticas generales de higiene, como el tratamiento con luz UV del agua que entra en los viveros, la adopción de barreras sanitarias, el descanso periódico y la desinfección de los tanques y los filtros biológicos, la desinfección de las instalaciones y los utensilios y el evitar alimentar a los peces con pescado crudo, es importante reducir los factores estresantes mejorando el método de inducción del desove, lo cual incluye aportar suficiente alimento a los reproductores y disminuir la densidad de población de larvas y juveniles (Mori *et al.*, 1998; Mushiake *et al.*, 1994, Nishizawa *et al.*, 1994); no obstante, en algunas ocasiones se ha observado que la PCR no ha detectado la infección vírica en desovadores determinados (Nishizawa *et al.*, 1996).

Para controlar la ERV en *Verasper moseri* también se ha propuesto una estrategia de control integrado, que incluya el uso de ELISA para analizar el nivel de actividad de anticuerpos específicos en cada reproductor, la PCR en productos sexuales y la desinfección de huevos embrionados con agua ozonada (Watanabe *et al.*, 2000).

Desafortunadamente, la detección de anticuerpos específicos mediante ELISA o pruebas de neutralización no se ha investigado lo suficiente, y se sabe muy poco sobre la interpretación de los resultados de la serología.

En la industria de la producción de lubina, se ha sugerido que la repoblación de instalaciones de engorde situadas en zonas infectadas debe llevarse a cabo durante el otoño, cuando el número de brotes clínicos está disminuyendo.

### 3. Obtención de muestras

#### 3.1. Elección de ejemplares

Los peces que presentan una natación anómala, junto con una pérdida del apetito y una alteración progresiva de la pigmentación, deben considerarse potencialmente infectados, y a efectos del diagnóstico para confirmar la sospecha solo deben escogerse estos ejemplares, además de peces moribundos y que acaben de morir. Se suelen enviar al laboratorio peces enteros, excepto si los ejemplares son muy grandes, en cuyo caso puede enviarse solo la cabeza. En los programas de vigilancia, debe adoptarse un muestreo de peces aparentemente sanos ceñido a una pauta que permita significación estadística.

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

A la espera del envío al laboratorio, las muestras deben guardarse a 4°C (2-3 días) o congeladas a -20°C o -80°C (2-3 semanas).

#### 3.3. Combinación de varias muestras

A efectos del diagnóstico, son aceptables las muestras combinadas formadas por 5-10 peces con signos clínicos cada una. Cuando se busquen posibles portadores, deben analizarse peces individualmente.

#### 3.4. Órganos o tejidos de elección

El encéfalo y los ojos son los tejidos diana a efectos del diagnóstico. Cuando se sospecha de estadios larvarios o de muy corta edad (<1 cm), puede procesarse el cuerpo entero. Cuando la longitud del pez se sitúe entre 1 y 6 cm, debe separarse la cabeza entera, incluidos encéfalo y ojos, del resto del cuerpo y utilizarse como muestra. En el caso de peces más grandes, la muestra solo debe consistir en el encéfalo y los ojos.

Los órganos distintos del encéfalo y los ojos deben considerarse no adecuados para el diagnóstico. No obstante, cuando deben analizarse reproductores mediante métodos no invasivos, los huevos, los líquidos ovárico y seminal y las biopsias de gónada deben considerarse muestras adecuadas, aunque solo serán concluyentes los resultados positivos.

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

El riñón, el bazo y el corazón, que normalmente se recomiendan para la detección de varios agentes víricos de los peces, no son adecuados para el diagnóstico de la ERV o NNV.

## 4. Métodos de diagnóstico

Durante varios años, el método de referencia para detectar la ERV o NNV ha sido el aislamiento de agentes víricos en cultivos celulares seguido de una identificación inmunológica o molecular. Hoy en día existen varias herramientas moleculares descritas que se caracterizan por una alta sensibilidad, pero su uso definitivo precisa una mayor validación mediante pruebas de eficiencia interlaboratoriales, o mediante pruebas de equivalencia respecto al método de referencia.

### 4.1. Métodos de diagnóstico de campo

#### 4.1.1. Signos clínicos

En los peces infectados no se observan signos externos en la superficie corporal ni las branquias, excepto una progresiva alteración de la pigmentación descrita en unas pocas especies por varios autores. En la lubina (*Dicentrarchus labrax*), en ocasiones se han observado erosiones cutáneas en las zonas mandibular y craneal, posiblemente debidas a un traumatismo causado por una perturbación visual.

#### 4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Los peces infectados presentan gran variedad de patrones de conducta natatoria errática, ya que se desplazan en espiral, se arremolinan o quedan panza arriba cuando están en reposo (a veces con la vejiga natatoria inflada), o bien yacen en el fondo del tanque o nadan rápidamente en círculos o en línea recta hacia adelante. Los peces planos suelen mostrar menos signos evidentes. Los peces pueden permanecer durante largos periodos en el fondo doblando el cuerpo con la cabeza y la cola levantadas. A menudo se ha observado pérdida del apetito.

### 4.2. Métodos clínicos

#### 4.2.1. Anatomopatología macroscópica

No se han asociado lesiones macroscópicas a la infección, excepto un hiperinflado de la vejiga natatoria, que se ha observado con frecuencia en distintas especies, sobre todo durante las fases larvarias.

#### 4.2.2. Bioquímica clínica

No se dispone de datos.

#### 4.2.3. Anatomopatología microscópica

Los hallazgos microscópicos más frecuentes detectados en distintas especies consisten en vacuolación y necrosis de células nerviosas de la medula espinal, el encéfalo y/o la retina. Estas lesiones son de lejos más llamativas en las larvas y los juveniles, mientras que en peces sintomáticos de mayor edad a veces son muy infrecuentes o difíciles de detectar. El proceso inflamatorio suele ser muy discreto y la presencia de macrófagos posiblemente se debe a una infección secundaria.

#### 4.2.4. Preparaciones húmedas

No aplicable.

#### 4.2.5. Frotis

No aplicable.

#### 4.2.6. Cortes fijados

No aplicable.

#### 4.2.6. Microscopía electrónica/citopatología

En el encéfalo, la medula espinal y la retina de los animales intensamente infectados pueden observarse partículas víricas subesféricas de unos 25 nm de diámetro. Los viriones pueden observarse libres en el citoplasma o asociados a membranas reticuloendoplásmicas, principalmente en los astrocitos del tejido nervioso, oligodendrocitos y microglíocitos. No obstante, dada la escasa sensibilidad analítica, este método no es una herramienta diagnóstica fiable.



