

NECROSIS HEMATOPOYÉTICA INFECCIOSA

1. Ámbito de aplicación

La necrosis hematopoyética infecciosa (NHI) es una enfermedad vírica que afecta a la mayoría de especies de salmónidos criadas en agua dulce o marina. Está causada por el rhabdovirus denominado virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (VNHI), y las principales consecuencias clínicas y económicas tienen lugar en piscifactorías que crían trucha arco iris, donde los brotes pueden dar lugar a mortalidades muy altas. Sin embargo, tanto el salmón del Pacífico como el de Atlántico pueden resultar gravemente afectados. A efectos de este capítulo, la NHI se considera una infección por el VNHI.

2. Información sobre la enfermedad

Bootland y Leong (1999) y Wolf (1988) han publicado revisiones detalladas sobre la enfermedad.

2.1. Factores del agente

2.1.1. El agente patógeno, cepas del agente

El rhabdovirus de los peces, el VNHI, tiene un virión con forma de bala que contiene un genoma de ARN monocatenario con polaridad negativa, no segmentado, de aproximadamente 11.000 nucleótidos que codifica seis proteínas en el siguiente orden: una nucleoproteína (N), una fosfoproteína (P), una proteína de matriz (M), una glucoproteína (G), una proteína no virión (NV), y una polimerasa (L). La presencia del gen único NV y la homología de secuencia con otros ciertos rhabdovirus de peces, tales como el virus de la septicemia hemorrágica vírica, ha originado la creación del género *Novirhabdovirus* en la familia Rhabdoviridae, con el VNHI como especie tipo. La cepa tipo del VNHI es la del *Western Regional Aquaculture Center* (WRAC) disponible en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC VR-1392). El número de acceso en el GenBank para la secuencia genómica completa de la cepa WRAC es L40883 (Morzunov *et al.*, 1995; Winton y Einer-Jensen, 2002).

Se ha utilizado el análisis de la secuencia para comparar cepas del VNHI de Norteamérica, Europa y Asia (Emmenegger *et al.*, 2000; Enzmann *et al.*, 2005; 2010; Johansson *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2007; Kolodziejek *et al.*, 2008; Kurath *et al.*, 2003; Nishizawa *et al.*, 2006; Troyer y Kurath, 2003). Dentro de la variedad natural histórica de los virus de la parte occidental de Norteamérica, la mayoría de cepas del VNHI halladas en el salmón del Pacífico forman dos genogrupos que están relacionados con la ubicación geográfica y no con el año de aislamiento ni la especie hospedadora. Las cepas de estos dos genogrupos presentan un nivel relativamente bajo de diversidad de nucleótidos, lo cual sugiere estasis evolutiva o una relación hospedador-agente patógeno más antigua. Por el contrario, las cepas de OHNV halladas en trucha arco iris de piscifactoría en EE.UU. forman un tercer genogrupo con más diversidad genética y un patrón evolutivo que indica que actualmente se está adaptando a un nuevo hospedador o condiciones de cría. Las cepas de trucha arco iris de piscifactoría de Europa y Asia parecen proceder de Norteamérica, pero presentan una divergencia mayor e independiente dentro de sus nuevos límites geográficos (Enzmann *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2007; Nishizawa *et al.*, 2006).

Sobre la base de los estudios antigénicos llevados a cabo con antisueros neutralizantes policlonales de conejo, las cepas del VNHI forman un único serogrupo (Engelking *et al.*, 1991). Sin embargo, los anticuerpos monoclonales de ratón han revelado varios epítomos neutralizantes en la glucoproteína (et *al.*, 1994; Ristow y Arnzen De Avila, 1991; Winton *et al.*, 1988), así como la existencia de un grupo no neutralizante de epítomos ligados a la nucleoproteína (Ristow y Arnzen, 1989). No obstante, parece haber poca o ninguna correlación entre genotipos y serotipos (Johansson *et al.*, 2009). Se han registrado variaciones en la virulencia y la preferencia por hospedador en cepas de VNHI durante casos de enfermedad naturales y en infecciones experimentales (Garver *et al.*, 2006; LaPatra *et al.*, 1993a).

2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

El VNHI es lábil al calor, a la acidez y al éter. El virus sobrevive en agua dulce al menos 1 mes a bajas temperaturas, sobre todo en presencia de materia orgánica.

2.1.3. Estabilidad del agente (métodos eficaces de inactivación)

El VNHI se inactiva fácilmente en presencia de los desinfectantes de uso habitual y por desecación (Wolf, 1988).

2.1.4. Ciclo de vida

Los reservorios del VNHI son peces infectados clínicamente y portadores manifiestos entre peces de piscifactoría, asilvestrados o salvajes. El virus se excreta por vía urinaria, líquidos sexuales y mucus externo, mientras que el riñón, el bazo y otros órganos internos son los lugares en los que el virus es más abundante durante el curso de una infección manifiesta (Bootland y Leong, 1999; Wolf, 1988).

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Los principales hospedadores del VNHI son miembros de la familia Salmonidae. Las especies que se ha observado que se infectan de forma natural con el VNHI son: la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), el salmón real (*O. tshawytscha*), el salmón rojo (*O. nerka*), el salmón keta (*O. keta*), el amago (*O. rhodurus*), el salmón japonés (*O. masou*), el salmón plateado (*O. kisutch*) y también el salmón del Atlántico (*Salmo salar*). En ocasiones se han observado otros salmónidos infectados en la naturaleza o que presentan susceptibilidad en infecciones naturales, como la trucha común (*Salmo trutta*), y la trucha de garganta cortada (*O. clarki*), algunas truchas lacustres (*Salvelinus namaycush*, *S. alpinus*, *S. fontinalis*, y *S. leucomaenis*), el ayu (*Plecoglossus altivelis*) y especies no salmónidas, como la anguila (*Anguilla anguilla*), el arenque (*Clupea pallasii*), el bacalao (*Gadus morhua*), el esturión (*Acipenser transmontanus*), el lucio (*Esox lucius*), la mojarra brillante (*Cymatogaster aggregata*) y el tube-snout (*Aulorhynchus flavidus*) (Bootland y Leong, 1999; European Food Safety Authority, 2008; Wolf, 1988).

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

La NHI tiene lugar en varias especies de salmónidos, y las larvas constituyen el estadio más susceptible. Los peces más viejos suelen ser más resistentes a la enfermedad clínica, pero se ha observado una gran variabilidad de la susceptibilidad al VNHI entre ejemplares. Como ocurre con el virus de la septicemia hemorrágica vírica, un buen estado sanitario de los peces parece disminuir la susceptibilidad a la NHI manifiesta, mientras que las coinfecciones con enfermedades bacterianas (como la enfermedad bacteriana del agua fría), la manipulación y otros factores estresantes pueden hacer que infecciones subclínicas lleguen a ser manifiestas. Los peces son cada vez más resistentes a la infección con la edad hasta el desove, momento en el que, una vez más, se vuelven muy susceptibles y pueden excretar grandes cantidades de virus en los productos sexuales. Los supervivientes de la NHI presentan una fuerte inmunidad protectora con la síntesis de anticuerpos circulantes contra el virus (LaPatra *et al.*, 1993b).

