



**INFORME DE LA REUNIÓN DE LA COMISIÓN DE NORMAS SANITARIAS
DE LA OIE PARA LOS ANIMALES ACUÁTICOS**

Reunión virtual, 24 y 27 de enero, y del 16 al 23 de febrero de 2022

PARTE B – Textos para comentario e información de los Miembros

La Comisión de Normas Sanitarias de la OIE para los Animales Acuáticos (en adelante, Comisión para los Animales Acuáticos) se reunió de manera electrónica los días 24 y 27 de enero y del 16 al 23 de febrero de 2022. La lista de participantes figura en el [Anexo 1](#).

Con el fin de facilitar el desarrollo de la 89.^a Sesión General virtual y anual en mayo de 2022, el informe de la reunión de febrero de 2022 de la Comisión para los Animales Acuáticos se distribuye en dos partes: la **Parte A** (disponible en el sitio web de la OIE) ofrece información sobre los textos nuevos y revisados del *Código Acuático* y del *Manual Acuático* que se propondrán para adopción en la 89.^a Sesión General, y la **Parte B** (adjunta) brinda información sobre otros temas discutidos por la Comisión en su reunión de febrero de 2022, incluyendo textos que circulan para comentario e información.

La Comisión para los Animales Acuáticos agradece a los siguientes Miembros por el envío de sus comentarios sobre los proyectos de texto para el *Código Sanitario para los Animales Acuáticos (Código Acuático)* y el *Manual de las Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos (Manual Acuático)* que circularon en la Parte B de la reunión de la Comisión de febrero de 2021: Chile, China (Rep. Pop.), Colombia, Estados Unidos de América (EE. UU.), Japón, Noruega, Nueva Caledonia, Suiza, Tailandia y los Estados Miembros de la Unión Europea (UE). Además, la Comisión agradeció la valiosa participación y contribución de numerosos expertos de la red científica de la OIE.

La Comisión para los Animales Acuáticos examinó todos los comentarios de los Miembros que se presentaron a tiempo y que estaban acompañados por fundamentos. Las modificaciones se señalan del modo habitual con “subrayado doble” y “~~texto tachado~~” y figuran en los anexos del presente informe. En los anexos, las enmiendas introducidas en la reunión se muestran con un fondo de color para distinguirlas de las efectuadas anteriormente. Dada la gran carga de trabajo, no pudo preparar una explicación detallada de las razones que la motivaron a aceptar o a rechazar los comentarios recibidos y concentró sus explicaciones en los más importantes. Cuando se trata de cambios de naturaleza editorial, no se brinda ningún texto explicativo. La Comisión desea destacar que, en aras de claridad, no se aceptaron todos los textos propuestos por los Miembros; en dichos casos, consideró que el texto era claro tal y como estaba redactado.

La Comisión para los Animales Acuáticos recuerda a los Miembros que los informes de los grupos *ad hoc* están disponibles en el sitio web de la OIE <https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/standards-setting-process/ad-hoc-groups/>. Alienta a los Miembros a examinar el presente informe junto con los informes anteriores de la Comisión y los grupos *ad hoc* al preparar los comentarios, especialmente en temas de larga data.

El índice a continuación enumera los ítems del orden del día presentados en la Parte B (adjunta) del informe de febrero de la Comisión y suministra los enlaces pertinentes dentro del informe. Para información de los Miembros, los textos que figuran en los **Anexos 2 a 12** se presentan para comentario y los **Anexos 13 y 14** para información.

Todos los comentarios sobre los textos pertinentes de este informe deberán remitirse a la sede de la OIE hasta el **15 de julio de 2022** para que la Comisión los examine en su reunión de septiembre de 2022.

Todos los comentarios deberán remitirse por correo electrónico al Departamento de Normas: AAC.Secretariat@oie.int.

Los comentarios se deberán transmitir en formato Word, y no en PDF, para así facilitar su incorporación en los documentos de trabajo de la Comisión.

Los comentarios se deberán presentar en el anexo pertinente, e incluir toda modificación de texto, en base a una justificación estructurada o en referencias científicas publicadas. Las supresiones propuestas deberán indicarse con “~~texto tachado~~” y, las inserciones, con “subrayado doble”. Se ruega a los Miembros que no utilicen la función automática “Resaltar cambios” del procesador de texto, ya que dichos cambios se pierden en el proceso de recopilación de las propuestas de los Miembros incluidas en los documentos de trabajo de la Comisión. Asimismo, se ruega a los Miembros que no reproduzcan el texto íntegro de un capítulo, ya que así se pueden pasar por alto los comentarios en el momento de preparar los documentos de trabajo.

La Comisión para los Animales Acuáticos anima encarecidamente a los Miembros a participar en la elaboración de las normas internacionales de la OIE enviando sus comentarios sobre este informe.

Índice incluido el orden del día con los temas tratados

1. PLAN DE TRABAJO DE LA COMISIÓN PARA LOS ANIMALES ACUÁTICOS.....	5	Anexo 2
2. CÓDIGO SANITARIO PARA LOS ANIMALES ACUÁTICOS DE LA OIE ..	5	
2.1. Textos para comentario de los Miembros	5	
2.1.1. Mercancías seguras – Artículos X.X.3. de los capítulos específicos de enfermedad.....	5	
2.1.1.1. Artículos revisados 8.X.3. para los capítulos específicos de las enfermedades de los anfibios	6	Anexo 3
2.1.1.2. Artículos revisados 11.X.3. para los capítulos específicos de los moluscos.....	6	Anexo 4
2.1.2. Artículo 9.3.1. del Capítulo 9.3. Infección por <i>Hepatobacter penaei</i> (hepatopancreatitis necrotizante).....	7	Anexo 5
2.1.3. Artículos 9.4.1. y 9.4.2. del Capítulo 9.4. Infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV).....	7	Anexo 6
2.2. Textos para información de los Miembros	7	
2.2.1. Enfermedades emergentes	7	
2.2.1.1. Infección por el virus del edema de la carpa.....	7	
2.2.1.2. Infección por <i>Enterocytozoon hepatopenaei</i> (EHP)	9	
3. MANUAL DE PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO PARA LOS ANIMALES ACUÁTICOS DE LA OIE	10	
3.1. Textos para comentario de los Miembros	10	
3.1.1. Sección 2.2. Enfermedades de los crustáceos	10	
3.1.1.1. Capítulo 2.2.1. Enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda	10	Anexo 7
3.1.1.2. Capítulo 2.2.3. Infección por <i>Hepatobacter penaei</i> (hepatopancreatitis necrotizante)	11	Anexo 8
3.1.1.3. Capítulo 2.2.4. Infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética	11	Anexo 9
3.1.2. Sección 2.3. Enfermedades de los peces	12	
3.1.2.1. Capítulo 2.3.1. Infección por <i>Aphanomyces invadans</i> (síndrome ulcerative epizoótico)	12	Anexo 10
3.1.2.2. Capítulo 2.3.2. Infección por el virus de la necrosis hematopoyética epizoótica.....	12	Anexo 11
3.1.2.3. Capítulo 2.3.7. Infección por el iridovirus de la dorada japonesa.....	14	Anexo 12
3.2. Textos para información de los Miembros	16	
3.2.1. Documento sobre el uso de los métodos de ADN ambiental para la vigilancia de las enfermedades de los animales acuáticos	16	Anexo 13
3.2.2. Tabla 4.1. Métodos de diagnóstico recomendados por la OIE y su nivel de validación para la vigilancia de animales aparentemente sanos y la investigación de animales clínicamente afectados	17	Anexo 14
3.3. Otros temas.....	17	
3.3.1. Desarrollo de una plataforma para la comunicación entre los expertos de laboratorios sobre la problemática del rendimiento de las pruebas de diagnóstico	17	
4. GRUPOS AD HOC	18	
4.1. Grupo <i>ad hoc</i> sobre la susceptibilidad de las especies de moluscos a la infección por enfermedades de la lista de la OIE	18	
4.2. Grupo <i>ad hoc</i> sobre los nuevos proyectos de Capítulos 4.X. Preparación de emergencia frente a las enfermedades y 4.Y. Gestión de los brotes de enfermedad	18	
4.3. Grupo <i>ad hoc</i> sobre la susceptibilidad de las especies de peces a la infección por enfermedades de la lista de la OIE	18	
5. CENTROS DE REFERENCIA DE LA OIE O CAMBIO DE EXPERTOS....	18	
5.1. Evaluación de las solicitudes para la designación como centro de referencia de la OIE en temas de sanidad de los animales acuáticos o cambio de expertos.....	18	
5.2. Revisión de los informes anuales de las actividades en 2021 de los centros de referencia de la OIE.....	19	

5.3.	Evaluación de las solicitudes para la designación de un Laboratorio de referencia de la OIE para la infección por el virus iridiscente de los decápodos tipo 1 (DIV 1)	19
6.	PRÓXIMA REUNIÓN	20

1. PLAN DE TRABAJO DE LA COMISIÓN PARA LOS ANIMALES ACUÁTICOS

En su reunión de septiembre de 2021, la Comisión para los Animales Acuáticos examinó los puntos del plan de trabajo en curso y anticipó algunos elementos para finalizarlos. El actual plan de trabajo se distribuyó para comentario en el informe de septiembre de 2021 de la Comisión.

La Comisión convocó una reunión adicional en noviembre de 2021 en la que revisó y priorizó el nuevo trabajo añadido al plan de trabajo. En la determinación de las prioridades, se tuvieron en cuenta múltiples factores, entre ellos el impacto y la mejora esperada de las normas, el beneficio para los Miembros y sus comentarios, las actividades dentro de la Estrategia de la OIE sobre la sanidad de los animales acuáticos, los comentarios de la sede y los progresos alcanzados en el plan de trabajo anterior.

La Comisión destacó que, como previsto para 2022, se avanzaría en los ítems del plan de trabajo que dependen de grupos *ad hoc*.

El plan de trabajo de la Comisión figura en el [Anexo 2](#) para comentario de los Miembros.

2. CÓDIGO SANITARIO PARA LOS ANIMALES ACUÁTICOS DE LA OIE

2.1. Textos para comentario de los Miembros

2.1.1. Mercancías seguras – Artículos X.X.3. de los capítulos específicos de enfermedad

Contexto

En su reunión de septiembre de 2020, la Comisión para los Animales Acuáticos revisó el Artículo X.X.3 de todos los capítulos específicos de enfermedad a tenor de los comentarios que sugerían que los tratamientos de tiempo/temperatura recomendados en estos artículos representaban diferentes niveles de tratamiento térmico y que algunos no eran viables comercialmente por disminuir la calidad del producto. La finalidad de las enmiendas propuestas a los Artículos X.X.3. en todo el *Código Acuático* es especificar los tratamientos de tiempo/temperatura requeridos para inactivar el agente patógeno. La Comisión señaló que se trata de un cambio del enfoque actual basado en las mercancías y que se hizo en respuesta a los comentarios de los Miembros que sugerían que algunos de los niveles de tratamiento térmico en el texto actual eran incoherentes o no eran comercialmente viables, ya que disminuían la calidad del producto.

La Comisión aceptó iniciar una revisión del Título 9. *Enfermedades de los crustáceos* y elaboró un ejemplo de artículo, el Artículo X.X.3. *Infección por el virus del síndrome de las manchas blancas*, para demostrar el enfoque sugerido. La Comisión hizo hincapié en la dificultad de proponer un modelo uniforme del Artículo X.X.3. debido a las diferencias de tratamientos de tiempo/temperatura y a los tipos de productos que figuran en el Artículo X.X.3. En su informe de septiembre de 2020, la Comisión difundió para comentario el modelo, es decir, el Artículo 9.8.3.

En su reunión de febrero de 2021, la Comisión examinó los comentarios sobre el modelo de Artículo 9.8.3. y aplicó estas modificaciones al Artículo 9.X.3. de todos los capítulos específicos de enfermedad del Título 9. *Enfermedades de los crustáceos* del *Código Acuático*. Los tratamientos de tiempo/temperatura previstos en los Artículos 9.X.3 se modificaron de acuerdo con la información brindada en el documento “[Safe commodity assessments for OIE listed aquatic animal diseases](#)”, publicado en 2016. Además, la Comisión propuso los requisitos para el tratamiento término específico para las harinas. El Artículo revisado 9.X.3. circuló para comentario de los Miembros en el informe de la Comisión de febrero de 2021.

En su reunión de septiembre de 2021, la Comisión examinó los comentarios y revisó los Artículos propuestos 9.X.3. en aras de claridad, incluida la reordenación de los productos de animales y distribuyó para comentario los Artículos revisados 9.X.3.

