

VIROSIS DEL BAGRE DE CANAL

1. Ámbito de aplicación

A efectos de este capítulo, la virosis del bagre de canal (VIBC) (Inouye *et al.*, 1992) es la infección causada por el iridovirus del bagre de canal (VBC).

La VIBC es una causa importante de mortalidad en bagre de canal (*Pagrus major*) de piscifactoría y en más de otras 30 especies de peces marinos cuando viven en piscifactorías (Kawakami y Nakajima, 2002; Matsuoka *et al.*, 1996) pertenecientes a los órdenes Perciformes y Pleuronectiformes. El primer brote de VIBC se documentó en bagre de canal de piscifactoría en la isla de Shikoku, Japón, en 1990 (Inouye *et al.*, 1992). Desde entonces, la enfermedad ha causado mortalidades masivas en poblaciones de peces de piscifactoría en la parte occidental de Japón, principalmente en bagres de canal juveniles. Los peces afectados quedaron letárgicos, presentaron anemia intensa, petequias en las branquias y esplenomegalia (Inouye *et al.*, 1992; Jung *et al.*, 1997; Nakajima y Maeno, 1998). Esta enfermedad se caracteriza por la aparición de células aumentadas de tamaño que se tiñen intensamente con la solución de Giemsa en las observaciones histopatológicas del bazo, el corazón, el riñón, el intestino y las branquias de los peces infectados (Inouye *et al.*, 1992).

Recientemente, se ha comprobado que la enfermedad está causada no solo por el VBC (Inouye *et al.*, 1992; Jeong *et al.*, 2003; 2006; Kurita *et al.*, 2002; Kusuda *et al.*, 1994; Nakajima y Kurita, 2005; Nakajima y Sorimachi, 1994) y sus sinónimos (Chou *et al.*, 1998; Do *et al.*, 2004; 2005; Gibson-Kueh *et al.*, 2004; Jung *et al.*, 1997; Jung y Oh, 2000; Kim *et al.*, 2002; Kurita *et al.*, 2004; Miyata *et al.*, 1997; Nakajima y Kurita, 2005; Sudthongkong *et al.*, 2002b), sino también por el virus de la necrosis infecciosa del bazo y el riñón (VNIBR) (He *et al.*, 2001; Oseko *et al.*, 2004). Esta enfermedad se ha observado no solo en Japón sino también muy extendida en países del este y el sureste asiático (Chou *et al.*, 1998; Do *et al.*, 2004; 2005; Gibson-Kueh *et al.*, 2004; Jeong *et al.*, 2003; 2006; Jung *et al.*, 1997; Jung y Oh, 2000; Kim *et al.*, 2002; Kurita *et al.*, 2004; Miyata *et al.*, 1997; Nakajima y Kurita, 2005; Oseko *et al.*, 2004; Sudthongkong *et al.*, 2002b).

Existe un anticuerpo monoclonal (MAb) contra el VBC (Nakajima y Sorimachi, 1995) que puede detectar tanto el VBC como el VNIBR, pero no reconoce los ranavirus de los peces (familia: Iridoviridae) en pruebas anticuerpos inmunofluorescentes (IFAT) (Nakajima *et al.*, 1998; Oseko *et al.*, 2004).

Se utilizan muchos métodos diagnósticos útiles, como la observación de frotis de improntas teñidos o de cortes fijados, IFAT en la que se utilizan MAb, y reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) (Jeong *et al.*, 2004; Kurita *et al.*, 1998; Nakajima *et al.*, 1995; Nakajima *et al.*, 1998; Oshima *et al.*, 1996; 1998).

Existe una vacuna inactivada por formalina contra la VIBC que es eficaz y que se comercializa en Japón (Nakajima *et al.*, 1997; 1998).

2. Información sobre la enfermedad

2.1. Factores del agente

2.1.1. El agente patógeno, cepas del agente

Esta enfermedad está causada por la cepa Ehime-1 del iridovirus del bagre de canal (VBC) (Inouye *et al.*, 1992; Jeong *et al.*, 2003; 2006; Kurita *et al.*, 2002; Kusuda *et al.*, 1994; Nakajima y Kurita, 2005; Nakajima y Sorimachi, 1994) y otros genotipos del VBC, incluidos muchos virus que se consideran sinónimos del VBC (Chou *et al.*, 1998; Do *et al.*, 2004; 2005; Gibson-Kueh *et al.*, 2004; Jung *et al.*, 1997; Jung y Oh, 2000; Kim *et al.*, 2002; Miyata *et al.*, 1997; Nakajima y Kurita, 2005; Sudthongkong *et al.*, 2002b). También está causada por el virus de la necrosis infecciosa del bazo y del riñón (VNIBR) (Oseko *et al.*, 2004), que es uno de los virus relacionados con el VBC, pero claramente diferente. También se han documentado otros iridovirus que causan enfermedades similares en peces ornamentales de agua dulce (Sudthongkong *et al.*, 2002a). Estos virus son difíciles de distinguir genéticamente del VNIBR, y no se ha determinado si estas enfermedades deben incluirse en la VIBC. Recientemente, en la Rep. Pop. de China y en la Rep. de Corea se han notificado el iridovirus del cuerpo rojizo del rodaballo (IVCRR) (Shi *et al.*, 2004; 2010) y sus probables sinónimos (Do *et al.*, 2005; Jeong *et al.*, 2006), que están relacionados con el VBC y el VNIBR, aunque son claramente distintos. Se precisa más investigación para poder determinar si la enfermedad causada por el IVCRR debe incluirse o no en la VIBC. Todos estos agentes