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

El VNHI presenta un claro perfil filogeográfico (Enzmann *et al.*, 2010; Kurath *et al.*, 2003; Nishizawa *et al.*, 2006) que refleja la susceptibilidad de la especie hospedadora de la que el virus se ha aislado con mayor frecuencia en distintas zonas geográficas (por ejemplo, el salmón rojo en el noreste del Pacífico – genogrupo U; el salmón real en California, EE.UU. – genogrupo L; y la trucha arco iris en Europea, Asia y Idaho, EE.UU. – genogrupos E, J y M, respectivamente).

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

Se supone que el virus entra por las branquias y las bases de las aletas, mientras que el riñón, el bazo y otros órganos internos son los lugares en los que el virus es más abundante durante el curso de la infección manifiesta (Bootland y Leong, 1999; Wolf, 1988).

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

Históricamente, la distribución geográfica de la NHI se ha limitado a la parte occidental de Norteamérica, pero la enfermedad se ha extendido a Europa y Asia mediante la importación de peces y huevos infectados. Una vez el VNHI se introduce en una población de piscifactoría, la enfermedad puede establecerse en las especies susceptibles de peces salvajes de las cuencas receptoras. El periodo durante el cual un pez está infectado por el VNHI depende de la temperatura; sin embargo, a diferencia del virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI) o el virus del bagre de canal (VBC), a temperaturas normales parece ser muy infrecuente la aparición de portadores del VNHI de por vida.

2.2.6. Vectores

La transmisión horizontal del VNHI suele tener lugar por exposición directa, pero se ha propuesto que en ciertos casos puedan intervenir vectores invertebrados (Bootland y Leong, 1999).

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

El VNHI es endémico en muchas poblaciones de salmónidos de vida libre. Se ha propuesto un reservorio marino, pero no está confirmado.

2.3. Patrón de la enfermedad

La infección por el VNHI a menudo conlleva mortalidad debida a la perturbación del equilibrio osmótico, y tiene lugar en un contexto clínico de edema y hemorragia. Los signos clínicos se deben a la multiplicación del virus en células endoteliales de capilares sanguíneos, tejidos hematopoyéticos y células del riñón.

2.3.1. Mecanismos de transmisión

La transmisión del VNHI entre peces es principalmente horizontal y los peces juveniles infectados excretan altos niveles del virus, pero se han registrado casos de transmisión vertical o asociada a los huevos. Aunque la transmisión asociada a los huevos ha disminuido mucho debido a la práctica, actualmente habitual, de desinfectar la superficie de los huevos con una solución de yodo, es el único mecanismo que explica la aparición de NHI en nuevos lugares geográficos entre alevines que salen de huevos que se han incubado y han eclosionado en aguas libres del virus (Winton, 1991).

2.3.2. Prevalencia

El VNHI es endémico y muy prevalente en poblaciones de salmónidos de vida libre de gran parte de su ámbito histórico, a lo largo de la costa oeste de Norteamérica. El virus también se ha establecido con alta prevalencia de infección en regiones importantes de cría de trucha de Norteamérica, Europa y Asia, donde el VNHI se ha introducido por los desplazamientos de peces o huevos infectados.

2.3.3. Distribución geográfica

El VNHI se ha detectado en Norteamérica, Asia y Europa, pero no en el Hemisferio Sur. Los países que han notificado casos confirmados o sospechosos de NHI a la OIE son los siguientes: Austria, Bélgica, Canadá, China, Croacia, República Checa, Francia, Alemania, Irán, Italia, Japón, Corea, Países Bajos, Polonia, Rusia, Eslovenia, España, Suiza y EE.UU. Se han notificado infecciones y enfermedad manifiesta en peces criados tanto en agua dulce como marina.

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

En función de la especie de pez, de las condiciones de cría, de la temperatura y, hasta cierto punto, de la cepa vírica, los brotes de NHI pueden oscilar entre explosivos y crónicos. Las pérdidas en brotes agudos supondrán un alto porcentaje de la población por día y la mortalidad acumulada puede alcanzar el 90-95% o más (Bootland y Leong, 1999). En los casos crónicos, las pérdidas se prolongan y en el estanque pueden observarse peces en distintos estadios de la enfermedad.

2.3.5. Factores ambientales

El factor ambiental que más afecta al avance de la NHI es la temperatura del agua. En pruebas experimentales se ha observado que el VNHI puede producir mortalidad entre los 3 y los 18 °C (Bootland y Leong, 1999); sin embargo, en condiciones naturales la enfermedad clínica suele tener lugar entre los 8 y los 15°C.

2.4. Control y prevención

Los métodos de control de la NHI actualmente se basan en evitar la exposición al virus mediante la implementación de políticas de control estricto y buenas prácticas de higiene (Winton, 1991). La profunda desinfección de huevos fecundados, la utilización de suministros de agua libre del virus para la incubación y la cría, y la utilización de instalaciones con medidas de bioseguridad establecidas son fundamentales para prevenir la NHI en cualquier piscifactoría.

2.4.1. Vacunación

Las vacunas experimentales para proteger a los salmónidos de la NHI han sido objeto de investigación durante más de 40 años, y se han obtenido resultados esperanzadores tanto en pruebas de laboratorio como de campo cuando se han administrado mediante inmersión o inyección (Kurath, 2008; Winton, 1991; Winton, 1997). Para la utilización comercial en la acuicultura de red de salmón del Atlántico en la costa oeste de Norteamérica, se han autorizado vacunas tanto autógenas como inactivadas, así como

una vacuna de ADN, en cuyo sistema estas vacunas pueden administrarse económicamente mediante inyección. No obstante, todavía no se han autorizado vacunas contra el VNHI en otros países en los que la aplicación de vacunas a millones de peces más pequeños requerirá más investigación sobre nuevos métodos de administración masiva.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

Aunque se han estudiado opciones de tratamiento con sustancias químicas para el control del VNHI, no se ha hallado utilización comercial en acuicultura contra el VNHI (Winton, 1991).

2.4.3. Inmunoestimulación

Los inmunoestimulantes constituyen un campo activo de investigación, pero no se ha hallado utilidad comercial en la acuicultura contra el VNHI.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

Pruebas experimentales de híbridos triploides o inter-especie han dado resultados prometedores (Barroso *et al.*, 2008; Winton, 1991) y la base genética de la resistencia al VNHI ha constituido un campo activo de investigación reciente (Miller *et al.*, 2004; Purcell *et al.*, 2010)..

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

En zonas endémicas, se han utilizado especies menos susceptibles para reducir el impacto del INHV en la acuicultura.