2.1.1.1. Artículos revisados 8.X.3. para los capítulos específicos de las enfermedades de los anfibios

Informes de la Comisión donde se discutió el tema:

Informes de septiembre de 2020 (ítem 4.7., página 10), febrero de 2021 (Parte B: ítem 1.4., página 8) y septiembre de 2021 (ítem 5.1.5., página 24).

Reunión de febrero de 2022

Como acordado en su reunión de septiembre de 2021, la Comisión para los Animales Acuáticos modificó el Artículo 8.X.3. de todos los capítulos específicos de las enfermedades de los anfibios en aras de coherencia con el enfoque propuesto para el Artículo 9.X.3 (crustáceos) y el Artículo 10.X.3. (peces) de los capítulos específicos de enfermedad.

Los tratamientos de tiempo/temperatura previstos en el Artículo 8.X.3. se basaron en la información proporcionada por el documento “[Safe commodity assessments for OIE listed aquatic animal diseases](#)”, publicado en 2016. Estos artículos también se modificaron en aras de coherencia con los cambios pertinentes propuestos para adopción en el Artículo 9.X.3. (crustáceos) y el Artículo 10.X.3. (peces).

Los Artículos revisados 8.X.3. para los capítulos específicos de las enfermedades de los anfibios figuran en el [Anexo 3](#) para comentario de los Miembros.

2.1.1.2. Artículos revisados 11.X.3. para los capítulos específicos de los moluscos

Informes de la Comisión donde se discutió el tema:

Informe de septiembre de 2020 (ítem 4.7., página 10), febrero de 2021 (Parte B: ítem 1.4., página 8) y septiembre de 2021 (ítem 5.1.5., página 24).

Reunión de febrero de 2022

Como acordado en su reunión de septiembre de 2021, la Comisión para los Animales Acuáticos modificó el Artículo 11.X.3. de todos los capítulos específicos de las enfermedades de los moluscos en aras de coherencia con el enfoque propuesto para el Artículo 9.X.3 (crustáceos) y el Artículo 10.X.3. (peces) de los capítulos específicos de enfermedad.

Los tratamientos de tiempo/temperatura previstos en el Artículo 11.X.3. se basaron en la información proporcionada por el documento “[Safe commodity assessments for OIE listed aquatic animal diseases](#)”, publicado en 2016. Estos artículos también se modificaron en aras de coherencia con los cambios pertinentes propuestos para adopción en el Artículo 9.X.3 (crustáceos) y el Artículo 10.X.3. (peces).

La Comisión informó a los Miembros que había incluido una revisión de las evaluaciones de las mercancías seguras para garantizar que el tiempo/las temperaturas de inactivación de los agentes patógenos se basen en las evidencias científicas actuales.

La Comisión observó que, en el caso de algunas enfermedades de los moluscos, en el *Código Acuático* no figura actualmente ninguna mercancía segura tratada térmicamente. Esto se debe a que no se consideraron productos relevantes para estas enfermedades ni sus hospedadores susceptibles en el momento en que se realizó originalmente la evaluación de mercancías seguras. La Comisión convino en que este aspecto debía volver a considerarse en el marco de la revisión de la evaluación de las mercancías seguras.

Debido a la falta de evidencias suficientes sobre los requisitos de tiempo/temperatura para la inactivación de algunas enfermedades de los moluscos, la Comisión acordó mantener los requisitos de tratamiento térmico actual para los productos de moluscos sellados herméticamente que figuran en los Artículos 11.X.3. hasta que las evaluaciones acerca de la seguridad de las mercancías puedan actualizarse con vistas a reflejar cualquier información científica nueva.

Por último, la Comisión también modificó el lapso de tiempo de una fracción de minuto a minutos y segundos para facilitar la traducción a los diferentes idiomas.

Los Artículos revisados 11.X.3. para los capítulos específicos de las enfermedades de los moluscos figuran en el [Anexo 4](#) para comentario de los Miembros.

2.1.2. Artículo 9.3.1. del Capítulo 9.3. Infección por *Hepatobacter penaei* (hepatopancreatitis necrotizante)

La Comisión para los Animales Acuáticos aceptó modificar el Artículo 9.3.1. en aras de coherencia con el Capítulo 1.3.

El Artículo revisado 9.3.1. del Capítulo 9.3. *Infección por Hepatobacter penaei* (hepatopancreatitis necrotizante) figura en el [Anexo 5](#) para comentario de los Miembros.

2.1.3. Artículos 9.4.1. y 9.4.2. del Capítulo 9.4. Infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV)

La Comisión para los Animales Acuáticos aceptó modificar el Artículo 9.4.1. para reflejar una actualización en la clasificación taxonómica de la infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa y en aras de coherencia con otros capítulos específicos de enfermedad (ver ítem 3.1.1.3.).

En el Artículo 9.4.2., la Comisión aceptó enumerar las especies de crustáceos susceptibles al virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa, de acuerdo con la convención para enumerar a las especies susceptibles en orden alfabético según su nombre común (ver ítem 3.1.1.3.).

Los Artículos revisados 9.4.1. y 9.4.2. del Capítulo 9.4. *Infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa* figuran en el [Anexo 6](#) para comentario de los Miembros.

2.2. Textos para información de los Miembros

2.2.1. Enfermedades emergentes

2.2.1.1. Infección por el virus del edema de la carpa

Se recibieron comentarios de Japón.

Contexto

En su reunión de febrero de 2020, la Comisión para los Animales Acuáticos revisó la información científica sobre la infección por el virus del edema de la carpa y acordó que esta enfermedad cumplía con la definición de la OIE de "enfermedad emergente", de acuerdo con el Artículo 1.1.4. del *Código Acuático*. En su reunión de septiembre de 2020, la Comisión informó a los Miembros que seguiría de cerca la situación y solicitó a los Miembros que notificaran la infección por el virus del edema de la carpa como enfermedad emergente.

En su reunión de febrero de 2021, la Comisión revisó los comentarios de los Miembros y analizó las nuevas evidencias sobre la infección por el virus del edema de la carpa. La Comisión también difundió para información de los Miembros una lista exhaustiva de las evidencias que había revisado y reiteró que la infección por el virus del edema de la carpa cumplía con la definición de enfermedad emergente.

En su reunión de septiembre de 2021, la Comisión revisó las últimas evidencias científicas y observó que la infección por el virus del edema de la carpa seguía afectando la producción y causando eventos de mortalidad en las poblaciones silvestres y de cría, sin estar clara por el momento la gravedad de los impactos. La Comisión reiteró que, de detectarse la infección, es imperativo notificarla a la OIE como enfermedad emergente, de conformidad con el Artículo 1.1.4. del *Código Acuático*.

Informes de la Comisión donde se discutió el tema:

Informe de febrero de 2020 (ítem 7.3.3., página 17); septiembre de 2020 (ítem 6.3., página 17); febrero de 2021 (Parte B: ítem 2.2., página 11) y septiembre de 2021 (ítem 5.2.1.1., página 27).

Reunión de febrero de 2022

La Comisión revisó la información científica más reciente sobre la infección por el virus del edema de la carpa y observó que las siguientes pruebas confirmaban aún más su gravedad en algunas regiones del mundo:

- se descubrió que la infección por el virus del edema de la carpa era el agente patógeno causante de una grave mortalidad en carpas comunes adultas silvestres (*Cyprinus carpio*), en Italia, a mediados de junio de 2020 (Marsella *et al.*, 2021);
- durante el brote y el evento de mortalidad masiva en la población de carpas comunes silvestres en el lago Swartout, Minnesota, EE. UU., se observaron altas cargas virales del virus del edema de la carpa (Tolo *et al.*, 2021);
- en un estudio elaborado para determinar la prevalencia del virus del edema de la carpa en Alemania, se lo detectó en el 69 % de las poblaciones de carpa común (*Cyprinus carpio*) y en el 41 % de las poblaciones de carpa koi (una variedad de *Cyprinus carpio*). Además, se observaron altas cargas del virus en la mayoría de las muestras de peces de poblaciones de carpa común o carpa koi clínicamente afectadas. Los autores concluyeron que la infección por el virus del edema de la carpa tenía una alta prevalencia en Alemania e implicaba la propagación de la enfermedad a través del intenso comercio de carpas comunes y carpas koi (Ademek *et al.*, 2021);
- el perfil químico sanguíneo de la carpa común infectada por el virus del edema de la carpa reveló que la infección provoca efectos adversos complejos y graves alteraciones metabólicas debido al deterioro de la función respiratoria y excretora de las branquias (Pikula *et al.*, 2021).

Los hallazgos notificados a finales de la década de 1990 (Way *et al.*, 2015) y a principios de la década de 2000 (Haenen *et al.*, 2014) solo mostraban la posibilidad de que la infección por el virus del edema de la carpa se circunscribiera a zonas muy limitadas de Europa y Estados Unidos. La rápida propagación a otros países y la mortalidad inducida desde 2009 confirman que se cumple la “condición a)” de la definición de enfermedad emergente. Además, la Comisión consideró que el cultivo de la carpa común se considera una acuicultura tradicional en muchos países y que las mortalidades causadas por la infección por el virus del edema de la carpa suscitaron una gran preocupación entre los científicos y los productores de peces ornamentales debido a informes adicionales y literatura científica publicada cada año.

Asimismo, la Comisión señaló que el genoma del virus del edema de la carpa publicado en 2021 (Mekata *et al.*, 2021) ayudaría a promover los estudios epidemiológicos, el análisis filogenético del virus y el desarrollo de nuevas pruebas de diagnóstico de esta infección en el futuro.

En base a la revisión de las últimas evidencias científicas, y junto con la información proporcionada en los informes anteriores, la Comisión determinó que la infección por el virus del edema de la carpa sigue cumpliendo con la definición de “enfermedad emergente”. La Comisión recordó a los Miembros que cualquier detección de la infección por el virus del edema de la carpa debe ser notificada a la OIE como enfermedad emergente, de acuerdo con el Artículo 1.1.4. del *Código Acuático*.

La Comisión informó a los Miembros de la elaboración en curso de una ficha técnica de enfermedad para la infección por el virus del edema de la carpa, que se publicará en el sitio web de la OIE.

Referencias:

ADAMEK, M., HELING, M., BAUER, J., TEITGE, F., BERGMANN, S.M., KLEINGELD, D.W., WELZEL, A., SCUDA, N., BACHMANN, J., LOUIS, C.S., BÖTTCHER, K., BRÄUER, G., STEINHAGEN, D. & JUNG-SCHROERS, V. (2021). It is everywhere-A survey on the presence of carp edema virus in carp populations in Germany. *Transboundary and Emerging Diseases*, 1-15.

MARSELLA, A., PRETTO, T., ABBADI, M., QUARTESAN, R., CORTINOVIS, L., FIOCCHI, E., MANFRIN, A. & TOFFAN, A. 2021. Carp edema virus-related mortality in wild adult common carp (*Cyprinus carpio*) in Italy. *Journal of Fish Diseases*. **44(7)**, 939-947.

MEKATA, T, KAWATO ,Y, ITO, T. 2021. Complete Genome Sequence of Carp Edema Virus Isolated from Koi Carp. *Microbiology Resource Announcements*.; **10(16)**, e00239-21. doi: 10.1128/MRA.00239-21.

HAENEN, O., WAY, K., GORGOGLIONE, B., ITO, T., PALEY, R., BIGARRE, L. & WALTZEK, T. (2016). Novel viral infections threatening Cyprinid fish. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **36(1)**, 11.

HAENEN, O, WAY, K., STONE, D, ENGELSMA, M., 2014. Koi Sleepy Disease' found for the first time in Koi Carps in the Netherlands (in Dutch). *Tijdschr Diergeneeskd*. **139(4)**, 26-29.

PIKULA, J., POJEZDAL, L., PAPEZIKOVA, I., MINAROVA, H., MIKULIKOVA, I., BANDOUCHOVA, H., BLAHOVA, J., BEDNARSKA, M., MARES, J. & PALIKOVA, M. (2021). Carp edema virus infection is associated with severe metabolic disturbances in fish. *Frontiers in Veterinary Science*, **8**, 679970. 10.3389/fvets.2021.679970

TOLO, I.E., PADHI, S.K., HUNDT, P.J., BAJER, P.G., MOR, S.K. & PHELPS, M.B.D. (2021). Host range of carp edema virus (CEV) during a natural mortality event in a Minnesota lake and update of CEV associated mortality events in the USA. *Viruses*, **13(3)**, 400.