patógenos pertenecen al quinto género de la familia Iridoviridae, y no es posible distinguirlos genéticamente ni biológicamente de los ranavirus de los peces, como el virus de la necrosis hematopoyética epizootica (VNHE), el iridovirus del bagre (IVB) y el iridovirus del mero (IVM = iridovirus del mero de Singapur [IVMS]) (Kasornchandra y Khongpradit, 1997; Murali *et al.*, 2002; Qin *et al.*, 2001; 2003; Shi *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2004), ninguno de los cuales es patógeno para el bagre de canal (Nakajima y Maeno, 1998).

2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

Desconocida.

2.1.3. Estabilidad del agente (métodos eficaces de inactivación)

Se inactiva sometiéndolo a 56°C durante 30 minutos; es sensible al éter y al cloroformo; se inactiva en presencia de formalina (0,1%); es estable en tejidos congelados a -80°C.

2.1.4. Ciclo de vida

No es aplicable.

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

En el caso de la infección por el VBC, se sabe que son susceptibles: el bagre de canal (*Pagrus major*), *Acanthopagrus schlegeli*, *Acanthopagrus latus*, *Evynnis japonica*, el medregal del Japón (*Seriola quinqueradiata*), el medregal coronado (*Seriola dumerili*), el medregal rabo amarillo (*Seriola lalandi*), el híbrido de medregal rabo amarillo x medregal del Japón (*S. lalandi* x *S. quinqueradiata*), el jurel dentón (*Pseudocaranx dentex*), el atún rojo (*Thunnus thynnus*), el carite oriental (*Scomberomorus niphonius*), el estornino (*Scomber japonicus*), el jurel japonés (*Trachurus japonicus*), *Oplegnathus fasciatus*, *Oplegnathus punctatus*, la cobia (*Rachycentron canadum*), *Trachinotus blochii*, *Parapristipoma trilineatum*, *Plectorhinchus cinctus*, *Lethrinus haematopterus*, *Lethrinus nebulosus*, *Girella punctata*, la gallineta (*Sebastes schlegeli*), *Pseudosciaena crocea*, el mero de pintas rojas (*Epinephelus akaara*), *Epinephelus septemfasciatus*, el mero malabárico (*Epinephelus malabaricus*), *Epinephelus bruneus*, *Epinephelus coioides*, *Epinephelus awoara*, el mero lutria (*Epinephelus tauvina*), *Epinephelus fuscoguttatus*, el mero guasa (*Epinephelus lanceolatus*), *Lateolabrax japonicus*, los serránidos (*Lateolabrax* sp.), la lubina (*Lates calcarifer*), el híbrido de lubina estriada x tilo blanco americano (*Morone saxatilis* x *M. chrysops*), la perca atruchada (*Micropterus salmoides*), el falso halibut del Japón (*Paralichthys olivaceus*), *Verasper variegatus* y *Takifugu rubripes*. En el caso de la infección por el VNIBR, se sabe que son susceptibles: *Siniperca chuatsi*, el corvinón ocelado (*Sciaenops ocellatus*), el mugil (*Mugil cephalus*) y *Epinephelus* sp.

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

Desde juveniles a adultos (la susceptibilidad de los juveniles en general es más alta que la de los adultos).

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

En el caso de la infección por el VBC, los peces del género *Oplegnathus* son más sensibles que otros.

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

Se observan células infectadas en el bazo, el riñón, el corazón, el intestino y las branquias.

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

Se desconoce.

2.2.6. Vectores

Se desconocen.

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

Se desconocen.

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mecanismos de transmisión

El principal mecanismo de transmisión del VBC es horizontal, por el agua. La transmisión vertical del VBC todavía no se ha estudiado.

2.3.2. Prevalencia

Esta enfermedad se observa en poblaciones de piscifactoría.

2.3.3. Distribución geográfica

Se ha notificado VIBC causada por el VBC y por el VNIBR no solo en Japón sino también en muchas otras partes de distintos países del este y el sureste asiático (Chinese Taipei, China [People's Rep. of], Hong Kong, Korea [Rep. of], Malaysia, Philippines, Singapore, and Thailand) (Chou *et al.*, 1998; Chua *et al.*, 1994; Do *et al.*, 2004; 2005; Gibson-Kueh *et al.*, 2004; Jeong *et al.*, 2003; 2006; Jung *et al.*, 1997; Jung y Oh, 2000; Kawakami y Nakajima, 2002; Kurita *et al.*, 2004; Miyata *et al.*, 1997; Oseko *et al.*, 2004; Sudthongkong *et al.*, 2002b).

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

En función de las especies de peces hospedadores, del tamaño de los peces, de la edad de los mismos, de la temperatura del agua y de otras condiciones del cultivo, la mortalidad oscila entre el 0% y el 100%. La morbilidad se desconoce.