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

#### 4.3.1. Métodos directos de detección

La PCR con transcripción inversa (RT-PCR) es el método más rápido y cómodo de diagnosticar peces infectados clínicamente, mientras que la PCR anidada o la PCR en tiempo real son herramientas útiles para diagnosticar peces infectados subclínicamente, como portadores. Los protocolos basados en la PCR aplicados al diagnóstico de enfermedades víricas tienen como ventaja un procesado rápido, rapidez de comunicación de resultados y una alta sensibilidad y especificidad, y por tanto son herramientas adecuadas para la detección rápida de betanodavirus en peces infectados tanto clínicamente como subclínicamente. No obstante, estos métodos precisan una mayor validación mediante pruebas de eficiencia interlaboratoriales. Por ello, el aislamiento en cultivo celular seguido de identificación por inmunotinción o molecular sigue constituyendo el método de referencia a efectos del diagnóstico.

Además, el virus se ha identificado mediante inmunofluorescencia (IF) aplicada a improntas de encéfalo o cortes congelados y mediante inmunohistoquímica (IHC) en encéfalo o retina. La ICH es la prueba más adecuada para la detección del virus en material fijado para análisis histológico.

Se han publicado métodos basados en ELISA de detección de antígenos de betanodavirus en tejidos diana (Arimoto *et al.*, 1992).

##### 4.3.1.1. Métodos microscópicos

###### 4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

No se dispone de datos.

###### 4.3.1.1.2. Frotis

Se ha observado que las improntas de encéfalo teñidas según la prueba de la IF clásica sean un método adecuado para la detección de la infección por betanodavirus. Dado que no se conoce su sensibilidad, este método se recomienda solo para peces afectados clínicamente.

###### 4.3.1.1.2.1. Prueba de la inmunofluorescencia indirecta en improntas de encéfalo

Este protocolo se ha aplicado con ventajas durante mucho tiempo en el Laboratorio de Referencia de la OIE, pero el procedimiento no se ha validado adecuadamente en cuanto a sensibilidad y reproducibilidad. Este método se recomienda solo en peces afectados clínicamente:

- i) Se obtiene encéfalo de peces afectados clínicamente (al menos tres ejemplares).
- ii) Se utiliza papel absorbente para eliminar el posible exceso de líquido.
- iii) Se llevan a cabo improntas suaves sobre la superficie del porta (cinco de cada uno de los tres ejemplares).
- iv) Se dejan secar las improntas al aire.
- v) Se fijan las improntas en etanol absoluto o acetona fría (-20°C) durante 10 minutos.
- vi) Se enjuagan tres veces con PBS-Tween 80 (PBST) al 0,05%.
- vii) Se cubren las improntas con el anticuerpo primario (es decir, suero inmune de conejo anti-betanodavirus) y se incuban durante 30 minutos a 37°C en una cámara húmeda.
- viii) Se enjuagan tres veces con PBST al 0,05%.
- ix) Se cubren las improntas con un anticuerpo comercial secundario conjugado a isotiocianato de fluoresceína (es decir, anticuerpo anti-Ig de ratón) y se incuban a 37°C durante 30 minutos.
- x) Se enjuagan tres veces con PBST.
- xi) Se montan con un cubreobjetos utilizando solución salina de glicerol, pH 8,5.
- xii) Se observan en un microscopio de IF a 100–250×.

###### *Interpretación de los resultados:*

*Muestras positivas:* son fáciles de detectar células fluorescentes que contienen gránulos de color verde brillante.

*Muestras negativas:* no debe haber señal fluorescente.

#### 4.3.1.1.3. Cortes fijados

Puede lograrse una detección específica del agente causal mediante la prueba de la inmunofluorescencia indirecta (IFAT) aplicada a tejidos incluidos en parafina o criostáticos, o bien mediante IHC aplicada a tejidos incluidos en parafina, como han observado varios autores (Johansen *et al.*, 2003; Nguyen *et al.*, 1997), utilizando anticuerpos policlonales o monoclonales.

##### 4.3.1.1.3.1. Prueba de la inmunofluorescencia indirecta en cortes de encéfalo

El siguiente protocolo se indica como ejemplo, pero pueden utilizarse otros protocolos de IFA validados.

- i) Se realizan cortes de 5 µm de espesor y se transfieren a portas recubiertos de polilisina.
- ii) Se secan los portas durante toda la noche a 37°C.
- iii) Se desparafinan con xileno 2 × 10 minutos y con etanol absoluto 2 × 5 minutos.
- iv) Se rehidratan los cortes: 95°, 70°, 50° y agua destilada.
- v) Se enjuagan con PBST.
- vi) Se cubren los cortes con tripsina al 0,1% en PBS y se incuban a 37°C durante 30 minutos.
- vii) Se enjuagan tres veces con PBST.
- viii) Se cubren los cortes con el anticuerpo primario (es decir, suero inmune de conejo anti-betánodavirus) durante 30 minutos a 37°C en una cámara húmeda.
- ix) Se enjuagan tres veces con PBST.
- x) Se cubren los cortes durante 30 minutos a 37°C con un anticuerpo comercial conjugado a isotiocianato de fluoresceína (es decir, anticuerpo anti-Ig de conejo).
- xi) Se enjuagan tres veces con PBST.
- xii) Se montan con cubreobjetos utilizando solución salina de glicerol, pH 8,5.
- xiii) Se observan al microscopio de IF y se comparan con un control positivo y uno negativo.

*Interpretación de los resultados:*

*Muestras positivas:* se observa fluorescencia brillante específica en el citoplasma de las células afectadas de encéfalo y retina.

*Muestras negativas:* en el control negativo no debe haber señal fluorescente.

##### 4.3.1.1.3.1. Prueba de la inmunofluorescencia indirecta en cortes criostáticos

El siguiente protocolo se indica como ejemplo, pero pueden utilizarse otros protocolos de IFA validados. Dada la escasa sensibilidad del método, solo es aplicable a peces afectados clínicamente.