WAY, K., MAIRTIN, P., READING, A., WILLIAMS, C., ENGELSMA, M., HAENEN, O. & STONE, D. (2015). Detection of carp edema-like virus in archive DNA and tissue sampled from disease outbreaks in common carp (*Cyprinus carpio*) in the UK and the Netherlands: a link with spring carp mortality syndrome. *EAFP 17th International Conference on disease of fish and shellfish, Las Palmas de Gran Canaria 7–11 September 2015*. **Poster P-029**, p 253

2.2.1.2. Infección por *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP)

Se recibieron comentarios de Nueva Caledonia.

Contexto

En su reunión de septiembre de 2021, la Comisión para los Animales Acuáticos tomó nota de que, desde hacía cierto tiempo, se habían notificado importantes repercusiones económicas y productivas relacionadas con la infección por *Enterocytozoon hepatopenaei*, en particular en Asia. También observó la existencia de métodos de diagnóstico y pruebas de que esta infección puede propagarse a través del comercio. La Comisión convino en que la infección por *Enterocytozoon hepatopenaei* se ajusta a la definición de enfermedad emergente y que su detección debe notificarse a la OIE como enfermedad emergente, de conformidad con el Artículo 1.1.4. del *Código Acuático*.

Informe de la Comisión donde se discutió el tema:

Informe de septiembre de 2021 (ítem 5.2.1.2., página 28).

Reunión de febrero de 2022

La Comisión destacó la falta de nueva información científica que modificase la evaluación de la infección por *Enterocytozoon hepatopenaei* como enfermedad emergente. La Comisión recordó a los Miembros que toda detección de la infección por *Enterocytozoon hepatopenaei* debía notificarse a la OIE como enfermedad emergente, de conformidad con el Artículo 1.1.4. del *Código Acuático*.

La Comisión informó a los Miembros de la elaboración en curso de una ficha técnica de enfermedad para la infección por *Enterocytozoon hepatopenaei*, que se publicará en el sitio web de la OIE.

3. MANUAL DE PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO PARA LOS ANIMALES ACUÁTICOS DE LA OIE

3.1. Textos para comentario de los Miembros

La Comisión para los Animales Acuáticos recordó a los Miembros del inicio del proceso de reformato progresivo de los capítulos específicos de enfermedad del *Manual Acuático* a partir de un nuevo modelo. Dado que los capítulos reformateados y actualizados presentan cambios sustanciales, la Comisión acordó en su reunión de septiembre de 2019 que en el informe solo se presentarían versiones limpias de los capítulos, sin cambios aparentes. Los cambios posteriores realizados en estas revisiones iniciales a raíz de los comentarios de los Miembros se indicarán con el estilo habitual (es decir, tachado para ~~las supresiones~~ y doble subrayado para las adiciones).

Se creará un documento comparativo entre la versión adoptada de un capítulo y el nuevo texto propuesto. Este documento no se incluirá en el informe de la Comisión, pero estará disponible si se lo solicita al Departamento de Normas de la OIE (AAC.Secretariat@oie.int).

La Comisión inició el proceso de revisión del Capítulo 2.2.0. *Información general (enfermedades de los crustáceos)* y, en el marco de esta revisión, consultará a todos los expertos de los laboratorios de referencia para las enfermedades de los crustáceos. La Comisión observó la necesidad de introducir algunos cambios en los capítulos revisados sobre las enfermedades de los crustáceos, una vez completado el proyecto de revisión del Capítulo 2.2.0., en aras de complementariedad.

El proceso de revisión de los capítulos actualizados y reformulados demostró grandes diferencias existentes entre los capítulos en cuanto al nivel de detalle de la descripción de los métodos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la Sección 4.4. *Amplificación del ácido nucleico* y la presentación de la información. La Comisión decidió tratar esta cuestión elaborando un modelo para la descripción de los métodos de PCR, que incluirá un texto conciso, uniforme y general sobre los métodos de extracción de ácidos nucleicos, los parámetros durante el ciclado y los controles utilizados en las pruebas, al tiempo que ofrecerá toda la información necesaria sobre las secuencias de cebadores y sondas en forma de cuadro. El modelo propuesto se enviará para comentario a los laboratorios de referencia de la OIE y se finalizará en la próxima reunión de septiembre de 2022. Una vez terminado, se aplicará a los capítulos.

3.1.1. Sección 2.2. Enfermedades de los crustáceos

3.1.1.1. Capítulo 2.2.1. Enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda

De conformidad con el ámbito de aplicación del capítulo, la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) designa la infección por cepas de *Vibrio parahaemolyticus* (V_{pAHPND}) que contienen un plásmido de ~70 kbp con genes que codifican homólogos de las toxinas relacionadas con el insecto *Photobacterium* (Pir), PirA y PirB. La Comisión tomó nota de las notificaciones de la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda causada por otras especies de *Vibrio*. En la próxima reunión de septiembre de 2022, la Comisión evaluará, en consulta con los dos laboratorios de referencia de la OIE, toda información publicada que se reciba sobre especies de *Vibrio* no *parahaemolyticus* asociadas con la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda.

La Comisión para los Animales Acuáticos revisó el Capítulo 2.2.1. *Enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda*, actualizado por los expertos del laboratorio de referencia de la OIE y reformulado en base al nuevo modelo de capítulo de enfermedades.

Las principales modificaciones incluyen:

- información actualizada sobre el agente etiológico;
- secciones actualizadas sobre el modelo de la enfermedad, la bioseguridad y las estrategias de control de la enfermedad, la selección y toma de muestras, el transporte y la manipulación;
- actualización de la sección sobre los métodos de diagnóstico incluida la finalización de la Tabla 4.1.;

- definiciones revisadas de caso sospechoso y caso confirmado en animales aparentemente sanos y clínicamente afectados, y
- finalización de las tablas en la sección sobre la sensibilidad del diagnóstico y especificidad para las pruebas de diagnóstico.

El Capítulo revisado 2.2.1. *Enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda* figura en el [Anexo 7](#) para comentario de los Miembros.

3.1.1.2. Capítulo 2.2.3. *Infección por Hepatobacter penaei (hepatopancreatitis necrotizante)*

La Comisión para los Animales Acuáticos revisó el Capítulo 2.2.3. *Infección por Hepatobacter penaei (hepatopancreatitis necrotizante)*, actualizado por los expertos del laboratorio de referencia de la OIE y reformateado en base al nuevo modelo de capítulo de enfermedad.

Las principales modificaciones incluyen:

- información actualizada sobre el agente etiológico;
- secciones actualizadas sobre el modelo de la enfermedad, la bioseguridad y las estrategias de control de la enfermedad, la selección y la toma de muestras, el transporte y la manipulación;
- actualización de la sección sobre los métodos de diagnóstico incluida la finalización de la Tabla 4.1. y revisión de la sección acerca de los montajes húmedos, amplificación del ácido nucleico y pruebas moleculares;
- definiciones revisadas de caso sospechoso y caso confirmado en animales aparentemente sanos y clínicamente afectados, y
- finalización de las tablas en la sección sobre la sensibilidad del diagnóstico y especificidad para las pruebas de diagnóstico.

El Capítulo revisado 2.2.3. *Infección por Hepatobacter penaei (hepatopancreatitis necrotizante)* figura en el [Anexo 8](#) para comentario de los Miembros.

3.1.1.3. Capítulo 2.2.4. *Infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética*

La Comisión para los Animales Acuáticos revisó el Capítulo 2.2.4. *Infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética*, actualizado por los expertos del laboratorio de referencia de la OIE y reformateado en base al nuevo modelo de capítulo de enfermedad.

Las principales modificaciones incluyen:

- información actualizada del ámbito de aplicación del capítulo;
- secciones actualizadas sobre los factores del agente, los modelos de enfermedad, las estrategias de bioseguridad y de control de enfermedad y sobre la selección y toma de muestras, el transporte y la manipulación;
- actualización de la sección sobre los métodos de diagnóstico incluida la finalización de la Tabla 4.1. y revisión de las pruebas moleculares y bioensayos, y
- definiciones revisadas de caso confirmado y de caso sospechoso en animales afectados clínicamente y aparentemente sanos.

El Capítulo revisado 2.2.4. *Infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética* figura en el [Anexo 9](#) para comentario de los Miembros.

3.1.2. Sección 2.3. Enfermedades de los peces

3.1.2.1. Capítulo 2.3.1. Infección por *Aphanomyces invadans* (síndrome ulcerative epizoótico)

Contexto

En su reunión de septiembre de 2021, la Comisión para los Animales Acuáticos revisó el primer proyecto de Capítulo 2.3.1. Infección por *Aphanomyces invadans* (síndrome ulcerative epizoótico), reformateado en base al nuevo modelo de capítulo de enfermedad. La Comisión decidió seguir trabajando en la revisión y estudió nuevamente el capítulo en su reunión de febrero de 2022.

Informe de la Comisión donde se discutió el tema:

Informe de septiembre de 2021 (ítem 6.2.2., página 41).

Reunión de febrero de 2022

La Comisión para los Animales Acuáticos revisó el Capítulo 2.3.1. Infección por *Aphanomyces invadans* (síndrome ulcerative epizoótico), actualizado por los expertos del laboratorio de referencia de la OIE y reformateado en base al nuevo modelo de capítulo de enfermedad.

Las principales modificaciones incluyen:

- información actualizada del ámbito de aplicación del capítulo;
- información actualizada sobre el agente etiológico;
- secciones actualizadas sobre los modelos de enfermedad, estrategias de bioseguridad y de control de enfermedad y sobre la selección y toma de muestras, transporte y manipulación;
- actualización de la sección sobre los métodos de diagnóstico incluida la finalización de la Tabla 4.1. y revisión de la descripción de los métodos de preparación y de las pruebas moleculares;
- definiciones revisadas de caso confirmado y de caso sospechoso en animales afectados clínicamente y aparentemente sanos.

El Capítulo revisado 2.3.1. Infección por *Aphanomyces invadans* (síndrome ulcerative epizoótico) figura en el [Anexo 10](#) para comentario de los Miembros.

3.1.2.2. Capítulo 2.3.2. Infección por el virus de la necrosis hematopoyética epizoótica

Se recibieron comentarios de China (Rep. Pop.), Colombia, Estados Unidos de América, Suiza, Tailandia y la UE.

Contexto

La Comisión para los Animales Acuáticos revisó el Capítulo 2.3.2. Infección por el virus de la necrosis hematopoyética epizoótica, actualizado por los expertos del laboratorio de referencia de la OIE y reformateado en base al nuevo modelo de capítulo de enfermedad. El nuevo capítulo se difundió para comentario de los Miembros en el informe de la Comisión de septiembre de 2021.

Informe de la Comisión donde se discutió el tema:

Informe de septiembre de 2021 (ítem 6.1.3., página 31)

Reunión de febrero de 2022

La Comisión se mostró en desacuerdo con los comentarios que solicitaban la supresión de la Sección 2.2.2. Especies con evidencia incompleta de susceptibilidad. Se consideró que esta sección, incluida en todos los capítulos revisados del *Manual Acuático*, proporciona información útil para orientar la investigación y las evaluaciones del riesgo.

En la Sección 2.2.3. Probabilidades de infección por especie, vida del huésped, población o subpoblaciones, la Comisión no estuvo de acuerdo en trasladar al Capítulo 2.3.0. *Información general (enfermedades de los peces)* una frase en la que se da importancia a las tres etapas del ciclo vital en la Tabla 4.1. La Comisión destacó posibles diferencias entre las etapas de las especies hospedadoras susceptibles a las distintas enfermedades de los peces.

En aras de claridad, la Comisión acordó sustituir “has a high case fatality rate” (“tiene una alta tasa de letalidad”) por “once infected most fish succumb to the disease” (“una vez infectados, la mayoría de los peces sucumben a la enfermedad”) en la Sección 2.3.1. Mortalidad, morbilidad y prevalencia.

En la Sección 2.4.5. Métodos de inactivación, la Comisión acordó añadir que el virus de la necrosis hematopoyética epizoótica en el sobrenadante de cultivo celular es resistente "a 60°C durante 15 minutos" para mejorar la exactitud de la frase.

En la Sección 3.5.2. Preservación de las muestras para la detección molecular, la Comisión no acordó incluir más información sobre otras opciones de conservación, sino que sustituyó el texto por una referencia cruzada al Capítulo 2.3.0. de la Sección B.2.5. Uso de técnicas moleculares para pruebas de vigilancia, pruebas confirmatorias y diagnóstico. Se trata de una enmienda horizontal que también se introducirá en el modelo.

Asimismo, en la Sección 3.5.3. Muestras para histopatología, inmunohistoquímica o hibridación *in situ*, la Comisión acordó sustituir el texto por una referencia cruzada al Capítulo 2.3.0. de la Sección B.2.2. como se había acordado como enmienda horizontal en la última reunión. El texto ya está incluido en el modelo.