2.4.6. Agentes bloqueantes

Se han identificado componentes naturales de microbios acuáticos que tienen actividad antivírica, aunque no se ha encontrado utilidad comercial en la acuicultura contra el VNHI (Winton, 1991).

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

La desinfección de huevos es un método muy eficaz para bloquear la transmisión del VNHI asociada a los huevos en contextos de acuicultura (Bovo *et al.*, 2005). Es un método muy utilizado en zonas donde el virus es endémico.

2.4.8. Prácticas generales de manejo

Se ha observado que, además de la desinfección de huevos, la utilización de un suministro de agua libre del virus es un factor crucial en la gestión del VNHI en zonas endémicas. Algunos de los métodos consisten en utilizar pozos o arroyos sin peces ni otras fuentes del VNHI, así como la desinfección de fuentes de agua superficiales con luz UV u ozono (Winton, 1991).

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

Las inspecciones clínicas se llevan mejor a cabo durante un periodo en que la temperatura del agua esté por debajo de los 14°C. Todas las unidades de producción (estanques, taques, jaulas de red, etc.) deben inspeccionarse para determinar si contienen peces muertos, débiles o que presenten comportamientos anómalos. Debe prestarse especial atención a la zona de salida de agua, donde tienden a acumularse peces débiles.

En las piscifactorías con salmónidos, si hay trucha arco iris solo se escogen peces de esta especie. Si no hay truchas arco iris, deben escogerse peces de otras especies susceptibles al VNHI, según la lista del apartado 2.2.1. Deben escogerse especies susceptibles proporcionalmente, o bien siguiendo criterios basados en el riesgo con el fin de escoger lotes o poblaciones con antecedentes de mortalidades anómalas o posibles episodios de exposición (por ejemplo, de aguas superficiales no tratadas, poblaciones salvajes o repoblaciones con poblaciones de estado de riesgo desconocido).

Si para la producción de peces se utiliza más de un origen de agua, deben tomarse ejemplares de todos ellos. Si hay peces débiles, que presenten un comportamiento anómalo o que acaben de morir (sin descomposición), este tipo de peces deben escogerse. Si no hay este tipo de peces, los peces escogidos deben presentar un aspecto normal y sano, de modo que todas las partes de la piscifactoría, así como todas las categorías de edad estén representadas proporcionalmente en la muestra.

3.2. Conservación de muestras para su envío

Antes del envío o transferencia al laboratorio, las partes de los órganos que deban examinarse deben separarse del cuerpo del pez mediante instrumental de disección estéril e introducirse en tubos de plástico estériles que contengan medio de transporte, es decir, medio de cultivo celular con un 10% de suero fetal bovino (FBS) y antibióticos. Se recomienda añadir 200 Unidades Internacionales (UI) de penicilina, 200 µg de estreptomina y 200 µg de kanamicina por ml, aunque también pueden utilizarse otros antibióticos de probada eficacia.

3.3. Combinación de varias muestras

Puede introducirse líquido ovárico o bien trozos de órganos de un máximo de diez peces en un tubo estéril que contenga al menos 4 ml de medio de transporte, y esto constituirá una muestra compuesta. El tejido de cada muestra debe pesar al menos 0,5 g. Los tubos deben situarse en recipientes aislados (como cajas de poliestireno de pared gruesa) junto con suficiente hielo o “bloques de congelador” para garantizar que las muestras se mantengan refrigeradas durante el transporte al laboratorio. Debe evitarse la congelación. La temperatura de una muestra durante el transporte nunca debe superar los 10°C y debe quedar hielo en la caja de transporte en el momento de la recepción, o bien uno o más bloques de hielo deben seguir parcial o totalmente congelados. Debe iniciarse el examen virológico 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 72 horas después de la obtención de las muestras, siempre que el material a examinar esté protegido por medio de transporte y que se hayan cumplido los requisitos de temperatura durante el transporte.

Pueden enviarse peces enteros al laboratorio si pueden cumplirse los requisitos de temperatura durante el transporte. Los peces enteros se pueden envolver en papel con capacidad absorbente y deben enviarse en una bolsa de plástico, refrigerados como se ha explicado anteriormente. También pueden enviarse peces vivos. Todo el embalaje y etiquetado deben realizarse de acuerdo con las actuales normas nacionales e internacionales de transporte, según corresponda.

3.4. Órganos y tejidos de elección

El tejido óptimo para el examen es el bazo, el riñón anterior y el corazón o el encéfalo. En algunos casos, pueden examinarse el líquido ovárico y el espermático.

En caso de alevines pequeños, pueden desmenuzarse peces enteros de menos de 4 cm de longitud con tijeras estériles o un bisturí tras eliminar la parte del cuerpo situada detrás de la cloaca. Si una muestra consiste en un pez entero con una longitud de entre 4 y 6 cm, deben extraerse las vísceras, incluido el riñón. Si una muestra consiste en un pez entero de menos de 4 cm de longitud, debe trocearse finamente con tijeras o una hoja de bisturí estériles, tras retirar la parte del cuerpo situada por detrás de la apertura del intestino al exterior. Si una muestra consiste en un pez entero con una longitud corporal de entre 4 y 6 cm, deben extraerse las vísceras, incluido el riñón. Si una muestra consiste en un pez entero de más de 6 cm de longitud, debe obtenerse muestras de tejido como se describe arriba. Las muestras de tejido deben trocearse finamente con tijeras o una hoja de bisturí estériles, homogeneizarse y suspenderse en medios de transporte.

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

El INHV es muy sensible a la degradación, por tanto, siempre que sea posible debe evitarse tomar tejidos con altas actividades enzimáticas o con grandes cantidades de bacterias contaminantes, como el intestino o la piel. El tejido muscular también es menos útil, puesto que suele contener una menor carga vírica.

4. Métodos de diagnóstico

El método de referencia para la detección del VNHI es el aislamiento del virus en cultivos celulares seguido de su identificación inmunológica o molecular. Aunque para la confirmación de la identidad del virus aislado en el cultivo celular o para la confirmación de infecciones manifiestas en peces pueden utilizarse otros métodos de diagnóstico mencionados más adelante, no están autorizados para su uso como métodos primarios de vigilancia para obtener ni mantener el estatus aprobado de ausencia de la NHI.

Debido a la considerable variación en la intensidad y la duración de las respuestas serológicas de los peces a las infecciones por este virus, la detección de anticuerpos contra el virus en los peces hasta ahora no se ha aceptado como método de diagnóstico sistemático para evaluar el estado vírico de poblaciones de peces. En el futuro, la validación de técnicas serológicas para el diagnóstico de infecciones víricas en peces podría hacer que la serología de los peces tuviera más aceptación como método de diagnóstico. No obstante, cuando la hay, una respuesta serológica positiva se considera un indicio presuntivo de una exposición pasada al VNHI

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

La enfermedad suele caracterizarse por signos macroscópicos que consisten en un letargo que se intercala con rachas de una anómala actividad frenética, oscurecimiento de la piel, palidez en las branquias, distensión abdominal, exoftalmia y hemorragias petequiales interna y externamente.