2.3.5. Factores ambientales

Se han observado brotes principalmente en verano a temperaturas de 25°C y superiores.

2.4. Control y prevención

2.4.1. Vacunación

Actualmente se dispone de una vacuna comercial eficaz inactivada por formalina contra el VIBC para el bagre de canal (*Pagrus major*), el jurel dentón (*Pseudocaranx dentex*), Malabar grouper (*Epinephelus malabaricus*), *Epinephelus coioides*), el mero malabárigo (*Epinephelus malabaricus*), *Epinephelus coioides* y otras especies de peces pertenecientes al género *Seriola* de Japón. Es difícil proteger a peces del género *Oplegnathus* mediante vacunación.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

No disponible.

2.4.3. Inmunoestimulación

En estudio.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

En estudio.

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

En estudio.

2.4.6. Agentes bloqueantes

Se desconocen.

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

No se dispone de datos.

2.4.8. Prácticas generales de manejo

Para reducir las pérdidas debidas al VIBC se utilizan varias prácticas generales de manejo, como las siguientes: introducir peces libres de agentes patógenos, implementar prácticas de higiene en las

piscifactorías y evitar prácticas que puedan disminuir la calidad del agua y/o aumentar el estrés, como el hacinamiento o la sobrealimentación.

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

Deben escogerse peces moribundos.

3.2. Conservación de las muestras para su envío

Se guardan los peces a 4°C si van a ser utilizados en un plazo de 24 horas (o a -80°C si se va a tardar más [hasta varios años]).

3.3. Combinación de varias muestras

Pueden combinarse varias muestras de tejidos (bazo y riñón) que contenga no más de cinco peces juveniles cada una (de menos de 3 cm).

3.4. Órganos y tejidos de elección

Aunque pueden utilizarse branquias y vísceras como el bazo, el corazón, el riñón, el hígado y el intestino, también se recomienda tomar muestras de tejidos de bazo y/o de riñón; el bazo en concreto puede ser el órgano más adecuado para la preparación de frotis que se vayan a utilizar en la IFAT.

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

Los peces muertos con signos de descomposición tisular avanzada no serán adecuados para ningún tipo de análisis.

4. Métodos de diagnóstico

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

Los peces afectados se vuelven letárgicos y presentan anemia extrema, petequias en las branquias y aumento de tamaño del bazo.

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Los peces enfermos nadan de forma poco enérgica y presentan movimientos respiratorios anómalos o llamativos causados por la anemia.

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

Palidez en las branquias y aumento de tamaño del bazo.

4.2.2. Bioquímica clínica

Hematocrito bajo.

4.2.3. Anatomopatología microscópica

Véanse los métodos de preparación de frotis (apartado 4.2.5) y la microscopía electrónica/citopatología (apartado 4.2.6). La anatomopatología microscópica debería confirmar la presencia de células anormalmente aumentadas de tamaño en tejidos como el bazo, el corazón, el riñón, el intestino o las branquias.

4.2.4. Preparaciones húmedas

Ninguna.

4.2.5. Frotis

Confirman la presencia de células anormalmente aumentadas de tamaño en frotis de bazo preparados por impronta y teñidos con solución de Giemsa.

4.2.6. Cortes fijados

Confirman la presencia de células anormalmente aumentadas de tamaño, habitualmente basófilas en cortes de bazo teñidos con hematoxilina-eosina.

4.2.7. Microscopía electrónica/citopatología

Confirma la presencia de viriones (200–240 nm de diámetro) en las células aumentadas de tamaño.

4.3. Métodos de detección e identificación del agente

4.3.1. Métodos directos de detección

4.3.1.1. Métodos microscópicos

4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

Ninguna.

4.3.1.1.2. Frotis

El examen de frotis realizados por impronta y fijados en acetona tomados de peces enfermos pone de manifiesto células del bazo, el corazón o el riñón anormalmente aumentadas de tamaño. Estas células aumentadas de tamaño reaccionan frente a MAb anti-VBC (M10) en la prueba de la detección de antígeno basada en anticuerpos (IFAT) (Nakajima *et al.*, 1999).

4.3.1.1.3. Cortes fijados

El examen de cortes histológicos de peces enfermos puede poner de manifiesto células anormalmente aumentadas de tamaño del bazo, el corazón, el riñón, el hígado, el intestino o las branquias. Estas células aumentadas de tamaño puede reaccionar frente a MAb anti-VBC en la prueba de la inmunohistoquímica. Sin embargo, este método todavía no está del todo validado.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

El aislamiento del VBC y del VNIBR de peces marinos se lleva a cabo utilizando la línea celular de la aleta de ronco catire (GF) (Oseko *et al.*, 2004); el aislamiento de los virus de peces de agua dulce, como el gurami, es difícil. Los tejidos de bazo y/o riñón de peces enfermos son muestras adecuadas. Deben cultivarse células en medio basal de Eagle (BME) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% a 25°C en una incubadora de temperatura controlada para garantizar el posterior éxito en el aislamiento del VBC. Pueden obtenerse virus para ser utilizados como controles positivos en el Laboratorio de Referencia de la OIE para la VIBC. Como controles negativos se utilizan células no infectadas. Tras el desarrollo de efecto citopático (ECP) por parte del virus, la identificación del virus se llevaría a cabo utilizando métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos (IFAT) y/o basados en el ácido nucleico (PCR).