En la última reunión de septiembre de 2021, la Comisión propuso enmiendas al texto explicativo de la Tabla 4.1. Métodos de diagnóstico recomendados por la OIE y su nivel de validación para la vigilancia de animales aparentemente sanos y la investigación de animales clínicamente afectados. En esta reunión, se finalizó el texto y se está introduciendo en todos los capítulos específicos de enfermedad (ver ítem 3.2.2.).

En la Tabla 4.1., la Comisión añadió la calificación "++" a todas las etapas de la vida a efectos del propósito C de la PCR convencional. Diagnóstico confirmatorio de un resultado sospechoso de vigilancia o diagnóstico presuntivo, y "1" como nivel de validación.

En la Sección 4.2. Histopatología y citopatología, se suprimieron dos frases del último párrafo por tratarse de observaciones al microscopio electrónico y no ser pertinentes para un contexto de diagnóstico.

En la Sección 4.4.1. PCR en tiempo real, un Miembro preguntó por las razones de mencionar los kits de extracción de ARN, dado que la necrosis hematopoyética epizoótica es un virus de ADN. Los expertos del laboratorio de referencia indicaron que los kits son adecuados para la extracción del ADN y que el texto indica que se utilizan "en el Laboratorio de Referencia de la OIE" y que "se pueden utilizar kits de extracción de ácidos nucleicos disponibles en el mercado".

También en la Sección 4.4.1., un Miembro cuestionó la referencia a la amplificación por PCR de 45 ciclos de 95°C durante 15 segundos. Los expertos del laboratorio de referencia consideraron que el uso de 45 ciclos aumenta la sensibilidad de la prueba y reduce el riesgo de resultados falsos negativos.

En la Tabla 4.4.1.1. Secuencias de cebadores y sondas de Ranavirus y en la Tabla 4.4.2.1. Secuencias de los cebadores MCP-1 y MCP-2, la Comisión acordó añadir "(5'-3')" después de "Secuencia" en el título y suprimir “5-” y “3-” de las secuencias de cebadores, en aras de coherencia.

En la Sección 4.4.2. PCR convencional, la Comisión acordó sustituir “bromuro de etidio” por “que contenga SYBRTM Safe (Thermo Fisher Scientific) o equivalente”. Esta modificación se aplicará en todo el *Manual Acuático*.

En la Sección 4.7., Inmunohistoquímica (IHC), se añadió la etapa de incubación del anticuerpo secundario marcado con biotina, antes omitido.

El Capítulo revisado 2.3.2. Infección por el virus de la necrosis hematopoyética epizootica figura en el [Anexo 11](#) para comentario de los Miembros.

3.1.2.3. Capítulo 2.3.7. Infección por el iridovirus de la dorada japonesa

Se recibieron comentarios de China (Rep. Pop.), Colombia, Estados Unidos de América, Suiza, Tailandia y la UE.

Contexto

En su reunión de septiembre de 2021, la Comisión para los Animales Acuáticos revisó el Capítulo 2.3.7., Infección por el iridovirus de la dorada japonesa, actualizado por los expertos del laboratorio de referencia de la OIE y redactado a partir del nuevo modelo de capítulo sobre enfermedades.

La Comisión es consciente de que otros virus del género *Megalocytivirus*, por ejemplo, el virus de la necrosis infecciosa del bazo y del riñón y el iridovirus del cuerpo rojizo del rodaballo también pueden causar enfermedades en los peces. Actualmente, estos virus no figuran en la lista de la OIE y no se incluyen en el ámbito de aplicación del capítulo de la infección por el iridovirus de la dorada japonesa. Si el virus de la necrosis infecciosa del bazo y del riñón y el iridovirus del cuerpo rojizo del rodaballo u otros megalocivirus se incluyeran en la lista, los virus tendrían que ser evaluados según los criterios de inclusión del Capítulo 1.2. del *Código Acuático*. Si se considera que cumplen los criterios de inclusión en la lista, se podría proponer su inclusión a la Asamblea de la OIE. Mientras tanto, este capítulo sigue centrándose en el iridovirus de la dorada japonesa. El capítulo revisado se difundió para comentario en el informe de la Comisión de septiembre de 2021.

Informe de la Comisión donde se discutió el tema:

Informe de septiembre de 2021 (ítem 6.1.6., página 38).

Reunión de febrero de 2022

La Comisión no aceptó añadir a la Sección 1. Ámbito de aplicación que el iridovirus de la dorada japonesa es uno de los genotipos del virus de la necrosis infecciosa del bazo y del riñón. La Comisión señaló que hay muchos virus, incluido el iridovirus de la dorada japonesa, que no están designados formalmente por el ICTV¹, aunque este virus esté incluido en la lista de la OIE. La Comisión destacó que el agente etiológico se discute en la Sección 2.1.1.

En la Sección 2.1.1. Agente etiológico, la Comisión acordó incluir el iridovirus del pámpano y una referencia de apoyo como sinónimo del iridovirus de la dorada japonesa. La Comisión también aceptó cambios de redacción para aclarar el texto de la sección.

En la Sección 2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles, la Comisión acordó corregir la clasificación del jurel japonés (*Trachurus japonicus*) trasladándolo de la familia Haemulidae a la familia Carangidae. La Comisión no aceptó cambiar “*Lateolabrax* sp.” por “*Lateolabrax* spp.”, y prefiere esperar a que el Grupo *ad hoc* sobre la susceptibilidad de las especies de peces a la infección por enfermedades de la lista de la OIE evalúe la propuesta.

Como descrito en el ítem 3.1.2.2., la Comisión rechazó los comentarios que solicitan la supresión de la Sección 2.2.2. Especies con evidencia incompleta de susceptibilidad.

¹ ICTV: Comité Internacional de Taxonomía de Virus.

En la Sección 2.2.4. Distribución del patógeno en el hospedador, la Comisión acordó incluir “otros órganos” en la lista de órganos en los que se observan células infectadas, ya que el patógeno suele causar infecciones sistémicas, por lo que la mayoría de los órganos, si no todos, pueden estar infectados.

En la Sección 2.3.4. Modos de transmisión y ciclo de vida, la Comisión no aceptó sustituir “agua”, el principal modo de transmisión horizontal del iridovirus de la dorada japonesa, por “el agua contaminada o la cohabitación con peces infectados por el iridovirus de la dorada japonesa”, ya que la propuesta no mejoraba la claridad del texto.

En la Sección 2.3.6. Distribución geográfica, la Comisión acordó sustituir los países en los que se ha detectado el virus y mencionar los continentes, de acuerdo con el modelo. La Comisión también acordó suprimir una frase y una referencia sobre el papel del comercio internacional en la propagación de los virus, por no inscribirse dentro de la sección.

En la Sección 3.5.2. Preservación de las muestras para la detección molecular, la Comisión no acordó incluir más información sobre otras opciones de conservación, sino que sustituyó el texto por una referencia cruzada al Capítulo 2.3.0. de la Sección B.2.5. Uso de técnicas moleculares para pruebas de vigilancia, pruebas de confirmación y diagnóstico. Se trata de una enmienda horizontal que también se introducirá en el modelo.

Asimismo, en la Sección 3.5.3. Muestras para histopatología, inmunohistoquímica o hibridación *in situ*, la Comisión acordó sustituir el texto por una referencia cruzada al Capítulo 2.3.0. de la Sección B.2.2 según lo acordado como enmienda horizontal en la última reunión. El texto ya se incluyó en el modelo.

En la última reunión de septiembre de 2021, la Comisión propuso enmiendas al texto explicativo de la Tabla 4.1. Métodos de diagnóstico recomendados por la OIE y su nivel de validación para la vigilancia de animales aparentemente sanos y la investigación de animales clínicamente afectados. En esta reunión, finalizó el texto que se está integrando a todos los capítulos específicos de enfermedad (ver ítem 3.2.2).

En la Tabla 4.1., la Comisión añadió calificaciones a todas las etapas de la vida para la histopatología, la prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes, el cultivo celular y tanto la PCR en tiempo real como la convencional para el propósito C. Diagnóstico confirmatorio de un resultado sospechoso de vigilancia o diagnóstico presuntivo. Las clasificaciones son coherentes con las definiciones de caso que figuran en la Sección 6. Criterios de diagnóstico corroborativo.

En la Sección 4.2. Histopatología y citopatología, la Comisión no estuvo de acuerdo en incluir “otros órganos” a los enumerados que pueden revelar células anormalmente agrandadas en la sección histológica, ya que las células ampliadas constituyen uno de los cambios típicos del diagnóstico histopatológico y no aparecerán en todos los órganos infectados.

En la Sección 4.3. Cultivo celular para el aislamiento, la Comisión acordó suprimir el texto que indica la dificultad de aislamiento de los virus a partir de peces de agua dulce como el gurami que se aplica a los genotipos del virus de la necrosis infecciosa del bazo y del riñón y no a los genotipos del iridovirus de la dorada japonesa.

En la Sección 4.4.2. PCR convencional, la Comisión observó la omisión de las secuencias de los cebadores 4-F y 4-R, que amplifican específicamente el iridovirus de la dorada japonesa. Las secuencias fueron reincorporadas junto con los tamaños esperados de los amplicones generados.

En la Sección 4.5. Secuenciación de amplicones, un Miembro propuso que se incluyera más información sobre la interpretación de los resultados de la secuencia Sanger generada a partir de una muestra positiva a la PCR, debido a la complejidad causada por el solapamiento de la secuencia entre las cepas del genotipo del iridovirus de la dorada japonesa y las cepas de los genotipos del virus de la necrosis infecciosa del bazo y del riñón y el iridovirus del cuerpo rojizo del rodaballo. La Comisión reconoció la complejidad del iridovirus de la dorada japonesa, así como las incoherencias en el etiquetado de las secuencias publicadas, incluidas las del GenBank/EMBL, ya que algunos investigadores publican las secuencias como del virus de la necrosis infecciosa del bazo y del riñón, mientras que otros publican sus secuencias como el iridovirus de la dorada japonesa, lo que impone un análisis filogenético. La Comisión reconoció la utilidad de añadir un enfoque similar al adoptado en el Capítulo 2.3.3. Infección por *Gyrodactylus salaris*, en el que se incluyó

un cuadro con los números de acceso al GenBank para las secuencias de nucleótidos. La Comisión acordó seguir trabajando en esta cuestión y revisar el proyecto de cuadro en su reunión de septiembre.

En la Sección 6.1.2. Definición de caso confirmado en animales aparentemente sanos y en la Sección 6.2.2. Definición de caso confirmado en animales clínicamente afectados, la Comisión no estuvo de acuerdo en suprimir “with sequence consistent with RSIV” (“con secuencia compatible con el iridovirus de la dorada japonesa”), tras la confirmación por análisis de la secuencia porque los productos amplificados de la PCR deben ser secuenciados y analizados en comparación con el gen específico.

El Capítulo revisado 2.3.7. Infección por el iridovirus de la dorada japonesa figura en el [Anexo 12](#) para comentario de los Miembros.

3.2. Textos para información de los Miembros

3.2.1. Documento sobre el uso de los métodos de ADN ambiental para la vigilancia de las enfermedades de los animales acuáticos

Se recibieron comentarios de Canadá, China (Rep. Pop.), Colombia, Estados Unidos de América, Reino Unido, Suiza, Tailandia, la UE y AU-IBAR.

Contexto

El seguimiento de los sistemas acuáticos mediante el ADN ambiental (ADNe) constituye un campo de investigación que avanza rápidamente y que ofrecerá oportunidades de métodos rápidos, rentables y no invasivos para detectar agentes patógenos, especialmente en las poblaciones acuáticas silvestres donde el muestreo puede ser difícil o donde no es recomendable la obtención de muestras. La Comisión para los Animales Acuáticos reconoce que existen métodos de ADNe para detectar agentes patógenos de varias enfermedades de la lista, como *Xenohalotis californiensis*, *Batrachochytrium dendrobatidis*, *Aphanomyces astaci* y *Gyrodactylus salaris*.

La Comisión acordó que, puesto que estos métodos están disponibles y se utilizan en la actualidad, se recomienda se brinden orientaciones sobre su aplicación adecuada y sus posibles limitaciones. Observó que, al no disponer de estimaciones precisas sobre la capacidad del diagnóstico para diseñar programas de vigilancia que utilicen pruebas de ADNe, puede que los datos obtenidos a partir de los métodos de ADNe no sean adecuados para fundamentar la declaración de ausencia de enfermedad de la lista. Asimismo, la Comisión indicó que la confirmación de la infección por una de las enfermedades de la lista no podía realizarse utilizando métodos de ADNe. Sin embargo, los resultados positivos podrían constituir un criterio apropiado para un caso sospechoso.