- i) Se obtienen encéfalos de 2-3 peces afectados clínicamente.
- ii) Se introducen todos los encéfalos en el mismo criostato.
- iii) Se lleva el criostato a la cámara criostática, que estará a -20°C.
- iv) Cuando estén completamente congelados, se realizan cortes de 5 µm de espesor y se transfieren a portas recubiertos de polilisina.
- v) Se dejan secar los cortes al aire.
- vi) Se fijan los cortes con etanol absoluto o acetona fría (-20°C).
- vii) Se cubren los cortes con el anticuerpo primario (es decir, suero de conejo anti-betánodavirus) durante 30 minutos a 37°C en una cámara húmeda.
- viii) Se enjuagan tres veces con PBST.
- ix) Se cubren los cortes durante 30 minutos a 37°C con un anticuerpo comercial (es decir, anticuerpo conjugado anti-Ig de conejo) conjugado a isotiocianato de fluoresceína.
- x) Se enjuagan como antes con PBST.

- xi) Se montan con un cubreobjetos utilizando solución salina de glicerol, pH 8,5.
- xii) Se observan en un microscopio de IF y se comparan con un control positivo y uno negativo.

*Interpretación de los resultados:*

*Muestras positivas:* se observa fluorescencia específica en el citoplasma de las células afectadas del encéfalo o la retina.

*Muestras negativas:* en el control negativo no debe haber señal fluorescente.

*4.3.1.1.3.3. Inmunohistoquímica (técnica de la avidina-biotina-peroxidasa)*

Este protocolo se ha utilizado con ventajas durante mucho tiempo en el Laboratorio de Referencia de la OIE y se da como ejemplo; pueden adoptarse otros protocolos validados de IHC.

- i) Se desparafinan los cortes con xileno (2 × 10 minutos) y se rehidratan con etanol (2 × 5 minutos).
- ii) Se incuban en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% durante 20 minutos a temperatura ambiente (RT), para bloquear la peroxidasa endógena.
- iii) Se rehidratan los cortes de tejido en una serie de alcoholes de graduación decreciente (95°, 70°, 50°) y en agua destilada (1 minuto).
- iv) Se enjuagan en PBS (pH 7,3) a 37°C.
- v) Se incuban los cortes con tripsina al 0,1% y CaCl<sub>2</sub> al 0,1% + tampón Tris, durante 30 minutos a 37°C.
- vi) Se enjuagan tres veces con PBS.
- vii) Se incuban los cortes con BSA al 5% en PBS durante 20 minutos a RT.
- viii) Se elimina el BSA y se limpia el exceso.
- ix) Se incuban los cortes con el anticuerpo primario (es decir, anticuerpo de conejo anti-betnodavirus) diluido en BSA al 2,5% durante 60 minutos.
- x) Se enjuagan tres veces con Tampón Tris.
- xi) Se incuban con el suero secundario biotilado (es decir, anticuerpos de cabra anti-Ig de conejo en BSA al 2,5%) durante 20 minutos.
- xii) Se enjuagan tres veces con tampón Tris.
- xiii) Se incuban con complejo AB/HRP (preparado justo antes de su uso) durante 20 minutos a RT.
- xiv) Se elimina el complejo AB/HRP.
- xv) Se enjuagan tres veces con tampón Tris.
- xvi) Se incuban con sustrato cromógeno AEC (3-amino-9-etilcarbazol; preparado justo antes de su uso) durante 20 minutos a RT.
- xvii) Se enjuagan con agua destilada durante 5 minutos.
- xviii) Se aplica tinción de contraste con hematoxilina de Harris durante 30 segundos.
- xix) Se montan cortes en gelatina de glicerol.
- xx) Cada vez que se ejecute la inmunohistoquímica se debe incluir un corte control positivo y uno negativo

*Interpretación de los resultados:*

*Muestras positivas:* en los tejidos se pueden detectar depósitos granulares rojos. Una tinción difusa de color rojo claro de los tejidos no se considera un inmunomarcaje específico (fondo).

*Muestras negativas:* no se detecta inmunomarcaje

#### 4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

##### 4.3.1.2.1. Cultivo celular

Está bien documentado el aislamiento de betanodavirus en un pequeño número de líneas celulares de peces establecidas. En la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) se dispone de dos líneas celulares de peces en las que se pueden aislar y propagar betanodavirus, para fines de diagnóstico e investigación: la línea celular SSN-1, derivada de *Channa striata* (Frerichs *et al.*, 1996) y una línea celular clonada (E-11) derivada de la propia SSN-1 (Iwamoto *et al.*, 2000). Ambas son útiles para análisis cualitativos y cuantitativos de todos los betanodavirus. Se han desarrollado y descrito otros cultivos celulares susceptibles (Chi *et al.*, 1999) que pueden ser utilizados para fines de investigación y diagnóstico siempre que se lleve a cabo un seguimiento periódico de la sensibilidad. Para verificar la sensibilidad de los cultivos celulares que se utilizan, debe realizarse una titulación del virus de referencia congelado al menos cada 6 meses o siempre que se sospeche que ha disminuido la sensibilidad de las células.

##### *Inoculación de monocapas celulares*

Para conocer los detalles sobre el transporte, el tratamiento con antibióticos y la extracción del virus, consúltese el capítulo Información General.

- i) Se homogeneizan muestras con volúmenes de 1:5-1:10 de solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) u otro medio equivalente que contenga antibióticos, para evitar contaminaciones bacterianas.

Nota: Se sugiere utilizar gentamicina (1000 µg/ml) o penicilina (800 Unidades Internacionales [IU]/ml) y estreptomycin (800 µg/ml), pero pueden utilizarse otros antibióticos eficaces. Los compuestos antifúngicos micostatina o fungizona también pueden añadirse al medio a una concentración final de 400 UI/ml. Además, puede añadirse suero o albúmina al 5%.

El tratamiento antibiótico puede llevarse a cabo durante 4 horas a 15°C o durante toda la noche a 4°C. Como alternativa, puede utilizarse una filtración por un filtro de membrana de 0,22 µm.

- ii) Se inocula la suspensión de tejido tratada con antibiótico a dos diluciones distintas, es decir, la solución primaria y, además, una dilución de la misma a 1:10, obteniendo así unas diluciones finales de material tisular en medio de cultivo celular de 1:50–100 y 1:500–1000, respectivamente.

Nota: cada una de las diluciones de 100 µl debe inocularse en al menos 2 cm<sup>2</sup> de monocapa de cultivo celular en replicación activa.

- iii) En el caso de aplicar el método de la adsorción, se deja adsorber el inóculo sobre las monocapas drenadas, durante 1 hora a 20–25°C. Una vez transcurrido el periodo de adsorción, se añade el nuevo medio suplementado con FBS al 5%.
- iv) Si se adopta el método normal, se puede cambiar el medio de cultivo por uno nuevo suplementado con FBS al 5%, antes de añadir la suspensión tratada con antibiótico.
- v) Se incuba a 20–25°C según el genotipo esperado.