4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

Inoculación de monocapas celulares

- i) Tras el procedimiento de extracción de virus descrito en el Capítulo 2.3.0, apartado A.2.2.2, se prepara otra dilución decimal de sobrenadante de homogenado de bazo a 1/10 y se transfiere un volumen adecuado de cada una de las dos diluciones a monocapas celulares de 24 horas de edad. Se inoculan al menos 2 cm² de la monocapa celular drenada con 100 µl de cada dilución.
- ii) Se deja adsorber durante 0,1-1 hora a 25°C y, sin retirar el inóculo, se añade el medio de cultivo celular tamponado a pH 7,6 y suplementado con FBS al 2% (1 ml/pocillo en el caso de las placas de cultivo celular de 24 pocillos), y se incuba a 25°C utilizando una incubadora de temperatura controlada.

Seguimiento de la incubación

- i) Se sigue el curso de la infección en controles positivos y otros cultivos celulares inoculados mediante el examen microscópico diario a 40-100 aumentos durante 10 días. Se recomienda utilizar un microscopio de contraste de fases.
- ii) Si aparece ECP en los cultivos celulares inoculados con diluciones de los homogenados problema, deben llevarse a cabo procedimientos de identificación de inmediato (véase abajo).

Si se está implementando un programa de vigilancia/control sanitario de los peces, tal vez tengan que tomarse medidas para suspender el estado sanitario aprobado en la unidad de producción y/o en la zona (si se aprobó previamente) del cual proceda la muestra positiva al virus. La suspensión del estado aprobado se mantendrá hasta que se demuestre que el virus en cuestión no es VBC ni VNIBR.
- iii) Si no aparece ECP en los cultivos inoculados (a pesar del avance normal del ECP en los controles del virus) tras 10 días de incubación, los cultivos inoculados debe subcultivarse durante 7 días más. En el caso de que el control del virus no desarrolle ECP, el proceso deberá repetirse con células susceptibles nuevas y nuevos lotes de muestras.

Procedimientos para el subcultivo

- i) Se recogen alícuotas de medio de cultivo celular de todas las monocapas inoculadas con diluciones de cada sobrenadante de los homogenados problema.
- ii) Se inoculan monocapas celulares como se ha descrito antes (Inoculación de monocapas celulares, pasos i e ii).
- iii) Se incuban y se les realiza un seguimiento como se ha descrito antes (Inoculación de monocapas celulares, pasos i e ii y Seguimiento de la incubación, pasos i e ii).

Si no aparece ECP, la prueba podría ser declarada negativa.

4.3.1.2.2. Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos (IFAT) a partir de frotis preparados por impronta

Las muestras a analizar son frotis preparados por impronta de bazo de peces afectados.

Se utiliza un frotis preparado por impronta de bazo de peces no infectados como control negativo, y un frotis preparado por impronta de bazo de peces en los que se ha confirmado que están infectados por el VBC como control positivo.

Pueden obtenerse controles positivos (frotis preparados por impronta fijados y secados al aire de bazo de peces infectados) en el Laboratorio de Referencia de la OIE. Se utilizan improntas de bazos de peces sanos como controles negativos.

Procedimiento analítico

- i) Se sangra el pez por completo.
- ii) Se preparan improntas de bazo en portas de vidrio limpios.
- iii) Se guardan los trozos de bazo a 4°C junto con los otros órganos necesarios para el aislamiento del virus por si más tarde se necesitan.
- iv) Se dejan secar las improntas al aire durante 20 minutos.
- v) Se fijan las improntas con acetona fría.
- vi) Se tratan las improntas con la solución de MAb (M10) durante 30 minutos a 37°C en una cámara húmeda.
- vii) Se enjuagan tres veces con PBS.
- viii) Se incuban las improntas durante 30 minutos a 37°C en una cámara húmeda con una solución de anticuerpos específicos anti-ratón conjugados con ITCF preparada según las instrucciones del fabricante. Estos anticuerpos conjugados a ITCF suelen ser de conejo o de cabra.
- ix) Se enjuagan tres veces con PBS.
- x) Se montan los portas con cubreobjetos utilizando solución salina de glicerol antes de la observación al microscopio.

- xi) Se examinan con luz UV directa utilizando un microscopio con oculares de 10 aumentos y objetivos de 20-40 aumentos. Antes de iniciar la observación debe observarse que los controles positivos y negativos dan los resultados esperados.

Niveles de validación:

- Especificidad y sensibilidad: Los MAb M10 pueden detectar tanto el VBC como el VNIBR (31) pero no detectan ranavirus. La reactividad de los MAb contra el IVCRN todavía no está confirmada.
- Método de referencia: Las células anormalmente aumentadas de tamaño con fluorescencia fuerte se confirman mediante IFAT.

Interpretación de los resultados:

- Si la prueba es positiva, los peces de los que se tomaron las muestras se considerarán infectados por el VBC o el VNIBR y por la enfermedad VIBC. Si la prueba es negativa, se procesan las muestras de órganos guardadas a 4°C para el aislamiento del virus en cultivos celulares como se ha descrito antes.