En su reunión de febrero de 2021, la Comisión aceptó elaborar un documento de orientación que expusiera las ventajas y limitaciones de los métodos de detección del ADNe en el contexto del diagnóstico o de la vigilancia de enfermedad. El presente documento tiene por objeto indicar los usos más apropiados y los informes sobre el rendimiento de los ensayos requeridos para que se considere la inclusión de una prueba de ADN ambiental en el *Manual Acuático*.

En su reunión de septiembre de 2021, la Comisión revisó el documento de debate y señaló que se distribuiría para una segunda ronda de comentarios para después publicarlo en el sitio web de la OIE.

Informes de la Comisión donde se discutió el tema:

Informe de febrero 2020 (ítem 8.4.2., página 22), septiembre de 2020 (ítem 6.4., página 17), febrero de 2021 (Parte B: ítem 3.1., página 12) y septiembre de 2021 (ítem 6.1.1., página 30).

Reunión de febrero de 2022

Varios Miembros comentaron que, aunque las metodologías del ADN ambiental deben seguir desarrollándose y validándose, no bastan para respaldar una declaración de ausencia de enfermedad o para confirmar un caso positivo, y plantean riesgos de falsos resultados positivos. La Comisión señaló que todos

Comisión de Normas Sanitarias de la OIE para los Animales Acuáticos/Enero y febrero de 2022

estos comentarios apoyan en realidad las conclusiones del documento. La Comisión desea hacer hincapié en la necesidad de considerar cuidadosamente y por adelantado la aplicación de los métodos de ADN ambiental en un programa de vigilancia y la manera cómo se interpretará y se investigará más a fondo cualquier resultado positivo.

La Comisión reiteró que el documento proporciona una orientación general y, por lo tanto, no aceptó incluir información específica sobre los diferentes tipos de patógenos. Sin embargo, aceptó cambiar el término "ADN" cuando está sin el prefijo "e" por el de ADN/ARN en todo el documento.

El documento finalizado, que brinda el marco de trabajo para el enfoque de los métodos del ADN ambiental, figura en el [Anexo 13](#) para información. La Comisión lo pondrá a disposición en su sitio web próximamente.

3.2.2. *Tabla 4.1. Métodos de diagnóstico recomendados por la OIE y su nivel de validación para la vigilancia de animales aparentemente sanos y la investigación de animales clínicamente afectados*

Se recibieron comentarios de Colombia, Estados Unidos de América, Suiza y la UE.

Contexto

La Tabla 4.1 del nuevo modelo de capítulo del *Manual Acuático* incluye una columna para el nivel de validación de cada método de prueba (de 1 a 4 de acuerdo con el Capítulo 1.1.2. *Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas*), además de calificar cada prueba según su finalidad. El hecho de contar con dos sistemas de puntuación distintos para dos componentes diferentes de uso e interpretación de las pruebas de diagnóstico ha generado cierta confusión. A menudo, se han planteado preguntas sobre las diferencias entre ambas puntuaciones (por ejemplo, un nivel bajo de validación, pero una puntuación alta para la finalidad o viceversa).

Con el fin de tratar esta cuestión, la Comisión revisó el texto explicativo de la Tabla 4.1. en el modelo del capítulo específico de enfermedad y solicitó su opinión a los laboratorios de referencia de la OIE antes de incluirlo en el modelo de capítulo.

Informe de la Comisión donde se discutió el tema:

Informe de septiembre de 2021 (ítem 6.1.7.3., página 40).

Reunión de febrero de 2022

La Comisión revisó los comentarios recibidos de los Miembros y de los expertos de los laboratorios de referencia y modificó el texto en consecuencia. La Comisión rechazó la propuesta de proporcionar referencias para la clasificación de cada prueba: las clasificaciones actuales son relativas y cualitativas y no necesitan ser demasiado complicadas. La Comisión tampoco aceptó que la calificación en función del objetivo de una prueba sea coherente con el nivel de validación de dicha prueba; por ejemplo, un método puede haber sido validado hasta el nivel 3, pero puede ser costoso, lento o su rendimiento diagnóstico puede ser deficiente, por lo que su calificación podría ser sólo "+".

El documento finalizado figura en el [Anexo 14](#) para información. Se aplicó a todos los capítulos revisados en esta reunión (dos capítulos propuestos para adopción y seis aprobados para comentario de los Miembros), y se incorporará a los futuros capítulos actualizados del *Manual Acuático*.

3.3. Otros temas

3.3.1. *Desarrollo de una plataforma para la comunicación entre los expertos de laboratorios sobre la problemática del rendimiento de las pruebas de diagnóstico*

En el último párrafo del texto explicativo de la Tabla 4.1., se indica que los laboratorios de referencia de la OIE esperan comentarios sobre el rendimiento del diagnóstico de las pruebas recomendadas. En la tercera reunión del Comité directivo del marco de colaboración regional de la OIE para la sanidad de los animales

acuáticos en Asia y el Pacífico, y en las comunicaciones a la sede, los expertos de los laboratorios de referencia de la OIE preguntaron cómo se les comunicarían estas cuestiones para que los laboratorios pudieran prestar asesoramiento y modificar las normas, cuando se lo considere oportuno.

La Comisión debatió esta cuestión y analizó posibles mecanismos para fomentar la comunicación entre los laboratorios de referencia de la OIE y con otros laboratorios. La Comisión convino en que esta cuestión requiere mayor consideración y consulta con los expertos de los laboratorios de referencia. Mientras tanto, los laboratorios que dispongan de información sobre los resultados de los diagnósticos de cualquiera de las pruebas recomendadas en el *Manual Acuático* pueden enviar sus comentarios a los laboratorios de referencia de la OIE o a la secretaría de la Comisión para los Animales Acuáticos.

4. GRUPOS AD HOC

4.1. Grupo *ad hoc* sobre la susceptibilidad de las especies de moluscos a la infección por enfermedades de la lista de la OIE

El Grupo *ad hoc* sobre la susceptibilidad de las especies de moluscos a la infección por enfermedades de la lista de la OIE se reunió durante los meses de noviembre y diciembre de 2021 para evaluar la susceptibilidad de las especies de moluscos a la infección por *Marteilia refringens*.

La Comisión para los Animales Acuáticos comunicó que el grupo *ad hoc* no había completado sus evaluaciones de *M. refringens* debido a la complejidad asociada con el agente patógeno. La Comisión revisó el informe provisional del grupo *ad hoc*, en el que se describe el trabajo realizado hasta la fecha, y aportó sus comentarios. El grupo *ad hoc* tiene previsto reunirse de nuevo en junio de 2022 a efectos de finalizar las evaluaciones de las especies susceptibles a *M. refringens*.

4.2. Grupo *ad hoc* sobre los nuevos proyectos de Capítulos 4.X. Preparación de emergencia frente a las enfermedades y 4.Y. Gestión de los brotes de enfermedad

El Grupo *ad hoc* sobre la preparación de emergencia frente a las enfermedades y la gestión de los brotes de enfermedades se reunió durante el mes de diciembre de 2021 para iniciar los trabajos de elaboración de los nuevos proyectos de capítulos 4.X. *Preparación de emergencia frente a las enfermedades* y 4.Y. *Gestión de brotes de enfermedades*, teniendo en cuenta la estructura del artículo que figura en el informe de la reunión de febrero de 2021 de la Comisión para los Animales Acuáticos.

La Comisión para los Animales Acuáticos revisó el informe provisional del grupo *ad hoc* y el trabajo realizado hasta el momento sobre el proyecto de Capítulo 4.X. El grupo *ad hoc* tiene previsto volver a reunirse en marzo de 2022 con el fin de proseguir el desarrollo de los proyectos de capítulo.

4.3. Grupo *ad hoc* sobre la susceptibilidad de las especies de peces a la infección por enfermedades de la lista de la OIE

Se informó a la Comisión de que el Grupo *ad hoc* sobre la susceptibilidad de las especies de peces a la infección por enfermedades de la lista de la OIE volvería a ser convocado para avanzar en su trabajo sobre la aplicación de los criterios del Capítulo 1.5., para incluir en la lista de enfermedades de la lista de la OIE a las especies susceptibles a la infección por un patógeno específico. El grupo *ad hoc* tiene previsto reunirse dos veces en 2022 y realizar evaluaciones de la susceptibilidad de las especies de peces a la infección por el iridovirus del besugo.

5. CENTROS DE REFERENCIA DE LA OIE O CAMBIO DE EXPERTOS

5.1. Evaluación de las solicitudes para la designación como centro de referencia de la OIE en temas de sanidad de los animales acuáticos o cambio de expertos

La Comisión para los Animales Acuáticos examinó las solicitudes de cambio de experto y recomendó su aceptación:

Infección por el virus del síndrome de las manchas blancas y la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda

El Dr. Han-Ching Wang reemplaza a la Dra. Grace Lo en el International Centre for Scientific Development of Shrimp Aquaculture, National Cheng Kung University (NCKU), Tainan District, New Taipei City, Taipei Chino

*Infección por *Mikrocytos mackini**

La Dra. Cathryn Abbot reemplaza a la Dra. Gary Meyer en Pacific Biological Station, Nanaimo, British Columbia, Canadá

5.2. Revisión de los informes anuales de las actividades en 2021 de los centros de referencia de la OIE

Se recibieron los informes anuales de todos los laboratorios de referencia de la OIE para las enfermedades de los animales acuáticos (37) y de todos los centros colaboradores para las cuestiones relativas a los animales acuáticos (3).

De conformidad con los Procedimientos adoptados para la designación de laboratorios de referencia de la OIE (<https://www.oie.int/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-2>) y los Procedimientos para la designación de centros colaboradores de la OIE (<https://www.oie.int/en/what-we-offer/expertise-network/collaborating-centres/#ui-id-2>), la Comisión para los Animales Acuáticos revisó todos los informes recibidos, interesándose en particular en el desempeño de cada centro de referencia en cuanto al cumplimiento de los mandatos en beneficio de los Miembros de la OIE.

La Comisión tomó nota de las importantes contribuciones realizadas por los centros de referencia durante el año 2021, a pesar de las continuas dificultades causadas por la pandemia de COVID-19, y agradeció a los expertos designados por dirigir estas valiosas contribuciones a la misión de la OIE. La Comisión agradeció el apoyo entusiasta y el asesoramiento experto que los centros de referencia prestaron a la OIE. En particular, la Comisión agradece el apoyo continuo y las contribuciones esenciales de los expertos de los laboratorios de referencia para la revisión de los capítulos específicos de las enfermedades del *Manual Acuático*.

Una institución con varios laboratorios de referencia de la OIE presentó información general sobre las enfermedades que cubre en cada informe, lo que dificultó la determinación de la información específica de la enfermedad en los informes individuales. El año que viene se solicitará a los expertos que faciliten información clara sobre la enfermedad en sus informes.

Un laboratorio indicó que había perdido su acreditación para el sistema de gestión de calidad ISO 17025, ya que habían cambiado sus actividades de pruebas acuáticas a humanas como respuesta nacional a la pandemia de la COVID-19. El laboratorio prevé recuperar la acreditación durante este año. De acuerdo con los POE, el laboratorio será suspendido temporalmente por un periodo que no sea superior a dos años, y se restablecerá su designación en caso de que presente un certificado dentro del periodo de dos años. En caso contrario, perderá su condición de laboratorio de referencia y tendrá que presentar una nueva solicitud de evaluación cuando vuelva a estar acreditado.

La Comisión observó que muy pocos laboratorios estaban trabajando en la validación de pruebas según la norma de la OIE y anima a los laboratorios a ser más activos en este ámbito. La Comisión también tomó nota de que el modelo de informe cuestiona si los laboratorios están desarrollando y validando nuevos métodos de prueba, pero no pregunta nada sobre los métodos de prueba existentes. La Comisión acordó revisar el modelo en su próxima reunión de septiembre con miras a garantizar que las preguntas sean más pertinentes para las importantes actividades de los laboratorios de referencia, la estrategia de los animales acuáticos de la OIE y el futuro del sistema científico de la OIE.

5.3. Evaluación de las solicitudes para la designación de un Laboratorio de referencia de la OIE para la infección por el virus iridiscente de los decápodos tipo 1 (DIV 1)

La Comisión revisó la solicitud para la designación de un de Laboratorio de referencia de la OIE para la infección por el virus iridiscente de los decápodos tipo 1 y recomendó su aceptación.