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Durante los brotes, los peces suelen estar aletargados, con rachas de una anómala actividad frenética, como natación en espiral y movimientos fugaces. En algunas especies se observa que arrastran un cilindro fecal. En algunos de los peces supervivientes se observan deformidades raquídeas (Bootland y Leong, 1999).

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

Los peces afectados presentan un oscurecimiento de la piel, palidez de branquias, distensión abdominal, exoftalmia y hemorragias petequiales interna y externamente. Internamente, los peces parecen anémicos y falta alimento en el intestino. El hígado, el riñón y el bazo están pálidos. Hay líquido ascítico y se observan petequias en los órganos de la cavidad corporal.

4.2.2. Bioquímica clínica

La sangre de alevines afectados presenta un hematocrito bajo, leucopenia, degeneración de leucocitos y trombocitos, y grandes cantidades de detritos celulares. Como ocurre en otras viremias hemorrágicas de los peces, la bioquímica clínica está alterada en los casos graves (Bootland y Leong, 1999).

4.2.3. Anatomopatología microscópica

Los hallazgos histopatológicos ponen de manifiesto necrosis degenerativa en tejidos hematopoyéticos, riñones, bazo, hígado, páncreas y el tracto digestivo. La necrosis de células granulares eosinófilas en la pared intestinal es patognomónica de infección por el VNHI (Bootland y Leong, 1999).

4.2.4. Preparaciones húmedas

Las preparaciones húmedas tienen poco valor diagnóstico.

4.2.5. Improntas y frotis de tejido

La mejor forma de observar cuerpos necrobióticos y macrófagos espumosos, que constituyen un indicador clínico de NHI, son las improntas de tejido obtenidas del riñón anterior y del bazo, más que los frotis.

4.2.6. Microscopía electrónica/citopatología

La microscopía electrónica de células infectadas por el virus pone de manifiesto viriones en forma de bala de unos 150-190 nm de longitud y de 65-75 nm de anchura (Wolf, 1988). Los viriones son visibles en la superficie celular o en el interior de vacuolas o de espacios intracelulares tras la gemación a través de las membranas celulares. El virión posee una envoltura externa que contiene lípidos del hospedador y las espículas glucoproteicas víricas sobre la superficie del virión que reaccionan con la inmunotinción con oro.

4.3. Métodos de detección e identificación del agente

El procedimiento tradicional para la detección del VNHI se basa en el aislamiento del virus en cultivo celular. La identificación confirmativa se puede lograr mediante métodos inmunológicos (neutralización, prueba de la inmunofluorescencia indirecta o enzoinmunoanálisis) o moleculares (reacción en cadena de la polimerasa, sonda de ADN o secuenciación) (Arakawa *et al.*, 1990; Arnzen *et al.*, 1991; Deering *et al.*, 1991; Dixon y Hill, 1984; Jorgensen *et al.*, 1991; LaPatra *et al.*, 1989; Purcell *et al.* 2006; Winton y Einer-Jensen, 2002).

4.3.1. Métodos directos de detección

4.3.1.1. Métodos microscópicos

4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

Las preparaciones húmedas no son adecuadas para la detección ni la identificación del VNHI.

4.3.1.1.2. Frotis

Los frotis no son adecuados para la detección ni la identificación del VNHI

4.3.1.1.3. Cortes fijados

Se ha utilizado la inmunohistoquímica y la hibridación *in-situ* (ISH) en aplicaciones de investigación, pero no son adecuadas para la detección ni la identificación del VNHI en contextos de diagnóstico.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

Líneas celulares que se utilizan: EPC o FHM.

La detección del virus por el desarrollo de efecto citopático (ECP) vírico en el cultivo celular iría seguida de la identificación del virus mediante pruebas basadas en anticuerpos o pruebas basadas en ácido nucleico. Toda prueba basada en anticuerpos requeriría la utilización de anticuerpos validados en cuanto a sensibilidad y especificidad.

4.3.1.2.1.1 Extracción del virus

En el laboratorio, el tejido de los tubos debe homogeneizarse por completo (mediante una licuadora, un mortero mezclador con arena o cualquier otro homogenizador adecuado y validado) y a continuación suspenderse en el medio de transporte original. La proporción final entre tejido y 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** 15 minutos y el sobrenadante se recoge y se trata durante cuatro horas a 15°C o bien durante toda la noche a 4°C con antibióticos (por ejemplo, 1 mg/ml de gentamicina puede ser útil en esta fase). Si el envío de la muestra se ha realizado en un medio de transporte (es decir, con exposición a antibióticos) el tratamiento del sobrenadante con antibióticos puede omitirse. El tratamiento con antibióticos se realiza para controlar la contaminación bacteriana en las muestras y hace que no sea necesaria la filtración por filtros de membrana.

Cuando surgen dificultades prácticas (como la rotura de la incubadora, problemas con los cultivos celulares, etc.) que imposibiliten inocular 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 un examen virológico en un plazo de 14 días. 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.

Tratamiento opcional del homogenado para inactivar virus competentes: el tratamiento de inóculos con antisuero contra el VNPI (que en algunas partes del mundo aparece en el 50% de las muestras de peces) va destinado a evitar que el ECP debido al VNPI impida la detección del VNHI en el cultivo celular. Cuando las muestras proceden de unidades de producción que se consideran libres de la NPI, el tratamiento de inóculos con antisuero anti VNPI debe omitirse. Antes de inocular las células, los sobrenadantes se mezclan con partes iguales de una combinación adecuadamente diluida de antisueros frente a los serotipos locales del VNPI y se incuban con esta durante un mínimo de una hora a 15°C o durante 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%.

4.3.1.2.1.2 Inoculación de monocapas celulares

Se cultivan células EPC o FHM a 20-30°C en un medio adecuado, como el MEM de Eagle (o modificaciones del mismo) con un suplemento de un 10% de suero fetal bovino (FBS) y antibióticos en 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). El pH debe ser de 7,6 ± 0,2. Los cultivos celulares que se vayan a utilizar par la inoculación con

tejido deben ser jóvenes (de 4-48 horas) y encontrarse en crecimiento activo (no concluyente) en el momento de la inoculación.

Se inocula suspensión de órganos tratada con antibiótico en cultivos celulares a por lo menos dos diluciones, es decir, la dilución primaria y, además, una dilución a 1:10 de la misma, obteniendo unas diluciones finales de tejido en medio de cultivo celular de 1:100 y 1:1000, respectivamente, (para prevenir la interferencia homóloga). La proporción entre el tamaño del inóculo y el volumen de medio de cultivo celular debe ser de más o menos 1:10. Para cada dilución y cada línea celular, debe utilizarse un área mínima de unos 2 cm², que corresponde 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 de 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 7 a 10 días. Si el color del medio de cultivo celular pasa de rojo a amarillo, indicando acidificación del medio, debe realizarse un ajuste del pH con solución estéril de bicarbonato o sustancias equivalentes para mantener la susceptibilidad de las células a la infección vírica.