Se dispone de reactivos en el Laboratorio de Referencia de la OIE y en empresas. El Laboratorio de Referencia de la OIE puede suministrar el MAb M10.

4.3.1.2.3. Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos (IFAT, ELISA, etc.) a partir del cultivo celular

El VBC (y probablemente el VNIBR también) no puede identificarse mediante pruebas de neutralización porque los antisueros generados por la inmunización de conejos tienen pocos anticuerpos neutralizantes.

4.3.1.2.3.1 Prueba de la inmunofluorescencia indirecta

Las muestras que tienen que tomarse para el análisis son monocapas celulares infectadas fijadas en acetona que hayan presentado ECP.

Se utiliza una monocapa celular no infectada como control negativo, y se utiliza una monocapa celular infectada por el VBC como control positivo.

La IFAT se lleva a cabo directamente tras el aislamiento del virus en cultivo celular.

- i) Se preparan monocapas de células sobre cubreobjetos hasta alcanzar aproximadamente un 18% de confluencia, que normalmente se logra en un plazo de 24 horas de incubación a 25°C. El contenido en FBS del medio de cultivo celular se reduce al 2%.
- ii) Cuando las monocapas celulares están listas, se inocula la suspensión de virus problema realizando a diluciones decimales seriadas añadiéndola directamente a los pocillos del cultivo celular o a los frascos.
- iii) Se incuba a 25°C durante 24–72 horas.
- iv) Cuando aparece ECP, se retira el medio de cultivo celular y se enjuaga tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se secan al aire las células infectadas y se fijan con acetona fría (guardada a -20°C) durante 10 minutos.
- v) Se dejan secar las monocapas celulares al aire durante al menos 30 minutos y se procesan de inmediato o se congelan a -20°C.
- vi) Se prepara una solución de MAb M10 a la dilución previamente determinada.
- vii) Se tratan las monocapas celulares con la solución de MAb durante 30 minutos a 37°C en una cámara húmeda.
- viii) Se enjuagan las células tres veces durante 5 minutos con PBS.
- ix) Se incuban con un anticuerpo específico anti-ratón conjugado a isotiocianato de fluoresceína (ITCF) (se prepara según las instrucciones del fabricante) durante 30 minutos a 37°C en la oscuridad en una cámara húmeda.
- x) Se enjuagan tres veces durante 5 minutos con PBS.
- xi) Se examinan las monocapas celulares tratadas sobre placas de plástico de inmediato, o se montan los cubreobjetos utilizando solución salina con glicerol a pH 8,5 antes de la observación microscópica.

- xii) Se examinan con luz UV incidente utilizando un microscopio con oculares de 10 aumentos y objetivos de 20-40 aumentos. Antes de iniciar la observación debe observarse que los controles positivos y negativos dan los resultados esperados. Los resultados positivos vienen indicados por una fluorescencia difusa por todo el citoplasma.

Niveles de validación:

- Especificidad y sensibilidad: Los MAb M10 pueden detectar tanto el VBC como el VNIBS (31) pero no detectan ranavirus. La reactividad de los MAb contra el IVCRR todavía no está confirmada.
- Método de referencia: el ECP se caracteriza por muchas células aumentadas de tamaño y el virus se confirma por el ECP mediante IFAT.

Interpretación de los resultados:

- El virus aislado es VBC o VNIBR y la enfermedad es VIBC.

Disponibilidad de la prueba: Se dispone de reactivos y material biológico en el Laboratorio de Referencia de la OIE para la VIBC y en empresas. El Laboratorio de Referencia de la OIE puede suministrar el MAb M10.

4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

4.3.1.2.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa

Las muestras a analizar son bazo de peces afectados o sobrenadantes de cultivos celulares que hayan desarrollado ECP.

Como control negativo se utiliza ADN extraído del bazo de peces no infectados o ADN extraído del sobrenadante de un cultivo celular no infectado. Como control positivo se utiliza ADN extraído del bazo de peces que se haya confirmado que están infectados por el VBC o ADN extraído del sobrenadante de un cultivo celular infectado. Se escogen los controles en función de los tipos de muestras que se vayan a analizar.

Extracción de ADN de muestras de órganos o sobrenadante de cultivos celulares de virus aislados

Las muestras de peces o sobrenadantes de cultivo celular se preparan como describen Kurita *et al.* (1998) para la extracción de ADN. Como control positivo se utiliza órgano que previamente se haya confirmado que está afectado por el VBC (o el VNIBR), o bien sobrenadante de cultivos celulares infectados por el VBC (o VNIBR). Como control negativo se utilizan órganos de peces sanos o sobrenadantes de cultivos celulares no infectados.

Amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa

El VBC y el VNIBR tienen grandes genomas de ADN bicatenario. Se utiliza un conjunto de cebadores, uno directo, 1-F (5'-CTC-AAA-CAC-TCT-GGC-TCA-TC-3') y uno inverso, 1-R (5'-GCA-CCA-ACA-CAT-CTC-CTA-TC-3') para la amplificación de la secuencia génica (570 bases) tanto del ADN del VBC como del ADN del VNIBR mediante PCR (Kurita *et al.*, 1998). (Obsérvese que los cebadores previos de la OIE específicos del VBC, 4-F [5'-CGG-GGG-CAA-TGA-CGA-CTA-CA-3'] y 4-R [5'-CCG-CCT-GTG-CCT-TTT-CTG-GA-3', cuyo producto tiene un tamaño esperable de 568 pb, no amplifican el ADN del VNIBR [Oseko *et al.*, 2004]). Ambos conjuntos de cebadores han sido descritos por Kurita *et al.* (1998).