Laboratorio de Referencia de la OIE para la infección por el virus iridiscente de los decápodos tipo 1 (DIV 1)

Aquatic Medicine Laboratory, Biology Division of Animal Health Research Institute (AHRI), Council of Aquaculture, TAIPEI CHINO
Tel.: (+886-2) 2621.2111 ext. 203; (+886-2) 762.3039

Comisión de Normas Sanitarias de la OIE para los Animales Acuáticos/Enero y febrero de 2022

E-mail: ctu@mail.nvri.gov.tw; yplu@mail.nvri.gov.tw; Sitio web: www.nvri.gov.tw
Experto de referencia designado: Dr. Chien Tu

6. PRÓXIMA REUNIÓN

La próxima reunión de la Comisión para los Animales Acuáticos está prevista del 14 al 21 de septiembre de 2022.

.../Anexos

INFORME DE LA REUNIÓN DE LA COMISIÓN DE NORMAS SANITARIAS DE LA OIE PARA LOS ANIMALES ACUÁTICOS

Reunión virtual, 24 y 27 de enero, 16–23 de febrero de 2022

Lista de participantes

MIEMBROS DE LA COMISIÓN

<p>Dr. Ingo Ernst (Presidente) Director Aquatic Pest and Health Policy Animal Division Department of Agriculture, Water and the Environment GPO Box 858 Canberra ACT 2601 AUSTRALIA Tel.: +61 2 6272 5615 ingo.ernst@awe.gov.au</p>	<p>Dr. Kevin William Christison Department of Forestry, Fisheries and the Environment Directorate: Aquaculture Research and Development Private Bag X 2 Vlaeberg, 8018 SUDÁFRICA KChristison@dffe.gov.za</p>	<p>Dra. Alicia Gallardo Lagno (Vicepresidente) Senior adviser FARMAVET University of Chile Av. Santa Rosa 1175, La Pintana, Chile. Tel.: +56 2 985609 agallardol@gmail.com</p>
<p>Dra. Fiona Geoghegan (Vicepresidente) Legislative Officer European Commission DG SANTE, 101 Rue Froissart, Brussels 1000, BÉLGICA fiona.geoghegan@ec.europa.eu</p>	<p>Dr. Prof. Hong Liu Deputy Director Animal and Plant Inspection and Quarantine Technical Center Shenzhen Customs District General Administration of Customs, 1011 building of Fuqiang Road Futianqu, Shenzhen City, Guangdong province CHINA (Rep. Pop.) szc_liuhong@customs.gov.cn 709274714@qq.com</p>	<p>Dr. Espen Rimstad Professor in virology Faculty of Veterinary Medicine Department of Paraclinical Sciences (PARAFAG) Campus Ås Universitetstunet 3, 1430 Ås NORUEGA Espen.rimstad@nmbu.no</p>

OTROS PARTICIPANTES

<p>Dr. Edmund Peeler Epidemiologist Aquatic Pests and Pathogens, Barrack Road, Weymouth Dorset, DT4 8UB REINO UNIDO Tel.: +44 (0)1305 206746 ed.peeler@cefias.co.uk</p>	<p>Dr. Mark Crane CSIRO Honorary Fellow Research Group Leader AAHL Fish Diseases Laboratory Australian Centre for Disease Preparedness (ACDP) CSIRO 5 Portarlington Road Geelong VIC 3220 Private Bag 24 Geelong VIC 3220 AUSTRALIA Tel.: +61 3 5227 5118 mark.anne.crane@gmail.com</p>
--	--

SEDE DE LA OIE

<p>Dra. Gillian Mylrea Jefa Departamento de Normas g.mylrea@oie.int</p>	<p>Dr. Gounalan Pavade Coordinador científico Departamento Científico g.pavade@oie.int</p>	<p>Dr. Stian Johnsen Comisionado Departamento de Normas s.johnsen@oie.int</p>
--	---	--

Sra. Sara Linnane

Secretaria de redacción científica –
Normas internacionales
Departamento Científico
s.linnane@oie.int

Dra. Bernita Giffin

Coordinadora científica para la sanidad
de los animales acuáticos
Departamento de Normas
b.giffin@oie.int

Dr. Benedetto Zangrilli

Coordinador científico para la sanidad
de los animales acuáticos
Departamento de Normas
b.zangrilli@oie.int

Sra. Elizabeth Marier

Comisionada
Departamento de Normas
e.marier@oie.int

[Volver al orden del día](#)

PLAN DE TRABAJO PARA LA COMISIÓN PARA LOS ANIMALES ACUÁTICOS

Ítems propuestos para adopción en la Sesión General del mayo de 2022

Código Acuático			
Capítulo/Tema	Situación		
	Septiembre de 2021	Febrero de 2022	Sesión General de mayo de 2022
Guía del usuario	Revisión de los artículos modificados y presentación para comentario	Revisión de los comentarios (1.ª ronda)	Propuesta para adopción
Definiciones del Glosario: “autoridad competente”, “autoridad veterinaria” y “servicios de sanidad de los animales acuáticos”	Revisión de los comentarios (1ª ronda) y presentación para comentario	Revisión de los comentarios (2.ª ronda)	Propuesta para adopción
Definiciones del Glosario: “condiciones elementales de bioseguridad”, “plan de bioseguridad”, “sistema de detección precoz” y “vigilancia pasiva”	Revisión de los comentarios (1.ª ronda) y presentación para comentario	Revisión de los comentarios (2.ª ronda)	Propuesta para adopción
Capítulo 1.3. Inclusión en la lista de la infección por el virus de la tilapia del lago	Reevaluación para inclusión en la lista de la infección por el virus de la tilapia del lago	Revisión de los comentarios (1.ª ronda)	Propuesta para adopción
Capítulo 1.4. Vigilancia de la sanidad de los animales acuáticos	Revisión de los comentarios (1.ª ronda)	Revisión de los comentarios (2.ª ronda)	Propuesta para adopción
Modelo de Artículos X.X.4. a X.X.8. de los capítulos específicos de enfermedad relativos a la declaración de ausencia de [Patógeno X]	Revisión de los comentarios (2.ª ronda)	Revisión de los comentarios (3.ª ronda)	Propuesta para adopción
Mercancías seguras – Enfermedades de los Crustáceos – Artículos 9.X.3.	Revisión de los comentarios (1.ª ronda)	Revisión de los comentarios (2.ª ronda)	Propuesta para adopción
Nuevo Capítulo 9.X. Infección por el virus iridiscente de los decápodos tipo 1	Revisión del proyecto de capítulo y presentación para comentario	Revisión de los comentarios (1.ª ronda)	Propuesta para adopción
Mercancías seguras – Enfermedades de los peces – Artículos 10.X.3.	Revisión de los artículos modificados y presentación para comentario	Revisión de los comentarios (1.ª ronda)	Propuesta para adopción
Capítulo 10.1. Infección por el virus de la necrosis hematopoyética epizoótica	Revisión de los artículos modificados y presentación para comentario de los Miembros	Revisión de los comentarios (1.ª ronda)	Propuesta para adopción
Capítulo 10.7. Infección por el herpesvirus de la carpa koi	Revisión de los artículos modificados y presentación para comentario de los Miembros	Revisión de los comentarios (1.ª ronda)	Propuesta para adopción
Especies susceptibles Infección por el herpesvirus del abalón – Artículos 11.1.1. y 11.1.2.	Revisión del informe del grupo <i>ad hoc</i> y presentación de los artículos modificados para comentario	Revisión de los comentarios (1.ª ronda)	Propuesta para adopción
Especies susceptibles Infección por <i>Bonamia exitiosa</i> – Artículos 11.2.1. y 11.2.2.	Revisión de los comentarios (1.ª ronda)	Revisión de los comentarios (2.ª ronda)	Propuesta para adopción

Manual Acuático			
Capítulo/Tema	Situación		
	Septiembre de 2021	Febrero de 2022	Sesión General de mayo de 2022
Capítulo 2.3.0. Información general (enfermedades de los peces)	Actualización de la Sección 2.5. y presentación para comentario	Revisión de los comentarios	Propuesta para adopción
Capítulo 2.3.4. Infección por el virus de la anemia infecciosa del salmón con supresión de HPR o HPR0	Revisión de los comentarios (1.ª ronda) y presentación para comentario	Revisión de los comentarios (2.ª ronda)	Propuesta para adopción
Capítulo 2.3.6. Infección por el herpesvirus de la carpa Koi	Revisión de los comentarios (1ª ronda) y presentación para comentario	Revisión de los comentarios (2.ª ronda)	Propuesta para adopción
Secciones 2.2.1., 2.2.2. del Capítulo 2.4.1. Infección por el herpesvirus del abulón	Revisión del informe del grupo <i>ad hoc</i> y presentación de los artículos revisados para comentario	Revisión de los comentarios (1.ª ronda)	Propuesta para adopción
Secciones 2.2.1., 2.2.2. del Capítulo 2.4.2. Infección por <i>Bonamia exitiosa</i>	Revisión de los comentarios (1ª ronda) y presentación para comentario	Revisión de los comentarios (2.ª ronda)	Propuesta para adopción

Trabajo en curso para adopción en 2023 o posterior

Código Acuático			
Capítulo/Tema	Situación		
	Septiembre de 2021	Febrero de 2022	Septiembre de 2022
Seguimiento de las enfermedades emergentes y consideración de acciones requeridas	En curso		
Capítulo 4.X. Nuevo proyecto de capítulo sobre preparación de emergencia frente a las enfermedades	Solicitud para que se convoque un grupo <i>ad hoc</i>	Examen del informe del grupo <i>ad hoc</i>	Revisión por la Comisión del proyecto de capítulo 4.X. propuesto
Capítulo 4.Y. Nuevo proyecto de capítulo sobre gestión de los brotes de enfermedad	Se convocará un grupo <i>ad hoc</i>	El grupo <i>ad hoc</i> empezará la redacción tras la finalización del Capítulo 4.X.	Revisión del proyecto de capítulo redactado por el grupo <i>ad hoc</i>
Mercancías seguras – Anfibios Artículos 8.X.3.		Revisión de los artículos enmendados y presentación para comentario	Revisión de los comentarios (1.ª ronda)
Artículo 9.3.1. del Capítulo 9.3. Infección por <i>Hepatobacter penaei</i> (hepatopancreatitis necrotizante)		Revisión de los artículos enmendados y presentación para comentario	Revisión de los comentarios (1.ª ronda)
Especies susceptibles – Artículos 9.4.1. y 9.4.2. – Infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa		Revisión de los artículos enmendados y presentación para comentario	Revisión de los comentarios (1.ª ronda)

Especies susceptibles – Enfermedades de los peces – Artículos 10.X.1. y 10.X.2. para: – Infección por el iridovirus de la dorada japonesa / virus de la necrosis infecciosa del bazo y del riñón – Infección por <i>Aphanomyces invadans</i> (síndrome ulcerativo epizoótico)		Convocación de un grupo <i>ad hoc</i> Evaluación de Infección por el iridovirus de la dorada japonesa / virus de la necrosis infecciosa del bazo y del riñón en abril de 2022	Revisión de los comentarios del grupo <i>ad hoc</i>
Especies susceptibles Evaluación de nuevas especies para enfermedades evaluadas previamente según se necesite	Cuando sea necesario		
Capítulo 10.X. Infección por el virus de la tilapia del lago (dependiendo de la adopción)			Revisión del proyecto de capítulo y presentación para comentario
Especies susceptibles – Enfermedades de los moluscos – Artículos 11.X.1. y 11.X.2. para: – Infección por <i>Marteilia refringens</i> – Infección por <i>Xenohaliotis californiensis</i> – Infección por <i>Perkinsus marinus</i> – Infección por <i>Perkinsus olseni</i>	Solicitud para que un grupo <i>ad hoc</i> prosiga las evaluaciones	Próxima reunión del grupo <i>ad hoc</i> en junio de 2022	Revisión de los comentarios del grupo <i>ad hoc</i>
Mercancías seguras – Enfermedades de los moluscos – Artículos 11.X.3.		Revisión de los artículos enmendados y presentación para comentario	Revisión de los comentarios (1.ª ronda)
Manual Acuático			
Capítulo/Tema	Situación		
	Septiembre de 2021	Febrero de 2022	Septiembre de 2022
Uso de los métodos de ADN ambiental para la vigilancia de las enfermedades de los animales acuáticos	Revisión de los comentarios (1.ª ronda)	Revisión de los comentarios de los Miembros y publicación en el sitio web de la OIE	
Métodos de diagnóstico recomendados por la OIE y su nivel de validación de la Tabla 4.1.	Revisión de los comentarios y envío para consideración de los laboratorios de referencia	Revisión de las observaciones de los laboratorios de referencia	
Sección 2.2. Disposiciones generales – Crustáceos			Revisión del capítulo enmendado y presentación para comentario
Capítulo 2.2.1. Enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda		Actualización, reformateado y presentación para comentario	Revisión de los comentarios (1.ª ronda)
Capítulo 2.2.2. Infección por <i>Aphanomyces astaci</i> (plaga del cangrejo de río)		Actualización y reformateado	Revisión proyecto de capítulo actualizado y presentación para comentario
Capítulo 2.2.3. Infección por <i>Hepatobacter penaei</i> (hepatopancreatitis necrotizante)		Actualización, reformateado y presentación para comentario	Revisión de los comentarios (1.ª ronda)
Capítulo 2.2.4. Infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa		Actualización, reformateado y presentación para comentario	Revisión de los comentarios (1.ª ronda)