Nota: Las temperaturas óptimas de crecimiento vírico son distintas en cada una de las cuatro variantes genotípicas: 25–30°C en el caso del genotipo VNNEA, 20–25°C en el caso del genotipo VNNJD, 20°C en el caso del genotipo VNNTR, y 15–20°C en el caso del genotipo VNNVM (Tabla 2.1). Por ello, debe escogerse la temperatura de incubación según los genotipos presentes en la zona muestreada.

##### *Seguimiento de la incubación*

- i) Se sigue el curso de la infección en controles positivos y otros cultivos celulares inoculados mediante el examen microscópico a 40-100 aumentos durante 10 días.
- ii) Si aparece efecto citopático (ECP), deben llevarse a cabo los procedimientos de identificación (véase abajo).

Nota: El ECP de las células SSN-1 o E-11 se caracteriza por células delgadas o redondeadas, refringentes, granulares y vacuoladas, y una desintegración parcial o completa de la monocapa.

- iii) Si no aparece ECP tras el periodo de incubación primaria (10 días), debe realizarse un subcultivo en cultivos nuevos, utilizando una zona de crecimiento celular similar a la del cultivo primario.

*Procedimientos para el subcultivo*

- i) Se recogen alícuotas (10%) de medio de cultivo celular de todas las monocapas inoculadas.
- ii) Se inoculan alícuotas que constituyan el cultivo primario en pocillos con las nuevas monocapas celulares, como se ha descrito arriba (subcultivo pocillo a pocillo).
- iii) Se incuban y controlan como se ha descrito arriba, durante 10 días más
- iv) Si no aparece ECP durante este periodo, la prueba puede considerarse negativa.
- v) Si aparece ECP, deben llevarse a cabo los procedimientos de identificación (véase abajo).

*4.3.1.2.2. Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos**4.3.1.2.2.1. Prueba de la inmunofluorescencia indirecta*

- i) Se preparan monocapas de células susceptibles directamente en pocillos de 2 cm<sup>2</sup> de placas de plástico de cultivo celular o en cubreobjetos o portas de cámaras con el fin de lograr alrededor de un 70-80% de confluencia, que suele alcanzarse en 24 horas de incubación a 25°C.
- ii) Se inoculan las suspensiones del virus a identificar utilizando al menos dos diluciones decimales.
- iii) Se incuban a 20°C o 25°C durante 48–72 horas (Véase el apartado 4.3.1.2.1 Cultivo celular).
- iv) Se retira el medio de cultivo y se fija con etanol absoluto o acetona fría al 80% (-20°C) durante 10-30 minutos.
- v) Se enjuagan tres veces con PBST.
- vi) Se dejan secar las monocapas celulares al aire.
- vii) Se tratan las monocapas celulares con el anticuerpo primario (es decir, suero inmune de conejo anti-betnodavirus) durante 30 minutos a 37°C en una cámara húmeda.
- viii) Se enjuagan tres veces con PBST.
- ix) Se cubren las monocapas celulares durante 30 minutos a 37°C con anticuerpo comercial conjugado a isotiocianato de fluoresceína (es decir, anticuerpo anti-Ig de conejo).
- x) Se enjuagan con PBST.

Se examinan las monocapas celulares tratadas directamente en placas, o se montan los cubreobjetos utilizando solución salina de glicerol, pH 8,5, antes de la observación al microscopio.

*Interpretación de los resultados:*

*Muestras positivas:* Se observan células fluorescentes brillantes repartidas por la monocapa.

*Muestras negativas:* No debe detectarse señal fluorescente.

*4.3.1.2.3. Técnicas moleculares**4.3.1.2.3.1. PCR convencional*

La cantidad cada vez mayor de secuencias conocidas ha permitido el desarrollo de métodos de diagnóstico basados en la PCR para la detección de betnodavirus, que pueden optimizarse según las necesidades concretas de cada caso. El conjunto de cebadores F2-R3, que tiene por diana la región variable T4 del segmento RNA2 (Nishizawa *et al.*, 1994), se ha utilizado mucho en varios estudios tanto de diagnóstico como de investigación. Nishizawa *et al.* (1996) observaron que cuando hay una cantidad muy pequeña del virus en desovadores, esta puede escapar a la detección mediante PCR, dando falsos negativos. Por otra parte, Thiéry *et al.* (1999a) observaron que el conjunto de cebadores F2-R3 no fue capaz de reconocer el genoma de una cepa de betnodavirus de origen atlántico debido a la diversidad genética de este virus. En concordancia con esta observación, Grotmol *et al.* (2000) establecieron la hipótesis de que la variación de la secuencia entre betnodavirus podría dar lugar a una falta de coincidencia entre oligonucleótidos y su región diana, perjudicando así la potencia diagnóstica de la PCR. Desde la publicación del conjunto de cebadores F2-R3, se han desarrollado otros varios protocolos basados en la PCR para aumentar la sensibilidad y la especificidad del diagnóstico de betnodavirus, algunos de los cuales se indican en la Tabla 4.1. Las pruebas diseñadas por Dalla Valle *et al.* (2000) y Thiéry *et al.* (1999b) se probaron en cepas de betnodavirus de origen mediterráneo, mientras que el protocolo desarrollado por Grotmol *et al.* (2000) es adecuado para detectar cepas de agua fría.

**Tabla 4.1.** Conjuntos de cebadores utilizados para la detección de betanodavirus mediante PCR convencional

Cebador	Diana	Secuencia 5' → 3'	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
NNVV1	RNA2	ACA-CTG-GAG-TTT-GAA-ATT-CA	605	Dalla Valle <i>et al.</i> , 2000
NNVV2		GTC-TTG-TTG-AAG-TTG-TCC-CA		
NNVV3		ATT-GTG-CCC-CGC-AAA-CAC	255	
NNVV4		GAC-ACG-TTG-ACC-ACA-TCA-GT		
AH95-F1 AH95-R1	RNA2	AGT-GCT-GTG-TCG-CTG-GAG-TG CGC-CCT-GTG-TGA-ATG-TTT-TG	341	Grotmol <i>et al.</i> , 2000
F2 R3	RNA2	CGT-GTC-AGT-CAT-GTG-TCG-CT CGA-GTC-AAC-ACG-GGT-GAA-GA	unas 430	Nishizawa <i>et al.</i> , 1994
F2-atl R3-atl	RNA2	CGT-GTC-GGT-GTT-ATG-TCG-CT CGC-ATC-GAC-CCT-GGT-GAA-GG		
F2 R3 F'2 R'3	RNA2	CGT-GTC-AGT-CAT-GTG-TCG-CT CGA-GTC-AAC-ACG-GGT-GAA-GA GTT-CCC-TGT-ACA-ACG-ATT-CC GGA-TTT-GAC-GGG-GCT-GCT-CA	420 294	Thiéry <i>et al.</i> , 1999b