El ADN extraído (1 µl) se añade al tampón polimerasa Taq que contiene cada cebador 1 mM, desoxinucleótido trifosfato 200 mM, y 1,25 U de polimerasa ADN Ex Taq en tampón 20 mM para PCR Mg²⁺. Esta mezcla se incuba en un termociclador automático programado para 30 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 58°C durante 60 segundos, y 72°C durante 60 segundos, y finalmente se mantiene a 72°C durante 5 minutos. El ADN amplificado (570 pb) se analizar mediante electroforesis en gel de agarosa.

Niveles de validación:

- Especificidad y sensibilidad: el conjunto de cebadores 1-F y 1-R permite amplificar tanto ADN de VBC como de VNIBR con una sensibilidad suficiente. El conjunto previo de cebadores, 4-F y 4-R también tiene una sensibilidad suficiente para el VBC, pero no puede utilizarse para amplificar ADN del VNIBR. La reactividad de estos conjuntos de cebadores para el IVCRR todavía no se ha confirmado.

- Método de referencia: el producto de la PCR del tamaño esperado se confirma claramente mediante electroforesis cuando se utiliza el conjunto de cebadores 1-F y 1-R.

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo en la PCR utilizando el conjunto de cebadores 1-F y 1-R, y con una especificidad confirmada por secuenciación, indica la presencia del VBC o el VNIBR y que la enfermedad es la VIBC. Un resultado positivo en la PCR opcional utilizando el conjunto previo de cebadores, 4-F y 4-R, y ejecutada junto con la PCR previa, indica que el virus es el VBC y que la enfermedad es la VIBC y está causada por el VBC. Un resultado negativo con esta PCR opcional secundaria indica que el virus es el VNIBR y que la enfermedad es VIBC y está causada por el VNIBR.

Disponibilidad de la prueba: Se dispone de reactivos en el Laboratorio de Referencia de la OIE y en fuentes comerciales.

4.3.1.2.4. Purificación del agente

Se lleva a cabo por ultracentrifugación en gradiente de CsCl (10–35% p/p). La gravedad de la banda de virión resultante es de aproximadamente 1,25–1,3 g ml⁻¹.

4.3.2. Métodos serológicos

Todavía no se han desarrollado métodos serológicos en los que se utilice suero de peces afectados.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

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

Tabla 5.1. Métodos para la vigilancia dirigida y el diagnóstico

Método	Vigilancia dirigida				Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
	Larvas	PL	Juveniles	Adultos		
Signos macroscópicos	d	d	d	d	b	d
Bioanálisis (aislamiento del virus en cultivo celular) e identificación mediante IFAT o PCR)	c	c	c	c	a	a
MO directa	d	d	c	d	b	d
Histopatología	d	d	d	d	b	d
ME de transmisión	d	d	d	d	b	d
Pruebas basadas en anticuerpos(IFAT) con virus aislados o frotis preparados por impronta	c	c	c	c	a	a/b
PCR	c	c	c	c	a	a
Secuenciación	d	d	d	d	a	a

PLs = postlarvas; IFAT = prueba de inmunofluorescencia indirecta; PCR = reacción en cadena de la polimerasa; MO = microscopía óptica; ME = microscopía electrónica.

6. Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de la virosis del bagre de canal

No existe ningún método de detección establecido para la vigilancia, porque el estado de portador del agente todavía no se ha estudiado. Los métodos provisionales serían el aislamiento del virus seguido de IFAT o PCR anidada (Choi *et al.*, 2006).

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

La presencia de VBC o VNIBR debe sospecharse si se cumple al menos uno de los siguientes criterios:

- 1) Presencia de signos clínicos típicos y confirmación de células anormalmente aumentadas de tamaño en frotis preparados por impronta o cortes de tejido.
- 2) Presencia de signos clínicos típicos y confirmación de la presencia de viriones en células anormalmente aumentadas de tamaño por microscopía electrónica.
- 3) Aislamiento del virus con ECP específico.
- 4) Presencia de células positivas en la IFAT en frotis preparados por impronta.

7.2. Definición de caso confirmado

La presencia de VBC o VNIBR debe considerarse confirmada si, además de los criterios de 7.1, se cumple uno o más de los siguientes:

- 1) Aislamiento del virus con ECP específico y resultado positivo en la IFAT utilizando cultivos celulares infectados.
- 2) Aislamiento del virus con ECP específico y resultado positivo en la PCR utilizando como molde ADN extraído de virus aislado.
- 3) Resultado positivo en la PCR utilizando como molde ADN de órganos afectados.
- 4) Presencia de células anormalmente aumentadas de tamaño típicas que den positivo en la IFAT con frotis preparados por impronta.

8. Bibliografía

CHOI S.K., KWON S.R., NAM Y.K., KIM S.K. & KIM K.H. (2006). Organ distribution of red sea bream iridovirus (VBC) DNA in asymptomatic yearling and fingerling rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) and effects of water temperature on transition of VBC into acute phase. *Aquaculture*, **256**, 23–26.