Capítulo 2.2.6. Infección por el nodavirus <i>Macrobrachium rosenbergii</i> (enfermedad de la cola blanca)		Actualización y reformateado	Revisión proyecto de capítulo actualizado y presentación para comentario
Capítulo 2.2.X. Infección por el virus iridiscente de los decápodos tipo 1			Elaboración de un proyecto de capítulo para revisión
Capítulo 2.3.2. Infección por el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa	Actualización, reformateado y presentación para comentario	Revisión de los comentarios (1.ª ronda)	Revisión de los comentarios (2.ª ronda)
Capítulo 2.3.1. Infección por <i>Aphanomyces invadans</i> (síndrome ulcerativo epizootico)	Actualización y reformateado	Revisión adicional del proyecto de capítulo actualizado y presentación para comentario	Revisión de los comentarios (1.ª ronda)
Capítulo 2.3.7. Enfermedad por el iridovirus de la dorada japonesa	Actualización, reformateado y presentación para comentario	Revisión de los comentarios (1.ª ronda)	Revisión de los comentarios (2.ª ronda)
Capítulo 2.3.X. Infección por el virus de la tilapia del lago (en espera de adopción)			Elaboración de un proyecto de capítulo para revisión

Ítems recientemente priorizados para comenzar antes de mayo de 2024

Código Acuático			
Capítulo/Tema	Situación	1.ª prioridad	2.ª prioridad
Evaluación de las mercancías seguras (para todas las enfermedades de la lista)	Revisión de toda nueva evidencia científica para actualizar las normas si es necesario	✓	
Capítulo 1.3. Enfermedades de la lista de la OIE	Revisión de toda nueva enfermedad para inclusión o retiro de la lista, según sea necesario	En curso	
Capítulo 4.2. Zonificación y compartimentación	Reelaboración del capítulo para centrarse únicamente en la zonificación		✓
Capítulo 4.3. Aplicación de la compartimentación	Reelaboración del capítulo para mejorar las orientaciones y armonizarlo con el Capítulo 4.1 sobre bioseguridad	✓	
Sección 5. Nuevo capítulo sobre animales acuáticos ornamentales	Desarrollo de una nueva norma para facilitar el comercio seguro de animales acuáticos ornamentales	✓	
Sección 5. Nuevo capítulo sobre material genético	Desarrollo de una nueva norma para facilitar el comercio seguro de material genético	✓	
Artículos 9.X.1. y 9.X.2. Actualización de las listas de especies susceptibles	Enfermedades de los crustáceos pendientes para revisión:		Dependiendo de la finalización del trabajo de actualización de las evaluaciones

	<p>–Infección por <i>Aphanomyces astaci</i> (plaga del cangrejo de río)</p> <p>–Infección por el virus del síndrome de las manchas blancas</p>		de especies susceptibles para todas las enfermedades peces y moluscos de la lista
Manual Acuático			
Capítulo/Tema	Situación	1.era prioridad	2.a prioridad
Capítulos 2.2.X. Capítulos específicos de enfermedad – Crustáceos	Actualización y reformateado de los capítulos utilizando el nuevo modelo (Infección por el virus de la mionecrosis infecciosa, síndrome de Taura, virus del síndrome de las manchas blancas, virus de la cabeza amarilla)	✓	
Sección 2.4. Disposiciones generales – Moluscos	Revisión y actualización del capítulo introductorio sobre las enfermedades de los moluscos		✓
Capítulos 2.4.X. Capítulos específicos de enfermedad – Moluscos	Actualización y reformateado de los capítulos utilizando el nuevo modelo (todas las enfermedades)		✓

[Volver al orden del día](#)

**ARTÍCULO X.X.3. PARA LOS CAPÍTULOS ESPECÍFICOS
DE ENFERMEDADES DE LOS ANFIBIOS
(VERSIÓN CON SEGUIMIENTO DE CAMBIOS Y EN LIMPIO)
(VERSIÓN CON SEGUIMIENTO DE CAMBIOS)**

CAPÍTULO 8.1.

**INFECCIÓN POR *BATRACHOCHYTRIUM
DENDROBATIDIS***

[...]

Artículo 8.1.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por *B. dendrobatidis*

- 1) ~~Los siguientes productos de animales acuáticos enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *H. penaei*, las autoridades competentes no deberán exigir ningún tipo de condición relacionada con *H. penaei*. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de estos los siguientes productos de animales acuáticos, las autoridades competentes no deberán exigir ninguna medida sanitaria relacionada con *B. dendrobatidis*, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *B. dendrobatidis*: derivados de una de las especies mencionadas en el Artículo 9.3.2., cualquiera que sea el uso al que se destinan y siempre que reúnan las condiciones descritas en el Artículo 5.4.1.:~~
- 1) productos de animales acuáticos que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 60°C durante por lo menos cinco minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactiva *B. dendrobatidis*:
- a) ~~productos de anfibios termoesterilizados y sellados herméticamente (es decir, un tratamiento térmico a 121 °C durante por lo menos 3,6 minutos o una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que inactiva *B. dendrobatidis*);~~
 - b) ~~productos de anfibios cocinados que se hayan sometido a un tratamiento térmico a 100 °C durante por lo menos un minuto (o a una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que inactiva);~~
 - e) ~~productos de anfibios pasteurizados que se hayan sometido a un tratamiento térmico a 90 °C durante por lo menos diez minutos (o a una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que inactiva *B. dendrobatidis*);~~
- d)2) productos de anfibios secados por medios mecánicos que se hayan sometido a (es decir, un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos a 100 °C 60°C durante al menos 30 cinco minutos, o una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que un tiempo/temperatura equivalente que inactiva *B. dendrobatidis*);
- e)3) cueros elaborados con piel de anfibio.
- 2) ~~Cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de productos de animales acuáticos derivados de una de las especies mencionadas en el Artículo 8.1.2., que no sean unos de los enumerados en el apartado 1 del Artículo 8.1.3., las autoridades competentes deberán exigir las condiciones prescritas en los Artículos 8.1.7. a 8.1.12. que correspondan al estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *B. dendrobatidis*.~~
- 3) ~~Cuando se considere la importación o el tránsito por su territorio de productos de animales acuáticos derivados de una especie no mencionada en el Artículo 8.1.2., pero que razonablemente se podría esperar que represente un riesgo de transmisión de *B. dendrobatidis*, la autoridad competente deberá proceder a un análisis del riesgo acorde con las recomendaciones del Capítulo 2.1. La autoridad competente del país exportador deberá ser informada del resultado de este análisis.~~

[...]

(VERSIÓN EN LIMPIO)

CAPÍTULO 8.1.

INFECCIÓN POR *BATRACHOCHYTRIUM* *DENDROBATIDIS*

[...]

Artículo 8.1.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por *B. dendrobatidis*

Los *productos de animales acuáticos* enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de estos *productos de animales acuáticos*, las *autoridades competentes* no deberán exigir ninguna *medida sanitaria* relacionada con *B. dendrobatidis*, independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por *B. dendrobatidis*:

- 1) *productos de animales acuáticos* que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 60°C durante por lo menos cinco minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive *B. dendrobatidis*;
- 2) productos de anfibios secados por medios mecánicos que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 60°C durante al menos cinco minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive *B. dendrobatidis*;
- 3) cueros elaborados con piel de anfibio.

[...]

(VERSIÓN CON SEGUIMIENTO DE CAMBIOS)

CAPÍTULO 8.2.

INFECCIÓN POR *BATRACHOCHYTRIUM*
SALAMANDRIVORANS

[...]

Artículo 8.2.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por *B. salamandrivorans*

- 1) ~~Los siguientes productos de animales acuáticos enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *H. penaei*, las autoridades competentes no deberán exigir ningún tipo de condición relacionada con *H. penaei*.~~ Cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de estos los siguientes productos de animales acuáticos, las autoridades competentes no deberán exigir ninguna medida sanitaria relacionada con *B. salamandrivorans*, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *B. salamandrivorans*; derivadas de una de las especies mencionadas en el Artículo 9.3.2., cualquiera que sea el uso al que se destinan y siempre que reúnan las condiciones descritas en el Artículo 5.4.1.:
- 1) ~~productos de animales acuáticos que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 60°C durante por lo menos cinco minutos, o a un tiempo/temperatura equivalente que inactiva *B. salamandrivorans*;~~
 - a) ~~productos de anfibios termoesterilizados y sellados herméticamente (es decir, un tratamiento térmico a 121 °C durante por lo menos 3,6 minutos o una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que inactiva *B. salamandrivorans*);~~
 - b) ~~productos de anfibios cocinados que se hayan sometido a un tratamiento térmico a 100 °C durante por lo menos un minuto (o a una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que inactiva *B. salamandrivorans*);~~
 - c) ~~productos de anfibios pasteurizados que se hayan sometido a un tratamiento térmico a 90 °C durante por lo menos diez minutos (o a una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que inactiva *B. salamandrivorans*);~~
 - d)2) ~~productos de anfibios secados por medios mecánicos que se hayan sometido a (es decir, un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos a 100 °C 60°C durante al menos 30 cinco minutos, o una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que un tiempo/temperatura equivalente que inactiva *B. salamandrivorans*);~~
 - e)3) ~~cueros elaborados con piel de anfibio.~~
- 2) ~~Cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de productos de animales acuáticos derivados de una de las especies mencionadas en el Artículo 8.2.2. que no sean unos de los enumerados en el apartado 1 del Artículo 8.2.3., las autoridades competentes deberán exigir las condiciones prescritas en los Artículos 8.2.7. a 8.2.12. que correspondan al estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *B. salamandrivorans*.~~
- 3) ~~Cuando se considere la importación o el tránsito por su territorio de productos de animales acuáticos derivados de una especie no mencionada en el Artículo 8.2.2., pero que razonablemente se podría esperar que represente un riesgo de transmisión de *B. salamandrivorans*, la autoridad competente deberá proceder a un análisis del riesgo acorde con las recomendaciones del Capítulo 2.1. La autoridad competente del país exportador deberá ser informada del resultado de este análisis.~~

[...]

(VERSIÓN EN LIMPIO)

CAPÍTULO 8.2.

**INFECCIÓN POR *BATRACHOCHYTRIUM*
*SALAMANDRIVORANS***

[...]

Artículo 8.2.3.

Mesures pour l'importation, ou le transit par le territoire, de produits issus d'animaux aquatiques indépendamment de l'usage auquel ils sont destinés et du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *B. salamandrivorans*

Los *productos de animales acuáticos* enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de estos *productos de animales acuáticos*, las *autoridades competentes* no deberán exigir ninguna *medida sanitaria* relacionada con *B. salamandrivorans*, independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por *B. salamandrivorans*:

- 1) *productos de animales acuáticos* que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 60°C durante por lo menos cinco minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive *B. salamandrivorans*;
- 2) productos de anfibios secados por medios mecánicos que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 60°C durante al menos cinco minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactiva *B. salamandrivorans*;
- 3) cueros elaborados con piel de anfibio.

[...]

(VERSIÓN CON SEGUIMIENTO DE CAMBIOS)

CAPÍTULO 8.3.

INFECCIÓN POR LAS ESPECIES DE RANAVIRUS

[...]