#### 4.3.1.2.3.2. PCR en tiempo real

En términos generales, los métodos basados en la PCR en tiempo real presentan un mejor rendimiento analítico que las PCR convencionales, y proporcionan resultados fiables con poca manipulación de la muestra. Grove *et al.* (2006) desarrollaron y validaron un método de RT-PCR en tiempo real para detectar específicamente el virus de la necrosis nerviosa del halibut. Esta prueba parecía ser óptima para el reconocimiento de virus de aguas frías, pero ineficaz para detectar cepas de aguas cálidas (como el VNNEA). Dalla Valle *et al.* (2005) estandarizaron una PCR en tiempo real basada en verde SYBR sensible para la detección nodavirus de peces basada en dos dianas moleculares (RNA1 y RNA2). Este método permitió detectar los cuatro genotipos conocidos y se ha validado parcialmente utilizando una cepa de tipo VNNEA. Aunque el uso de tinciones de ADN bicatenario inespecíficas da lugar a una considerable mejora de la sensibilidad analítica, el análisis de la curva de fusión en ocasiones da resultados dudosos. Se sabe que la química basada en sondas es más rápida y ofrece mayor especificidad. Hick *et al.* (2010) optimizaron una RT-qPCR basada en TaqMan (prueba qR2T) para la detección de betanodavirus, que se ha validado extensamente. Se evaluaron la sensibilidad, la repetibilidad y la reproducibilidad analíticas y diagnósticas. También se determinó la especificidad de la prueba, pero el protocolo no se ha probado en cepas víricas de agua fría. Hasta ahora, el método basado en TaqMan desarrollado por el Laboratorio de Referencia de la OIE, validado según las normas de la OIE, parece ser adecuado para detectar los cuatro genotipos establecidos, así como betanodavirus del bacalao del Atlántico y del halibut (Panzarin *et al.*, 2010). Todos los conjuntos de cebadoras y sonda relacionados con la bibliografía citada se indican en la Tabla 4.1. Abajo se detalla el protocolo de Panzarin *et al.* (2010), aunque pueden utilizarse otros métodos.

#### Purificación de ARN

Puede extraerse ARN total de homogenados de tejido diluidos a 1:5 en medio mínimo esencial de Eagle (el mismo homogenado se puede utilizar para el aislamiento del virus en cultivos celulares; arriba se indica cómo preparar la muestra) o en monocapas celulares infectadas, utilizando el NucleoSpin RNAII (Macherey–Nagel GmbH&Co.<sup>1</sup>) según las recomendaciones del fabricante. Pueden utilizarse otros kits de aislamiento del ARN cuyo rendimiento se haya demostrado.

#### Transcripción inversa (RT) y síntesis de ADNc

- i) Se prepara una mezcla de reacción para el número de muestras a analizar. Se prepara la mezcla madre de 30 µl para cada reacción del siguiente modo (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems): 6,3 µl de agua de grado PCR; 3 µl de tampón RT 10×; 1,2 µl de mezcla de dNTP 25× (100 mM); 3 µl de cebadores aleatorios RT 10×; 1,5 µl de transcriptasa inversa MultiScribe™ (50 U/µl); 15 µl de ARN purificado.
- ii) Se colocan los tubos en el termociclador y se aplican las siguientes condiciones: 10 minutos de pre-incubación a 25°C, 120 minutos de transcripción inversa a 37°C.
- iii) Se mantiene el ADNc a –20°C hasta que se utilice.

1 La referencia a productos comerciales concretos como ejemplos no implica la aprobación por parte de la OIE. Esto es aplicable a todos los productos comerciales mencionados en este *Manual Acuático*.

*PCR TaqMan en tiempo real*

- i) Se prepara mezcla de reacción para el número de muestras a analizar. La mezcla madre de 20 µl para cada reacción se prepara del siguiente modo (LightCycler® TaqMan® Master, Roche Diagnostics GmbH): 7,7 µl de agua de grado PCR; 0,9 µl de cebador RNA2 directo (20 µM); 0,9 µl de cebador RNA2 inverso (20 µM); 1,5 µl de sonda RNA2 (10 µM); 4 µl de Master Mix 5×; 5 µl de ADNc.
- ii) Se colocan las muestras en la plataforma de tiempo real y se empieza el siguiente perfil térmico: una incubación de 10 minutos a 95°C seguida de 45 ciclos de 10 segundos de desnaturalización a 95°C, 35 segundos de hibridación a 58°C y 1 segundo de elongación a 72°C. Estas condiciones de ciclado son para la plataforma LightCycler 2.0.
- iii) Se analizan los datos con el programa informático asociado al instrumental. El valor de corte diagnóstico se fija en 36 CP (punto de cruce). En caso de resultados dudosos (por ejemplo CP ≥ 36), se repite el análisis.

NOTA: El rendimiento analítico puede variar en función de las condiciones en las que se lleve a cabo el protocolo (por ejemplo, el perfil término podría precisar optimización, según la plataforma utilizada). Es importante destacar que es muy recomendable llevar a cabo el protocolo de Panzarin *et al.* (2010) en dos pasos, de lo contrario podría resultar drásticamente afectada la sensibilidad de la prueba.