CHOU H.Y., HSU C.C. & PENG T.Y. (1998). Isolation and characterization of a pathogenic iridovirus from cultured grouper (*Epinephelus* sp.) in Taiwan. *Fish Pathol.*, **33**, 201–206.

DO J.W., CHA S.J., KIM J.S., AN E.J., PARK M.S., KIM J.W., KIM Y.C., PARK M.A. & PARK J.W. (2005). Sequence variation in the gene encoding the major capsid protein of Korean fish iridoviruses. *Arch. Virol.*, **150**, 351–359.

DO J.W., MOON C.H., KIM H.J., KO M.S., KIM S.B., SON J.H., KIM J.S., AN E.J., KIM M.K., LEE S.K., HAN M.S., CHA S.J., PARK M.S., PARK M.A., KIM Y.C., KIM J.W. & PARK J.W. (2004). Complete genomic DNA sequence of rock bream iridovirus. *Virology*, **325**, 351–363.

GIBSON-KUEH S., NGOH-LIM G.H., NETTO P., KURITA J., NAKAJIMA K. & NG M.L. (2004). A systematic iridoviral disease in mullet, *Mugil cephalus* L. and tiger grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* Forsskal: a first report and study. *J. Fish Dis.*, **27**, 693–699.

HE J.G., DENG M.S., WENG P., LI Z., ZHOU S.Y., LONG Q.X., WANG X.Z., & CHANG S.M. (2001). Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus. *Virology*, **291**, 126–139.

- INOUE K., YAMANO K., MAENO Y., NAKAJIMA K., MATSUOKA M., WADA Y. & SORIMACHI M. (1992). Iridovirus infection of cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathol.*, **27**, 19–27.
- JEONG J.B., JUN J.L., YOO M.H., KIM M.S., KOMISAR J.L. & JEONG H.D. (2003). Characterization of the DNA nucleotide sequences in the genome of red sea bream iridoviruses isolated in Korea. *Aquaculture*, **220**, 119–133.
- JEONG J.B., KIM H.Y., KIM H.K., CHUNG J.-K., KOMISAR J.L. & JEONG H.D. (2006). Molecular comparison of iridoviruses isolated from marine fish cultured in Korea and imported from China. *Aquaculture*, **255**, 105–116.
- JEONG J.B., PARK K.H., KIM H.Y., HONG S.H., CHUNG J.-K., KOMISAR J.L. & JEONG H.D. (2004). Multiplex PCR for the diagnosis of red sea bream iridoviruses isolated in Korea. *Aquaculture*, **235**, 139–152.
- JUNG S., MIYAZAKI T., MIYATA M., DANAYADOL Y. & TANAKA S. (1997). Pathogenicity of iridovirus from Japan and Thailand for the red sea bream *Pagrus major* in Japan, and histopathology of experimentally infected fish. *Fisheries Sci.*, **63**, 735–740.
- JUNG S.J. & OH M.J. (2000). Iridovirus-like infection associated with high mortalities of striped beakperch, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck et Schlegel), in southern coastal areas of the Korean peninsula. *J. Fish Dis.*, **23**, 223–226.
- KASORNCHANDRA J. & KHONGPRADIT R. (1997). Isolation and preliminary characterization of a pathogenic iridovirus in nursing grouper, *Epinephelus marabarius*. In: Diseases in Asian Aquaculture III, Flegel T.W. & MacRae I.H., eds. Manila, Philippines, 61–66.
- KAWAKAMI H. & NAKAJIMA K. (2002). Cultured fish species affected by red sea bream iridoviral disease from 1996 to 2000. *Fish Pathol.*, **37**, 45–47.
- KIM Y.J., JUNG S.J., CHOI T.J., KIM H.R., RAJENDRAN K.V. & OH M.J. (2002). PCR amplification and sequence analysis of irido-like virus infecting fish in Korea. *J. Fish Dis.*, **25**, 121–124.
- KURITA J., NAKAJIMA K., HIRONO I. & AOKI T. (1998). Polymerase chain reaction (PCR) amplification of DNA of red sea bream iridovirus (VBC) *Fish Pathol.*, **33**, 17–23.
- KURITA J., NAKAJIMA K., HIRONO I. & AOKI T. (2002). Complete genome sequencing of red sea bream iridovirus (VBC). *Fisheries Sci.*, **68** (suppl. II), 1113–1115.
- KURITA J., NGOH-LIM G.H., GIBSON-KUEH S., DE LA PENNA L., CHUAH T.T., PALAMISAMY V., SANO M., OSEKO N., MAENO Y. & NAKAJIMA K. (2004). Phylogenetic analysis of red sea bream iridovirus-like viruses in Southeast Asia. In: 7th Asian Fisheries Forum 04 Abstracts, Penang, Malaysia, 381.
- KUSUDA R., NAGATO K. & KAWAI K. (1994). Characteristics of an iridovirus isolated from red sea bream, *Pagrus major*. *Suisanzoshoku*, **42**, 151–156.
- MATSUOKA S., INOUE K. & NAKAJIMA K. (1996). Cultured fish species affected by red sea bream iridoviral disease from 1991 to 1995. *Fish Pathol.*, **31**, 233–234.
- MIYATA M., MATSUNO K., JUNG S.J., DANAYADOL Y. & MIYAZAKI T. (1997). Genetic similarity of iridoviruses from Japan and Thailand. *J. Fish Dis.*, **20**, 127–134.
- MURALI S., WU M.F., GUO I.C., CHEN S.C. YANG H.W & CHANG C.Y. (2002). Molecular characterization and pathogenicity of a grouper iridovirus (GIV) isolated from yellow grouper, *Epinephelus awoara* (Temminck & Schlegel). *J. Fish Dis.*, **25**, 91–100.
- NAKAJIMA K. & KURITA J. (2005). Red sea bream iridoviral disease. *Uirusu.*, **55**, 115–126.
- NAKAJIMA K. & MAENO Y. (1998). Pathogenicity of red sea bream iridovirus and other fish iridoviruses to red sea bream. *Fish Pathol.*, **33**, 143–144.
- NAKAJIMA K., MAENO Y., FUKUDOME M., FUKUDA Y., TANAKA S., MATSUOKA S. & SORIMACHI M. (1995). Immunofluorescence test for the rapid diagnosis of red sea bream iridovirus infection using monoclonal antibody. *Fish Pathol.*, **30**, 115–119.
- NAKAJIMA K., MAENO Y., HONDA A., YOKOYAMA K., TOORIYAMA T. & MANABE S. (1999). Effectiveness of a vaccine against red sea bream iridoviral disease in a field trial test. *Dis. Aquat. Org.*, **36**, 73–75.