Se realiza una valoración de las diluciones madre congeladas de VNHI al menos cada seis meses, o siempre que se sospeche de disminución de la susceptibilidad celular, para verificar la susceptibilidad de los cultivos celulares a la infección.

4.3.1.2.1.4 Microscopía

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

4.3.1.2.1.5 Subcultivos

Si no se observa ECP tras la incubación primaria durante 7 a 10 días, se realiza un subcultivo a cultivos celulares nuevos utilizando un área celular similar a la del cultivo primario.

Se combinan varias alícuotas de medio (sobrenadante) de todos los cultivos/pocillos que constituyen el cultivo primario, según la línea celular 7 a 10 días después de la inoculación. A continuación, dichas alícuotas combinadas se inoculan en cultivos celulares homólogos no diluidos y diluidos a 1:10 (obteniendo diluciones finales de 1:10 y 1:100, respectivamente, del sobrenadante) según se describe en el apartado 4.3.1.2.1.2 anterior.

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 el antisuero contra el VNPI a una dilución adecuada, como se ha descrito anteriormente.

A continuación, los cultivos inoculados se incuban 7 a 10 días a 15°C con observación, como se explica en el apartado 4.3.1.2.1.4. Si aparece ECP en los primeros tres días tras la incubación, puede realizarse un subcultivo en esa fase, pero después hay que incubar las células siete días y realizar otro subcultivo con siete días más de incubación. Cuando aparece ECP pasados tres días, las células pueden pasarse una vez e incubarse para lograr el total de 14 días desde la inoculación primaria. A lo largo de los siete últimos días de incubación no debe haber indicios de toxicidad.

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

Si no aparece ECP, la prueba puede declararse negativa.

4.3.1.2.2. Métodos de detección de antígeno basados en anticuerpos

4.3.1.2.2.1 Prueba de neutralización (identificación en cultivo celular)

- i) Se recoge medio de cultivo de las monocapas celulares que presenten ECP y se centrifuga una alícuota a 2.000 *g* durante 15 minutos a 4°C, o se filtra por una membrana de 0,45 µm (o 450 nm) de poro para eliminar los detritos celulares.
- ii) Se diluye medio con virus a 10²-10⁴.

- iii) Se mezclan alícuotas (por ejemplo, de 200 µl) de cada dilución con volúmenes iguales de una solución de anticuerpos anti VNHI. (La solución de anticuerpos neutralizantes (NAb) debe tener un título de reducción en placa al 50% de al menos 2000). De igual forma, se trata un conjunto de alícuotas de cada dilución vírica con medio de cultivo celular para disponer de un control no neutralizado.
- iv) Simultáneamente, debe realizarse otra prueba de neutralización contra una cepa homóloga de VNHI (prueba de neutralización positiva) para confirmar la reactividad del antisuero.
- v) Se incuban todas las mezclas a 15°C 1 hora.
- vi) Se transfieren las alícuotas de cada una de las mezclas anteriores a monocapas de 24 horas de edad recubiertas con medio de cultivo celular que contenga un 10% de FBS (se inoculan dos pocillos por dilución) y se incuban a 15°C; para este fin son adecuadas placas de cultivo celular de 24 o 12 pocillos, utilizando un inóculo de 50 µl.
- vii) Se comprueba si en los cultivos celulares aparece ECP y se leen los resultados para cada muestra sospechosa de contener el VNHI en cuanto este ECP aparece en controles no neutralizados. Los resultados se registran tras un simple examen microscópico (preferible con contraste de fases) o tras desechar el medio de cultivo celular y tefir las monocapas celulares con una solución de cristal violeta al 1% en etanol al 20%.
- viii) El virus analizado se identifica como VNHI cuando el ECP se ha prevenido o se ha retrasado considerablemente en los cultivos celulares que han recibido la suspensión vírica tratada con el anticuerpo específico contra el VNHI, habiendo observado un evidente ECP en todos los demás cultivos celulares.

Como alternativa pueden utilizarse otras pruebas de neutralización de probada eficacia.

4.3.1.2.2.2 Prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFAT)

A lo largo de los años se han desarrollado métodos de detección de antígenos basados en anticuerpos, como la IFAT, el ELISA y distintos procedimientos inmunohistoquímicos para la detección del VNHI. Estas técnicas pueden aportar detección e identificación de manera relativamente rápida en comparación con el aislamiento del virus en cultivo celular. No obstante, distintos parámetros, como la sensibilidad y la especificidad de anticuerpo y la preparación de la muestra pueden influir en los resultados; un resultado negativo debe interpretarse con cautela. Estas técnicas no deben utilizarse en intentos de detectar peces portadores.

a) Prueba de inmunofluorescencia indirecta en cultivos celulares

- 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 suele tener lugar en un plazo de 24 horas de incubación a 22 °C (se siembran seis monocapas celulares por cepa vírica que tenga que identificarse, más dos para los controles positivos y dos para los negativos). El contenido en FBS del medio de cultivo celular puede reducirse a un 2-4%. Si tienen que identificarse muchas cepas víricas, se recomienda utilizar placas de 96 pocillos negras para inmunofluorescencia.
- ii) Cuando las monocapas celulares están listas para la infección (es decir, el mismo día o el día después de la siembra) se inoculan las suspensiones de virus a identificar creando pasos de dilución decimal directamente en los pocillos o frascos de cultivo celular.
- iii) Se diluye la suspensión vírica control del VNHI de una forma similar, con el fin de obtener un título vírico de 5.000-10.000 unidades formadoras de placa (UFP)/ml en el medio de cultivo celular.
- iv) Se incuba a 15°C durante 24 horas.
- v) Se retira el medio de cultivo celular, se lava una vez con solución salina tamponada con fosfato (PBS) 0,01 M, a pH 7,2, y a continuación tres veces brevemente con una mezcla fría de acetona 30%/etanol 70% (v/v) (que se haya mantenido a -20°C).
- vi) Se deja que el fijador actúe 15 minutos. Un volumen de 0,5 ml es suficiente para 2 cm² de una monocapa celular.
- vii) Las monocapas celulares se dejan secar al aire al menos 30 minutos y se procesan de inmediato o se congelan a -20°C.
- viii) Se prepara una solución o suero de anticuerpos contra el VNHI en PBS 0,01 M, pH 7,2, que contenga Tween-80 al 0,05% (PBST), a la dilución adecuada (que se habrá establecido previamente o vendrá dada por el proveedor del reactivo).