**Tabla 4.2.** Conjuntos de cebadores/sonda utilizados para la detección de betanodavirus mediante PCR en tiempo real

Cebador	Diana	Secuencia 5' → 3'	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
Q-RdRP-1 Q-RdRP-2	RNA1	GTG-TCC-GGA-GAG-GTT-AAG-GAT-G CTT-GAA-TTG-ATC-AAC-GGT-GAA-CA	273	Dalla Valle <i>et al.</i> , 2005
Q-CP-1 Q-CP-2	RNA2	CAA-CTG-ACA-ACG-ATC-ACA-CCT-TC CAA-TCG-AAC-ACT-CCA-GCG-ACA	230	
P1 P2	RNA2	GGT-ATG-TCG-AGA-ATC-GCC-C TAA-CCA-CCG-CCC-GTG-TT	194	
Probe		TTA-TCC-CAG-CTG-GCA-CCG-GC*		
qR2TF qR2TR R2probe2	RNA2	CTT-CCT-GCC-TGA-TCC-AAC-TG GTT-CTG-CTT-TCC-CAC-CAT-TTG CAA-CGA-CTG-CAC-CAC-GAG-TTG*	93	Hick <i>et al.</i> , 2010
RNA2 FOR RNA2 REV RNA2 probe	RNA2	CAA-CTG-ACA-RCG-AHC-ACA-C CCC-ACC-AYT-TGG-CVA-C TYC-ARG-CRA-CTC-GTG-GTG-CVG*	69	Panzarin <i>et al.</i> , 2010

\* Tinción indicadora, FAM; quencher, BHQ1

NOTA: a excepción del método anterior, ninguno de los protocolos citados en los párrafos 4.3.1.2.3.1. y 4.3.1.2.3.2. se ha validado oficialmente mediante pruebas de eficiencia interlaboratoriales documentadas. El protocolo de Panzarin *et al.* (2012) se ha sometido a un ensayo de validación en círculo en el que han intervenido cinco laboratorios europeos.

#### 4.3.1.2.3.3. Secuenciación

La secuenciación del genoma, además de ser útil para la confirmación del diagnóstico, también es fundamental para los estudios epidemiológicos. El análisis de la secuencia de la región variable T4 (Nishizawa *et al.*, 1997) permite la asignación al genotipo correcto. No obstante, el análisis filogenético basado en la secuencia de ambos segmentos genómicos, parece aportar más información, y se recomienda para destacar posibles episodios de recombinación que tengan lugar entre distintos genotipos de betanodavirus y dentro de cada genotipo (Oliveira *et al.*, 2009; Panzarin *et al.*, 2012; Toffolo *et al.*, 2007).

#### 4.3.1.2.4. Purificación del agente

Los betanodavirus pueden ser fáciles de purificar mediante ultracentrifugación por gradientes de cloruro de cesio (Comps *et al.*, 1994; Mori *et al.*, 1992).

### 4.3.2. Métodos serológicos

Dado que no ha habido suficiente investigación, la detección de anticuerpos específicos hasta ahora no se ha considerado un método de detección sistemático para la evaluación del estado de las poblaciones de peces respecto a los virus. No obstante, varios autores han comunicado indicios de anticuerpos

específicos. Según observaciones de campo, un título de ELISA  $\geq 1:40$  debe considerarse indicador de infección vírica, mientras que valores  $\leq 1:10$  deben considerarse indicadores de ausencia de la enfermedad (Watanabe *et al.*, 2000).

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

Los métodos actualmente disponibles para la vigilancia dirigida y el diagnóstico de la VER/NNV 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. n.a.= no aplicable. Esta clasificación es de alguna forma subjetiva ya que la idoneidad implica cuestiones de fiabilidad, sensibilidad, especificidad y utilidad. Aunque no todas las pruebas incluidas en las categorías a o b se han sometido a estandarización y validación formales, 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 de betanodavirus*

Método	Vigilancia dirigida			Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
	Larvas	Juveniles	Adultos		
Histopatología	d	d	d	b	d
Histopatología seguida de inmunotinción	d	d	d	b	b
ME de transmisión	d	d	d	c	d
Aislamiento en cultivo celular seguido de inmunotinción o PCR	a	a	d	a	a
RT-PCR	b	b	b	a	a
RT-PCR seguida de secuenciación	d	d	d	b	a
PCR en tiempo real	a	a	a	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 encefalopatía y retinopatía virales

La vigilancia dirigida debe basarse en un seguimiento periódico de las piscifactorías en las que se críen especies susceptibles. Si hay fases larvarias y juveniles, deben tomarse muestras de las mismas preferiblemente durante la época más adecuada, teniendo en cuenta la temperatura óptima de los genotipos esperados.

NOTA: Actualmente no hay ningún procedimiento descrito, ni oficial ni recomendado, de análisis de las poblaciones sanas para demostrar la ausencia de la enfermedad. La PCR en tiempo real seguida del aislamiento del virus o la RT-PCR convencional con análisis de la secuencia en caso de resultados positivos debe considerarse el método más adecuado para la vigilancia dirigida destinada a detectar betanodavirus.

## 7. Criterios de diagnóstico confirmativo

### 7.1. Definición de caso sospechoso

Debe sospecharse de ERV o NNV si se cumple al menos uno de los siguientes criterios:

- i) Aparición de conducta natatoria anómala en especies susceptibles;



- ii) Detección de lesiones histopatológicas típicas detectadas en una población de especies susceptibles;
- iii) Observación del ECP típico en cultivos celulares sin identificación del agente causal;
- iv) Un resultado positivo en una de las pruebas diagnósticas calificadas como “A” o “B” en la columna “Diagnóstico provisional” de la Tabla 5.1.;
- v) Transferencia de peces vivos de una piscifactoría infectada a otro lugar;
- vi) Existencia de distintos enlaces epidemiológicos entre una piscifactoría infectada y una segunda piscifactoría;
- vii) Detección de actividad de anticuerpos específicos.

## 7.2. Definición de caso confirmado

Resultados positivos en los dos siguientes métodos:

- i) Un caso sospechoso que haya producido un ECP típico en cultivo celular con posterior identificación del agente causal mediante una prueba basada en anticuerpos y/o molecular.
- ii) Un segundo resultado positivo de una prueba de diagnóstico diferente clasificada como “A” en la columna “Diagnóstico confirmativo” de la Tabla 5.1. (excepto la combinación de PCR + PCR en tiempo real).

## 8. Bibliografía

ARIMOTO M., MUSHIAKE K., MIZUTA Y. NAKAI T. MUROGA K. & FURUSAWA I. (1992). Detection of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Fish Pathol.*, **27**, 191–195.

BARKER D.E., MACKINNON A.M., BOSTON L, BURT M.D.B., CONE D.K., SPEARE D.J., GRIFFITHS S., COOK M., RITCHIE R. & OLIVIER G. (2002). First report of piscine nodavirus infecting wild winter flounder *Pleuronectes americanus* in Passamaquoddy Bay, New Brunswick, Canada. *Dis. Aquat. Org.*, **49**, 99–105.

BOVO G, GUSTINELLI A., QUAGLIO F., GOBBO F., PANZARIN V., FUSARO A., MUTINELLI F., CAFFARA M., FIORAVANTI M. L. (2011). Viral encephalopathy and retinopathy outbreak in freshwater fish farmed in Italy. *Dis. Aquat. Org.*, **96**, 45–54.