NAKAJIMA K., MAENO Y., KURITA J. & INUI Y. (1997). Vaccination against red sea bream iridoviral disease in red sea bream. *Fish Pathol.*, **32**, 205–209.

NAKAJIMA K., MAENO Y., YOKOYAMA K., KAJI C. & MANABE S. (1998). Antigen analysis of red sea bream iridovirus and comparison with other fish iridoviruses. *Fish Pathol.*, **33**, 73–78.

NAKAJIMA K. & SORIMACHI M. (1994). Biological and physico-chemical properties of the iridovirus isolated from cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathol.*, **29**, 29–33.

NAKAJIMA K. & SORIMACHI M. (1995). Production of monoclonal antibodies against red sea bream iridovirus. *Fish Pathol.*, **30**, 47–52.

OSEKO N., CHUAH T.T., PALAMISAMY V., MAENO Y. & KURITA J. (2004). Iridovirus isolated from diseased sea bass *Lates calcarifer* and red drum *Sciaenops ocellatus* causing mass mortality in Malaysia. In: 7th Asian Fisheries Forum 04 Abstracts, Penang, Malaysia, 127.

OSHIMA S., HATA J., HIRASAWA N., OHTAKA T., HIRONO I., AOKI T. & YAMASHITA S. (1998). Rapid diagnosis of red sea bream iridovirus infection using the polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, **32**, 87–90.

OSHIMA S., HATA J., SEGAWA C., HIRASAWA N. & YAMASHITA S. (1996). A method for direct DNA amplification of uncharacterized DNA viruses and for development of a viral polymerase chain reaction assay: Application to the red sea bream iridovirus. *Anal. Biochem.*, **242**, 15–19.

QIN Q.W., CHANG S.F., NGOH-LIM G.H., GIBSON-KUEH S., SHI C. & LAM T.J. (2003). Characterization of a novel ranavirus isolated from grouper *Epinephelus tauvina*. *Dis. Aquat. Org.*, **53**, 1–9.

QIN Q.W., LAM T.J., SHEN H., CHANG S.F., NGOH G.H. & CHEN C.L. (2001). Electron microscopic observations of a marine fish iridovirus isolated from brown-spotted grouper, *Epinephelus tauvina*. *J. Virol. Methods*, **98**, 17–24.

SHI C.Y., JIA K.T., YANG B. & HUANG J. (2010). Complete genome sequence analysis of a Megalocytivirus (family Iridoviridae) associated with turbot mortality in China. *Viol. J.*, **7**, 159.

SHI C.Y., WANG Y.G., YANG S.L., HUANG J. & WANG Q.Y. (2004). The first report of an iridovirus-like agent infection in farmed turbot, *Scophthalmus maximus*, in China. *Aquaculture*, **236**, 11–25.

SONG W.J., QIN Q.W., QIU J., HUANG C.H., WANG F. & HEW C.L. (2004). Functional genomic analysis of Singapore grouper iridovirus: Complete sequence determination and proteomic analysis. *J. Virol.*, **78**, 12576–12590.

SUDTHONGKONG C., MIYATA M. & MIYAZAKI T. (2002a). Iridovirus disease in two ornamental tropical freshwater fishes: African lampeye and dwarf gourami. *Dis. Aquat. Org.*, **48**, 163–173.

SUDTHONGKONG C., MIYATA M. & MIYAZAKI T. (2002b). Viral DNA sequences of genes encoding the ATPase and the major capsid protein of tropical iridovirus isolates which are pathogenic to fishes in Japan, South China Sea and Southeast Asian countries. *Arch. Virol.*, **147**, 2089–2109.

*

* *

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