- ix) Se rehidratan las monocapas celulares secadas mediante cuatro pasos de lavado con la solución de PBST, y se retira este tampón completamente tras el último lavado.
 - x) Se tratan las monocapas celulares con la solución de anticuerpos durante 1 hora a 37°C en una cámara con humedad y no se dejan evaporar (por ejemplo, introduciendo un trozo de algodón húmedo a la cámara con humedad). El volumen de solución que debe utilizarse es de 0,25 ml/pocillo de 2 cm².
 - xi) Se lavan cuatro veces con PBST, como antes.
 - xii) Se tratan las monocapas celulares 1 hora a 37°C con una solución de anticuerpo contra la inmunoglobulina utilizada en la primera capa conjugado con ITCF – o bien isotiocianato de tetrametilrodamina-5-(y -6-) (TRITC), y se preparan según las instrucciones del proveedor. Estos anticuerpos conjugados suelen ser de conejo o de cabra.
 - xiii) Se lavan cuatro veces con PBST.
 - xiv) Se examinan las monocapas celulares tratadas sobre placas de plástico de inmediato, o se montan los cubres 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 x10 y objetivos de x20-40 que tengan una apertura numérica >0,65 y >1,3, respectivamente. Antes de realizar ninguna otra observación, es necesario comprobar que los controles positivos y negativos dan los resultados esperados.
- b) *Prueba de inmunofluorescencia indirecta en preparaciones por impronta*
- i) Se sangran los peces por completo.
 - ii) Se realizan preparaciones por impronta 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 los trozos de riñón junto con los demás órganos necesarios para el aislamiento del virus por si más adelante se precisa llevarlo a cabo.
 - iv) Se dejan secar las improntas al aire durante 20 minutos.
 - v) Se fijan con acetona o etanol/acetona y se secan
 - vi) Se rehidratan las preparaciones anteriores y se bloquean con leche desnatada al 5% o albúmina sérica bovina al 1%, en PBST durante 30 minutos a 37°C.
 - vii) Se lavan cuatro veces con PBST.
 - viii) Se tratan las improntas con la solución de anticuerpos anti VNHI y se lavan.
 - ix) Se bloquean y se lavan.
 - x) Se revela la reacción con anticuerpos específicos conjugados con isotiocianato de fluoresceína (ITCF) adecuados, se lavan y se observan.
 - xi) 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 anteriormente.

Como alternativa se pueden utilizar otras IFAT o técnicas de inmunocitoquímica (fosfatasa alcalina o peroxidada) de probada eficiencia.

4.3.1.2.2.3 Enzimoinmunoanálisis (ELISA)

- i) Se recubren los pocillos de las microplacas diseñados para los ELISA con diluciones adecuados de inmunoglobulinas (Ig) purificadas o suero específico del VNHI, en PBS 0,01 M, pH 7,2 (200 µl/pocillo).
- ii) Se incuban toda la noche a 4°C.
- iii) Se lavan cuatro veces con PBS 0,01 M que contenga 0,05% de Tween-20 (PBST).
- iv) Se bloquean con leche desnatada (al 5% en PBST) u otra solución bloqueante durante 1 hora a 37°C (200 µl/pocillo).
- v) Se lavan cuatro veces con PBST.
- vi) Se añade un 2% de Triton X-100 a la suspensión vírica que se va a identificar.
- vii) Se distribuyen 100 µl/pocillo de diluciones de dos o cuatro pasos del virus a identificar y del virus VNHI control, y un virus heterólogo control (por ejemplo, el virus de la septicemia hemorrágica

vírica). Se deja que las muestras reaccionen con el anticuerpo recubierto al VNHI durante 1 hora a 20°C.

- viii) Se lavan cuatro veces con PBST.
- ix) Se añade a los pocillos antisuero anti VNHI policlonal biotinilado o MAb anti proteína N específico de un dominio diferente del dominio del MAb de recubrimiento y previamente conjugado con biotina.
- x) Se incuban 1 hora a 37°C.
- xi) Se lavan cuatro veces con PBST.
- xii) Se añade peroxidasa de rábano conjugada con estreptavidina a los pocillos que han recibido el anticuerpo conjugado con biotina, y se incuban 1 hora a 20°C.
- xiii) Se lavan cuatro veces con PBST. Se añade el sustrato y el cromógeno. Se detiene el curso de la prueba cuando reaccionan controles positivos, y se leen los resultados.
- xiv) Las interpretaciones de los resultados están en función de las absorbancias ópticas alcanzadas por los controles negativos y positivos y deben seguir las normas de cada prueba; por ejemplo, la absorbancia a 450 nm del control positivo debe ser al menos de 5-10 veces la absorbancia a 450 nm del control negativo.

La anterior versión de ELISA basado en biotina-avidina es solo un ejemplo; también pueden utilizarse otras versiones de ELISA de probada eficiencia.

4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

4.3.1.2.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa

Preparación del ARN vírico

- i) Se extrae ARN total de células infectadas mediante un método de separación de fases (como el fenol-cloroformo o el Trizol) o bien utilizando un kit comercial de aislamiento del ARN siguiendo las instrucciones del fabricante. Aunque todos estos métodos funcionan bien para las monocapas celulares drenadas o precipitados celulares, el ARN ligado a columnas de afinidad puede resultar afectado por sales presentes en los medios de cultivo celular, y para la extracción de ARN de líquidos de cultivo celular deben utilizarse métodos de separación de fases.

Protocolo de la PCR con transcripción inversa (RT) y de la PCR estándar

- i) Se prepara una mezcla madre para tantas muestras como vayan a analizarse. Se trabaja con campana extractora y guantes.
- ii) La mezcla madre de 50 µl para una PCR con transcripción inversa se prepara del siguiente modo: 23,75 µl de agua libre de ribonucleasa (tratada con DEPC) o de grado para biología molecular; 5 µl de tampón 10×; 5 µl de MgCl₂ 25 mM; 5 µl de dNTP 2 mM; 2,5 µl (20 pmoles µl⁻¹) de cebador en dirección 5': 5'-AGA-GAT-CCC-TAC-ACC-AGA-GAC-3'; 2,5 µl (20 pmoles µl⁻¹) de cebador en dirección 3': 5'-GGT-GGT-GTT-GTT-TCC-GTG-CAA-3'; 0,5 µl de polimerasa Taq (5 U µl⁻¹); 0,5 µl de transcriptasa inversa AMV (9 U µl⁻¹); 0,25 µl de RNasin (39 U µl⁻¹).
- iii) Se centrifugan los tubos brevemente (10 segundos) para garantizar que el contenido quede en el fondo.
- iv) Se colocan los tubos en el termociclador y se empiezan los siguientes ciclos - 1 ciclo: 50°C durante 30 minutos; 1 ciclo: 95 °C durante 2 minutos; 30 ciclos: 95 °C durante 30 segundos, 50°C durante 30 segundos, 72°C durante 60 segundos; 1 ciclo: 72°C durante 7 minutos y se deja en remojo a 4°C.
- vi) Se visualiza el amplicón de la PCR de 693 pb mediante electroforesis del producto en gel de agarosa al 1,5% con bromuro de etidio y se observa mediante transiluminación con luz UV.