CHI S.C., HU W.W. & LO B.L. (1999). Establishment and characterization of a continuous cell line (GF-1) derived from grouper, *Epinephelus coioides* (Hamilton): a cell line susceptible to grouper nervous necrosis virus (GNNV). *J. Fish Dis.*, **22**, 173–182.

CHI S.C., LO C.F. & LIN S.C. (2001). Characterization of grouper nervous necrosis virus. *J. Fish Dis.*, **24**, 3–13.

CHI S.C., SHIEH J.R. & LIN S.J. (2003). Genetic and antigenic analysis of betanodaviruses isolated from aquatic organisms in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.*, **55**, 221–228.

CHI S.C., WU Y.C. & CHENG T.M. (2005). Persistent infection of brtanodavirus in a novel cell line derived from the brain tissue of barramundi *Lates calcarifer*. *Dis. Aquat. Org.*, **65**, 91–98.

CIULLI S., DI MARCO P., NATALE A., GALLETI E., BATTIMANI M., SCAGLIARINI A., PUR PARI G, CANNELLA V., CASTIGLIONE F. & GUERCIO A. (2006). Detection and characterization of Betanodavirus in wild fish from Sicily., Italy. *Ittiopatologia*, **3**, 101–112.

COMPS M., PEPIN J.F. & BONAMI J.R. (1994). Purification and characterization of two fish encephalitis viruses (FEV) infecting *Lates calcarifer* and *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, **123**, 1–10.

DALLA VALLE L., TOFFOLO V., LAMPRECHT M., MALTESE C., BOVO G., BELVEDERE P. & COLOMBO L. (2005). Development of a sensitive and quantitative diagnostic assay for fish nervous necrosis virus based on two-target real-time PCR. *Vet. Microbiol.*, **110**, 167–179.

DALLA VALLE, L., ZANELLA L., PATARNELLO P., PAOLUCCI L., BELVEDERE P & COLOMBO L (2000). Development of a sensitive diagnostic assay for fish nervous necrosis virus based on RT-PCR plus nested PCR. *J. Fish Dis.*, **23**, 321–327

FRERICHS G.N., RODGER H.D. & PERIC Z. (1996). Cell culture isolation of piscine neuropathy nodavirus from juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *J. Gen. Virol.*, **77**, 2067–2071.

FRERICHS G.N., TWEEDIE A., STARKEY W.G. & RICHARDS R.H. (2000). Temperature, pH, and electrolyte sensitivity, and heat, UV and disinfectant inactivation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) neuropathy nodavirus. *Aquaculture*, **185**, 13–24.

FURUSAWA R., OKINAKA Y., UEMATSU K. & NAKAI T. (2007). Screening of freshwater fish species for their susceptibility to a betanodavirus. *Dis. Aquat. Org.*, **77**, 119–125.

GOMEZ D.K., SATO J., MUSHIAKE K., ISSHIKI T., OKINAKA Y. & NAKAI T. (2004). PCR-based detection of betanodaviruses from cultured and wild marine fish with no clinical signs. *J. Fish Dis.*, **27**, 603–608.

GROTMOL S., NERLAND A.H., BIERING E., TOTLAND G.K. & NISHIZAWA T. (2000). Characterisation of the capsid protein gene from a nodavirus strain affecting the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* and design an optimal reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection assay. *Dis. Aquat. Org.*, **39**, 79–88.

GROTMOL S. & TOTLAND G.K. (2000). Surface disinfection of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* eggs with ozonated sea-water inactivates nodavirus and increases survival of the larvae. *Dis. Aquat. Org.*, **39**, 89–96.

GROVE S., FALLER R., SOLEIM K.B. & DANNEVIG B.H. (2006). Absolute quantitation of RNA by a competitive real-time RT-PCR method using piscine nodavirus as a model. *J. Virol. Methods*, **132**, 104–112.

HICK P. & WHITTINGTON R.J. (2010). Optimisation and validation of a real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for detection of betanodavirus. *J. Virol. Methods*, **163**, 368–377.

IWAMOTO T., NAKAI T., MORI K., ARIMOTO M. & FURUSAWA I. (2000). Cloning of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses. *Dis. Aquat. Org.*, **43**, 81–89.

IWAMOTO T., MISE K., MORI K., ARIMOTO M., NAKAI T. & OKUNO T. (2001). Establishment of an infectious RNA transcription system for *Striped jack nervous necrosis virus*, the type species of the betanodavirus. *J. Gen. Virol.*, **82**, 2653–2662.

IWAMOTO T., OKINAKA Y., MISE K., MORI K., ARIMOTO M., OKUNO T. & NAKAI T. (2004). Identification of host-specificity determinants in betanodaviruses by using reassortants between striped jack nervous necrosis virus and sevenband grouper nervous necrosis virus. *J. Virol.*, **78**, 1256–1262.

JOHANSEN R., RANHEIM T., HANSEN M.K., TAKSDAL T. & TOTLAND G.K. (2002). Pathological changes in juvenile Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* persistently infected with nodavirus. *Dis. Aquat. Org.*, **50**, 161–169.

JOHANSEN R., AMUNDSEN M., DANNEVIG B.H. & SOMMER A.I. (2003). Acute and persistent experimental nodavirus infection in spotted wolffish *Anarhichas minor*. *Dis. Aquat. Org.*, **57**, 35–41.

JOHANSEN R., ROVE S., SVENDSEN N.A.K., MODAHL I. & DANNEVIG B. (2004). A sequential study of pathological findings in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L), throughout one year after an acute outbreak of viral encephalopathy and retinopathy. *J. Fish Dis.*, **27**, 327–341.

MALTESE C. & BOVO G. (2007). Viral encephalopathy and retinopathy. *Ittiopatologia*, **4**, 93–146.

MORI K., NAKAI T., MUROGA K., ARIMOTO M., MUSHIAKE K. & FURUSAWA I. (1992). Properties of a new virus belonging to Nodaviridae found in larval striped jack (*Pseudocaranx dentex*) with nervous necrosis. *Virology* **187**, 368–371.

MORI K., MANGYOKU T., IWAMOTO T., ARIMOTO M., TANAKA S. & NAKAI T. (2003). Serological relationships among genotypic variants of betanodavirus. *Dis. Aquat. Org.*, **57**, 19–26.

MORI K., MUSHIAKE K. & ARIMOTO M. (1998). Control measures for viral nervous necrosis in striped jack. *Fish Pathol.*, **33**, 443–444.