NOTA: Estos cebadores de PCR tienen por Diana una región central del gen G del VNHI (Emmenegger *et al.*, 2000). Aunque para la amplificación de partes de los genes N o G del VNHI se pueden utilizar otros conjuntos de cebadores (Winton y Einer-Jensen, 2002), se ha observado que las secuencias de cebadores indicadas arriba se conservan en una gran variedad de cepas del VNHI y no están presentes en el gen G de rabdovirus de peces relacionados, el virus de la septicemia hemorrágica vírica ni el rabdovirus hirame. Además, los nuevos cebadores producen un amplicón que puede utilizarse como molde para el análisis de la secuencia de la región "medio-G" del genoma del VNHI para fines epidemiológicos (Emmenegger *et al.*, 2000; Kurath *et al.*, 2003).

4.3.1.2.3.2 Otras técnicas basadas en la amplificación

Se han desarrollado otros métodos para detectar el VNHI basados en la amplificación de secuencias diana del ARN genómico o mensajero, en las que se utiliza un método de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) (Gunimaladevi *et al.*, 2005) o una prueba de PCR con transcriptasa inversa cuantitativa (Overturf *et al.*, 2001). Sin embargo, estas pruebas todavía no se han validado de forma definitiva en un laboratorio utilizando un conjunto de cepas de referencia que representen distintos genotipos del VNHI para que puedan considerarse adecuadas como método confirmativo.

4.3.1.2.3.3 Secuenciación

El análisis de la secuencia de amplicones de la PCR se ha vuelto mucho más rápido y barato en los últimos años y constituye un buen método de confirmación de las infecciones por el VNHI (Winton y Einer-Jensen, 2002). Además, el análisis de la secuencia es uno de los mejores sistemas de identificación de cepas genéticas y de trazabilidad epidemiológica de los desplazamientos del virus (Emmenegger *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2007; Kurath *et al.*, 2003; Nishizawa *et al.*, 2006).

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

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

Tabla 5.1. Métodos de vigilancia dirigida y diagnóstico

Método	Vigilancia dirigida				Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
	Gametos	Alevines	Juveniles	Adultos		
Signos macroscópicos	d	c	c	d	b	d
Aislamiento del virus	a	a	a	a	a	c
MO directa	d	c	d	d	b	c
Histopatología	d	c	d	d	b	c
ME de transmisión	d	d	d	d	b	c
Pruebas basadas en anticuerpos	d	c	c	c	a	b
Pruebas de PCR	c	c	c	c	a	a
Secuenciación	d	d	d	d	c	a

MO = microscopía óptica; ME = microscopía electrónica; PCR = reacción en cadena de la polimerasa.

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

El método de vigilancia dirigida destinado a declarar la ausencia de NHI es el aislamiento del virus en cultivo celular. Para este fin, deben examinarse las fases más susceptibles de las especies más susceptibles. En al menos uno de

los periodos de muestreo de cada año deben tomarse muestras de líquidos y tejidos reproductivos de peces adultos de una especie susceptible que se encuentre en desove.

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

Un caso sospechoso se define como la presencia de signos clínicos macroscópicos característicos de la enfermedad en una población de peces susceptibles, O BIEN una presentación histopatológica interna característica en especies susceptibles, O BIEN la detección de anticuerpos contra el VNHI en una especie susceptible, O BIEN un efecto citopático característico en el cultivo celular sin identificación del agente, O BIEN un resultado positivo en una sola de las pruebas diagnósticas clasificada como “a” o “b” en la Tabla 5.1.

7.2. Definición de caso confirmado

Un caso confirmado se define como un caso sospechoso que ha: 1) producido efecto citopático característico en cultivo celular con la subsiguiente identificación del agente mediante una de las pruebas basadas en anticuerpos o moleculares de la Tabla 5.1, O BIEN 2) dado un segundo resultado positivo en una prueba diagnóstica diferente clasificada como “a” o “b” en la última columna de la Tabla 5.1.

8. Bibliografía

ARAKAWA C.K., DEERING R.E., HIGMAN K.H., OSHIMA K.H., O'HARA P.J. & WINTON J.R. (1990). Polymerase chain reaction (PCR) amplification of a nucleoprotein gene sequence of infectious hematopoietic necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.*, **8**, 165–170.

ARNZEN J.M., RISTOW S.S., HESSON C.P. & LIENTZ J. (1991). Rapid fluorescent antibody tests for infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) utilizing monoclonal antibodies to the nucleoprotein and glycoprotein. *J. Aquat. Anim. Health*, **3**, 109–113.

BARROSO R.M., WHEELER P.A., LAPATRA S.E., DREW R.E. & THORGAARD G.H. (2008). QTL for IHNV resistance and growth identified in a rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) X Yellowstone cutthroat (*Oncorhynchus clarkibouvieri*) trout cross. *Aquaculture*, **277**, 156–163.

BOOTLAND L.M. & LEONG J.C. (1999). Infectious hematopoietic necrosis virus. *In: Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections*, Woo P.T.K. & Bruno D.W., eds. CAB International, Oxon, UK, 57–121.

BOVO G., HASTEIN T., HILL B., LAPATRA S., MICHEL C., OLESEN N.J., SHCHELKUNOV I., STORSET A., WOLLFROM T. & MIDTLING P.J. (2005). Hazard identification for vertical transfer of fish disease agents. Available at: <http://www.crl-fish.eu/upload/sites/crl-fish/reports/links/fishegtrade%20wp1.pdf>.

DEERING R.E., ARAKAWA C.K., OSHIMA K.H., O'HARA P.J., LANDOLT M.L. & WINTON J.R. (1991). Development of a biotinylated DNA probe for detection and identification of infectious hematopoietic necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.*, **11**, 57–65.

DIXON P.F. & HILL B.J. (1984). Rapid detection of fish rhabdoviruses by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Aquaculture*, **42**, 1–12.

EMMENEGGER E.J., MEYERS T.R., BURTON T.O. & KURATH G. (2000). Genetic diversity and epidemiology of infectious hematopoietic necrosis virus in Alaska. *Dis. Aquat. Org.*, **40**, 163–176.

ENGELKING H.M., HARRY J.B. & LEONG J.C. (1991). Comparison of representative strains of infectious hematopoietic necrosis virus by serological neutralization and cross-protection assays. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 1372–1378.

ENZMANN P.-J., CASTRIC J., BOVO G., THIERY R., FICHTNER D., SCHÜTZE H. & WAHLI T. (2010). Evolution of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV), a fish rhabdovirus, in Europe over 20 years: implications for control. *Dis. Aquat. Org.*, **89**, 9–15.