MORI K., SUGAYA T., NISHIOCAT., GOMEZ D.K., FUJINAMY Y., OKA M., ARIMOTO M., OKINAKA Y. & NAKAI T. (2005). Detection of Betanodaviruses from feed fish used in marine aquaculture. In: 12<sup>th</sup> International Conference Diseases of Fish and Shellfish, European Association of Fish Pathologists. Copenhagen (Denmark), 11–16 September 2005. Abstract O-142.

- MUNDAY B.L., KWANG J. & MOODY N. (2002). Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *J. Fish Dis.*, **25**, 127–142.
- MUSHIAKE K., NISHIZAWA T., NAKAI T., FURUSAWA I. & MUROGA K. (1994). Control of VNN in striped jack: Selection of spawners based on the detection of SJNNV gene by polymerase chain reaction (PCR). *Fish Pathol.*, **29**, 177–182.
- NGUYEN H.D., MUSHIAKE K., NAKAI T. & MUROGA K. (1997). Tissue distribution of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in adult striped jack. *Dis. Aquatic. Org.*, **28**, 87–91
- NISHIZAWA T., MORI K., NAKAI T., FURUSAWA I. & MUROGA K. (1994). Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Dis. Aquat. Org.*, **18**, 103–107.
- NISHIZAWA T., MUROGA K. & ARIMOTO M. (1996). Failure of the polymerase chain reaction (PCR) method to detect jack nervous necrosis virus (SJNNV) in striped jack *Pseudocaranx dentex* selected as spawners. *J. Aquat. Anim. Health.*, **8**, 332–334.
- NISHIZAWA T., FURUHASHI M., NAGAI T., NAKAI T. & MUROGA K. (1997). Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 1633–1636.
- OLVEIRA J.G., SOUTO S., DOPAZO C.P., THIÉRY R., BARJA J.L. & BANDÍN I. (2009). Comparative analysis of both genomic segments of betanodaviruses isolated from epizootic outbreaks in farmed fish species provides evidence for genetic reassortment. *J. Gen. Virol.*, **90**, 2940–2951.
- PANZARIN V., FUSARO A., MONNE I., CAPPELLOZZA E., PATARNELLO P., BOVO G., CAPUA I., HOLMES E.C. & CATTOLI G. (2012). Molecular epidemiology and evolutionary dynamics of betanodavirus in southern Europe. *Infect Genet Evol* **12**, 63–70.
- PANZARIN V., PATARNELLO P., MORI A., RAMPAZZO E., CAPPELLOZZA E., BOVO G. & CATTOLI G. (2010). Development and validation of a real-time TaqMan PCR assay for the detection of betanodavirus in clinical specimens. *Arch. Virol.*, **155**, 1193–1203.
- SANO M., NAKAI T. & FIJAN N. (2011). Viral diseases and agents of warmwater fish. *In: Fish Diseases and Disorders, Vol. 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections*, 2nd edition, Woo P.T.K & Bruno D.W., eds. CABI, London, UK, 166–244.
- SCHNEEMANN A., BALL L.A., DELSERT C., JOHNSON J.E. & NISHIZAWA T. (2005). Family Nodaviridae. *In: Virus Taxonomy Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U. & Ball L.A., eds. Elsevier Academic Press, London, UK, 865–872.
- SOMMERSET I. & NERLAND A.H. (2004). Complete sequence of RNA1 and subgenomic RNA3 of Atlantic halibut nodavirus (AHNV). *Dis. Aquat. Org.*, **58**, 117–125.
- TAN C., HUANG B., CHANG S.F., NGOH G.H., MUNDAY B.L., CHEN S.C. & KWANG J. (2001). Determination of the complete nucleotide sequence of RNA1 and RNA2 from greasy grouper (*Epinephelus tauvina*) nervous necrosis virus, Singapore strain. *J. Gen. Virol.*, **82**, 647–653.
- TANAKA S., MORI K., ARIMOTO M., IWAMOO T. & NAKAI T. (2001). Protective immunity of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, against experimental viral nervous necrosis. *J. Fish Dis.*, **24**, 15–22.
- THIÉRY R., ARNAULD C., DELSERT C. (1999a). Two isolates of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., nervous necrosis virus with distinct genomes. *J. Fish Dis.*, **22**, 201–207.
- THIÉRY R., RAIMOND J.C., CASTRIC J. (1999b). Natural outbreak of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*: study by nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Virus Res.*, **63**, 11–17.
- THIÉRY R., COZIEN J., DE BOISSESON C., KERBART-BOSCHER S. & NEVAREZ L. (2004). Genomic classification of new betanodavirus isolates by phylogenetic analysis of the coat protein gene suggest a low host-fish species specificity. *J. Gen. Virol.*, **85**, 3079–3087.
- THIÉRY R., COZIEN J., CABON J., LAMOUR F., BAUD M. & SCHNEEMANN A. (2006). Induction of a protective immune response against viral nervous necrosis in the European sea bass *Dicentrarchus labrax* by using betanodavirus virus-like particles. *J. Virol.*, **80**, 10201–10207.

TOFFOLO V., NEGRISOLO E., MALTESE C., BOVO G., BELVEDERE P., COLOMBO L. & DALLA VALLE L. (2007). Phylogeny of betanodaviruses and molecular evolution of their RNA polymerase and coat proteins. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **43**, 298–308.

WATANABE K., NISHIZAWA T. & YOSHIMIZU M. (2000). Selection of broodstock candidates of barfin flounder using an ELISA system with recombinant protein of barfin flounder nervous necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.*, **41**, 219–223.

YAMASHITA Y., FUJITA Y., KAWAKAMI H. & NAKAI T. (2005). The efficacy of inactivated virus vaccine against viral nervous necrosis (VNN). *Fish Pathol.*, **40**, 15–21.

Yamashita Y., Mori K. & Nakai T. (2009). Protection against viral nervous necrosis conferred by simultaneous inoculation of aquabirnavirus and inactivated betanodavirus in sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* (Thunberg). *J. Fish Dis.*, **32**, 201–210.

YUASA K., ISTI KOESHARYANI & KETUT MAHARDIKA (2007). Effect of high water temperature on betanodavirus infection of fingerling humpback grouper *Cromileptes altivelis*. *Fish Pathol.*, **42**, 219–221.

\*  
\* \*

**NB:** Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la Encefalopatía y retinopatía virales (puede consultarse en la Tabla del final de este *Manual Acuático* o en la página web de la OIE [www.oie.int](http://www.oie.int)).