ENZMANN P.-J., KURATH G., FICHTNER D. & BERGMANN S.M. (2005). Infectious hematopoietic necrosis virus: Monophyletic origin of European IHNV isolates from North-American genogroup M. *Dis. Aquat. Org.*, **66**, 187–195.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (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. *EFSA J.*, **808**, 1–144. Available at: http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/ahaw_op_ej808_suscepspecies_opinion_en.pdf?ssbinary=true

GARVER, K.A., BATTS, W.N. & KURATH, G. (2006). Virulence comparisons of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) U and M genogroups in sockeye salmon and rainbow trout. *J. Aquat. Anim. Health*, **18**, 232–243.

GUNIMALADEVI I., KONO T., LAPATRA S.E. & SAKAI M. (2005). A loop mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Arch. Virol.*, **150**, 899–909.

HUANG C., CHIEN M-S., LANDOLT M. & WINTON J.R. (1994). Characterization of the infectious hematopoietic necrosis virus glycoprotein using neutralizing monoclonal antibodies. *Dis. Aquat. Org.*, **18**, 29–35.

JOHANSSON T., EINER-JENSEN K., BATTS W., AHRENS P., BJÖRKLUND C., KURATH G., BJÖRKLUND H. & LORENZEN N. (2009). Genetic and serological typing of European infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) isolates. *Dis. Aquat. Org.*, **86**, 213–221.

JORGENSEN P.E.V., OLESEN N.J., LORENZEN N., WINTON J.R. & RISTOW S.S. (1991). Infectious hematopoietic necrosis (IHN) and viral hemorrhagic septicemia (VHS): detection of trout antibodies to the causative viruses by means of plaque neutralization, immunofluorescence, and enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Aquat. Anim. Health*, **3**, 100–108.

Kim W-S., Oh M-J., Nishizawa T., Park J-W., Kurath G. & Yoshimizu M. (2007). GENOTYPING OF KOREAN ISOLATES OF INFECTIOUS HEMATOPOIETIC NECROSIS VIRUS (IHNV) BASED ON THE GLYCOPROTEIN GENE. *ARCH. VIROL.*, **152**, 2119–2124.

KOLODZIEJEK J., SCHACHNER O., DÜRRWALD R., LATIF M. & NOWOTNY N. (2008). “Mid-G” region sequences of the glycoprotein gene of Austrian infectious hematopoietic necrosis virus isolates form two lineages within European isolates and are distinct from American and Asian lineages. *J. Clin. Microbiol.*, **46**, 22–30.

KURATH G. (2008). Biotechnology and DNA vaccines for aquatic animals. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **27**, 175–196.

KURATH G., GARVER K.A., TROYER R.M., EMMENEGGER E.J., EINER-JENSEN K. & ANDERSON E.D. (2003). Phylogeography of infectious haematopoietic necrosis virus in North America. *J. Gen. Virol.*, **84**, 803–814.

LAPATRA S.E., FRYER J.L. & ROHOVEC J.S. (1993a). Virulence comparison of different electropherotypes of infectious hematopoietic necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.*, **16**, 115–120.

LAPATRA S.E., ROBERTI K.A., ROHOVEC J.S. & FRYER J.L. (1989). Fluorescent antibody test for the rapid diagnosis of infectious hematopoietic necrosis virus. *J. Aquat. Anim. Health*, **1**, 29–36.

LAPATRA S.E., TURNER T., LAUDA K.A., JONES G.R. & WALKER S. (1993b). Characterization of the humoral response of rainbow trout to infectious hematopoietic necrosis virus. *J. Aquat. Anim. Health*, **5**, 165–171.

MILLER K.M., WINTON J.R., SCHULZE A.D., PURCELL M.K. & MING T.J. (2004). Major histocompatibility complex loci are associated with susceptibility of Atlantic salmon to infectious hematopoietic necrosis virus. *Environ. Biol. Fish.*, **69**, 307–316.

MORZUNOV S.P., WINTON J.R. & NICHOL S.T. (1995). The complete genome structure and phylogenetic relationship of infectious hematopoietic necrosis virus. *Vir. Res.*, **38**, 175–192.

Nishizawa T., Kinoshita S., Kim W-S., Higashi S. & Yoshimizu M. (2006). NUCLEOTIDE DIVERSITY OF JAPANESE ISOLATES OF INFECTIOUS HEMATOPOIETIC NECROSIS VIRUS (IHNV) BASED ON THE GLYCOPROTEIN GENE. *DIS. AQUAT. ORG.*, **71**, 267–272.

OVERTURF K., LAPATRA S. & POWELL M. (2001). Real-time PCR for the detection and quantitative analysis of IHNV in salmonids. *J. Fish Dis.*, **24**, 325–333.

Purcell M.K., Hart S.A., Kurath G. & Winton J.R. (2006). STRAND-SPECIFIC, REAL-TIME RT-PCR ASSAYS FOR QUANTIFICATION OF GENOMIC AND POSITIVE-SENSE RNAs OF THE FISH RHABDOVIRUS, INFECTIOUS HEMATOPOIETIC NECROSIS VIRUS. *J. VIROL. METHODS*, **132**, 18–24.

PURCELL M.K., LAPATRA S.E., WOODSON J.C., KURATH G. & WINTON J.R. (2010). Early viral replication and induced or constitutive immunity in rainbow trout families with differential resistance to Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). *Fish Shellfish Immunol.*, **28**, 98–105.

RISTOW S.S. & ARNZEN J.M. (1989). Development of monoclonal antibodies that recognize a type 2 specific and a common epitope on the nucleoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus. *J. Aquat. Anim. Health*, **1**, 119–125.

RISTOW S.S. & ARNZEN DE AVILA J.M. (1991). Monoclonal antibodies to the glycoprotein and nucleoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) reveal differences among isolates of the virus by fluorescence, neutralization and electrophoresis. *Dis. Aquat. Org.*, **11**, 105–115.

WINTON J.R. (1991). Recent advances in the detection and control of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in aquaculture. *Ann. Rev. Fish Dis.*, **1**, 83–93.

WINTON J.R. (1997). Immunization with viral antigens: Infectious haematopoietic necrosis. *Dev. Biol. Stand.*, **90**, 211–220.

WINTON J.R., ARAKAWA C.K., LANNAN C.N. & FRYER J.L. (1988). Neutralizing monoclonal antibodies recognize antigenic variants among isolates of infectious hematopoietic necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.*, **4**, 199–204.

WINTON J.R. & EINER-JENSEN K. (2002). Molecular diagnosis of infectious hematopoietic necrosis and viral hemorrhagic septicemia. *In: Molecular Diagnosis of Salmonid Diseases*, Cunningham C.O., ed. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 49–79.

WOLF K. (1988). Infectious hematopoietic necrosis. *In: Fish Viruses and Fish Viral Diseases*. Cornell University Press, Ithaca, New York, USA, pp. 83–114

*
* *

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