Artículo 8.3.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por las especies de *Ranavirus*

~~1) Los siguientes productos de animales acuáticos enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *H. penaei*, las autoridades competentes no deberán exigir ningún tipo de condición relacionada con *H. penaei*. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de estos los siguientes productos de animales acuáticos, las autoridades competentes no deberán exigir ninguna medida sanitaria relacionada con las especies de *Ranavirus*, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por las especies de *Ranavirus*: derivados de una de las especies mencionadas en el Artículo 8.3.2., cualquiera que sea el uso al que se destinan y siempre que reúnan las condiciones descritas en el Artículo 5.4.1.:~~

~~1) productos de animales acuáticos que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 65°C durante por lo menos 30 minutos, o a un tiempo/temperatura equivalente que inactiva todas las especies de *Ranavirus*.~~

~~a) productos de anfibios termoesterilizados y sellados herméticamente (es decir, un tratamiento térmico a 121 °C durante por lo menos 3,6 minutos o una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que inactiva todas las especies de *Ranavirus*);~~

~~b) productos de anfibios cocinados que se hayan sometido a un tratamiento térmico de 65 °C durante por lo menos 30 minutos (o a una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que inactiva todas las especies de *Ranavirus*);~~

~~c) productos de anfibios pasteurizados que se hayan sometido a un tratamiento térmico de 90 °C durante por lo menos diez minutos (o a una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que inactiva todas las especies de *Ranavirus*);~~

~~d)2) productos de anfibios secados por medios mecánicos que se hayan sometido a (es decir, un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos a 100 °C 65°C durante al menos 30 minutos, o una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que un tiempo/temperatura equivalente que inactiva todas las especies de *Ranavirus*);~~

~~2) Cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de productos de animales acuáticos derivados de una de las especies mencionadas en el Artículo 8.3.2. que no sean unos de los enumerados en el apartado 1 del Artículo 8.3.3., las autoridades competentes deberán exigir las condiciones prescritas en los Artículos 8.3.7. a 8.3.12. que correspondan al estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por las especies de *Ranavirus*.~~

~~3) Cuando se considere la importación o el tránsito por su territorio de productos de animales acuáticos derivados de una especie no mencionada en el Artículo 8.3.2., pero que razonablemente se podría esperar que represente un riesgo de transmisión de las especies de *Ranavirus*, la autoridad competente deberá proceder a un análisis del riesgo acorde con las recomendaciones del Capítulo 2.1. La autoridad competente del país exportador deberá ser informada del resultado de este análisis.~~

[...]

(VERSIÓN EN LIMPIO)

CAPÍTULO 8.3.

INFECCIÓN POR LAS ESPECIES DE RANAVIRUS

[...]

Artículo 8.3.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por las especies de *Ranavirus*

Los *productos de animales acuáticos* enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de estos *productos de animales acuáticos*, las *autoridades competentes* no deberán exigir ninguna *medida sanitaria* relacionada con las especies de *Ranavirus*, independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por las especies de *Ranavirus*:

- 1) *productos de animales acuáticos* que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 65°C durante por lo menos 30 minutos, o a un tiempo/temperatura equivalente que inactiva todas las especies de *Ranavirus*;
- 2) *productos de anfibios secados por medios mecánicos* que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 65°C durante al menos 30 minutos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactiva todas las especies de *Ranavirus*.

[...]

[Volver al orden del día](#)

**ARTÍCULOS X.X.3. PARA LOS CAPÍTULOS ESPECÍFICOS
DE ENFERMEDADES DE LOS MOLUSCOS
(VERSIÓN CON SEGUIMIENTO DE CAMBIOS Y EN LIMPIO)
(VERSIÓN CON SEGUIMIENTO DE CAMBIOS)**

CAPÍTULO 11.1.

INFECCIÓN POR EL HERPESVIRUS DEL ABALÓN

[...]

Artículo 11.1.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por el herpesvirus del abalón

- 1) ~~Los siguientes productos de animales acuáticos enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *H. penaei*, las autoridades competentes no deberán exigir ningún tipo de condición relacionada con *H. penaei* cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de estos los siguientes productos de animales acuáticos, las autoridades competentes no deberán exigir ninguna medida sanitaria relacionada con el herpesvirus del abalón, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por el herpesvirus del abalón; derivados de una de las especies mencionadas en el Artículo 11.1.2., cualquiera que sea el uso al que se destinan y siempre que reúnan las condiciones descritas en el Artículo 5.4.1.:~~
- 1) ~~productos de animales acuáticos que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 121°C durante por lo menos 3 minutos y 36 segundos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactíve el herpesvirus del abalón;~~
 - a) ~~productos de abalón termoesterilizados y sellados herméticamente (es decir, un tratamiento térmico a 121 °C durante al menos 3,6 minutos o una combinación equivalente de tiempo/temperatura);~~
 - b2) ~~productos de abalón secados por medios mecánicos (es decir, que se hayan sometido a un tratamiento térmico a 100 °C durante al menos 30 minutos suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 121°C durante por lo menos 3 minutos y 36 segundos, o a una combinación equivalente de un tiempo/temperatura que haya demostrado que equivalente que inactiva el herpesvirus del abalón.~~
 - 2) ~~Las autoridades competentes deberán exigir las condiciones prescritas en los Artículos 11.1.7. a 11.1.11. que correspondan al estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por el herpesvirus del abalón cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de cualesquiera animales acuáticos y productos de animales acuáticos relacionados con las especies mencionadas en el Artículo 11.1.2. que no sean unos de los enumerados en el apartado 1 del Artículo 11.1.3.~~
 - 3) ~~La autoridad competente deberá proceder a un análisis del riesgo acorde con las recomendaciones del Capítulo 2.1. cuando contemple la importación o el tránsito por su territorio de animales acuáticos y productos de animales acuáticos de cualquier especie no mencionada en el Artículo 11.1.2. pero que se considere que podría plantear un riesgo de propagación de la infección por el herpesvirus del abalón. La autoridad competente del país exportador deberá ser informada del resultado de la evaluación.~~

[...]

(VERSIÓN EN LIMPIO)

CAPÍTULO 11.1.

INFECCIÓN POR EL HERPESVIRUS DEL ABALÓN

[...]

Artículo 11.1.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por el herpesvirus del abalón

Los *productos de animales acuáticos* enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de estos *productos de animales acuáticos*, las *autoridades competentes* no deberán exigir ninguna *medida sanitaria* relacionada con el herpesvirus del abalón, independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por el herpesvirus del abalón:

- 1) *productos de animales acuáticos* que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 121°C durante por lo menos 3 minutos y 36 segundos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive el herpesvirus del abalón;
- 2) *productos de abalón secados por medios mecánicos* que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 121°C durante por lo menos 3 minutos y 36 segundos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive el herpesvirus del abalón.

[...]

(VERSIÓN CON SEGUIMIENTO DE CAMBIOS)

CAPÍTULO 11.2.

INFECCIÓN POR *BONAMIA EXITIOSA*

[...]

Artículo 11.2.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por *B. exitiosa*

- ~~1) Los siguientes productos de animales acuáticos enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *H. penaei*, las autoridades competentes no deberán exigir ningún tipo de condición relacionada con *H. penaei* cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de estos los siguientes productos de animales acuáticos, las autoridades competentes no deberán exigir ninguna medida sanitaria relacionada con *B. exitiosa*, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *B. exitiosa*; derivados de una de las especies mencionadas en el Artículo 11.2.2., cualquiera que sea el uso al que se destinan y siempre que reúnan las condiciones descritas en el Artículo 5.4.1.:~~
- ~~a)1) carne de ostra congelada, y~~
 - ~~b)2) ostras congeladas con media concha.~~
- 2) ~~Las autoridades competentes deberán exigir las condiciones prescritas en los Artículos 11.2.7. a 11.2.11. que correspondan al estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *B. exitiosa* cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de cualesquiera animales acuáticos y productos de animales acuáticos relacionados con las especies mencionadas en el Artículo 11.2.2. que no sean unos de los enumerados en el apartado 1 del Artículo 11.2.3.~~
- 3) ~~La autoridad competente deberá proceder a un análisis del riesgo acorde con las recomendaciones del Capítulo 2.1. cuando contemple la importación o el tránsito por su territorio de animales acuáticos y productos de animales acuáticos de cualquier especie no mencionada en el Artículo 11.2.2. pero que se considere que podría plantear un riesgo de propagación de la infección por *B. exitiosa*. La autoridad competente del país exportador deberá ser informada del resultado de la evaluación.~~

[...]

(VERSIÓN EN LIMPIO)

CAPÍTULO 11.2.

INFECCIÓN POR *BONAMIA EXITIOSA*

[...]

Artículo 11.2.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por *B. exitiosa*

Los *productos de animales acuáticos* enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de estos *productos de animales acuáticos*, las *autoridades competentes* no deberán exigir ninguna *medida sanitaria* relacionada con *B. exitiosa*, independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por *B. exitiosa*:

- 1) carne de ostra congelada, y
- 2) ostras congeladas con media concha.

[...]

(VERSIÓN CON SEGUIMIENTO DE CAMBIOS)

CAPÍTULO 11.3.

INFECCIÓN POR *BONAMIA OSTREAE*

[...]

Artículo 11.3.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por *B. ostreae*

- ~~1) Los siguientes productos de animales acuáticos enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *H. penaei*, las autoridades competentes no deberán exigir ningún tipo de condición relacionada con *H. penaei* cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de estos los siguientes productos de animales acuáticos, las autoridades competentes no deberán exigir ninguna medida sanitaria relacionada con *B. ostreae*, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *B. ostreae*; derivados de una de las especies mencionadas en el Artículo 11.3.2., cualquiera que sea el uso al que se destinan y siempre que reúnan las condiciones descritas en el Artículo 5.4.1.:~~
- ~~a)1) carne de ostra congelada, y~~
 - ~~b)2) ostras congeladas con media concha.~~
- 2) ~~Las autoridades competentes deberán exigir las condiciones prescritas en los Artículos 11.2.7. a 11.2.11. que correspondan al estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *B. exitiosa* cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de cualesquiera animales acuáticos y productos de animales acuáticos relacionados con las especies mencionadas en el Artículo 11.2.2. que no sean unos de los enumerados en el apartado 1 del Artículo 11.2.3.~~
- 3) ~~La autoridad competente deberá proceder a un análisis del riesgo acorde con las recomendaciones del Capítulo 2.1. cuando contemple la importación o el tránsito por su territorio de animales acuáticos y productos de animales acuáticos de cualquier especie no mencionada en el Artículo 11.2.2. pero que se considere que podría plantear un riesgo de propagación de la infección por *B. exitiosa*. La autoridad competente del país exportador deberá ser informada del resultado de la evaluación.~~

[...]

(VERSIÓN EN LIMPIO)

CAPÍTULO 11.3.

INFECCIÓN POR *BONAMIA OSTREAE*

[...]

Artículo 11.3.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por *B. ostreae*

Los *productos de animales acuáticos* enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de estos *productos de animales acuáticos*, las *autoridades competentes* no deberán exigir ninguna *medida sanitaria* relacionada con *B. ostreae*, independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por *B. ostreae*:

- 1) carne de ostra congelada, y
- 2) ostras congeladas con media concha.

[...]

(VERSIÓN CON SEGUIMIENTO DE CAMBIOS)

CAPÍTULO 11.4.

INFECCIÓN POR MARTEILIA REFRINGENS

[...]

Artículo 11.4.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por *M. refringens*

- ~~1) Los siguientes productos de animales acuáticos enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *H. penaei*, las autoridades competentes no deberán exigir ningún tipo de condición relacionada con *H. penaei* cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de estos los siguientes productos de animales acuáticos, las autoridades competentes no deberán exigir ninguna medida sanitaria relacionada con *M. refringens*, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *M. refringens*: derivados de una de las especies mencionadas en el Artículo 11.4.2., cualquiera que sea el uso al que se destinan y siempre que reúnan las condiciones descritas en el Artículo 5.4.1.:~~
 - 1) productos de animales acuáticos que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 121°C durante por lo menos 3 minutos y 36 segundos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive *M. refringens*.
- ~~2) Las autoridades competentes deberán exigir las condiciones prescritas en los Artículos 11.4.7. a 11.4.11. que correspondan al estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *M. refringens* cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de cualesquiera animales acuáticos y productos de animales acuáticos relacionados con las especies mencionadas en el Artículo 11.4.2. que no sean unos de los enumerados en el apartado 1 del Artículo 11.4.3.~~
- ~~3) La autoridad competente deberá proceder a un análisis del riesgo acorde con las recomendaciones del Capítulo 2.1. cuando contemple la importación o el tránsito por su territorio de animales acuáticos y productos de animales acuáticos de cualquier especie no mencionada en el Artículo 11.4.2. pero que se considere que podría plantear un riesgo de propagación de la infección por *M. refringens*. La autoridad competente del país exportador deberá ser informada del resultado de la evaluación.~~

[...]

(VERSIÓN EN LIMPIO)

CAPÍTULO 11.4.

INFECCIÓN POR *MARTEILIA REFRINGENS*

[...]

Artículo 11.4.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por *M. refringens*

Los *productos de animales acuáticos* enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de estos *productos de animales acuáticos*, las *autoridades competentes* no deberán exigir ninguna *medida sanitaria* relacionada con *M. refringens*, independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por *M. refringens*:

- 1) *productos de animales acuáticos* que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 121°C durante por lo menos 3 minutos y 36 segundos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive *M. refringens*.

[...]

(VERSIÓN CON SEGUIMIENTO DE CAMBIOS)

CAPÍTULO 11.5.

INFECCIÓN POR *PERKINSUS MARINUS*

[...]

Artículo 11.5.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por *P. marinus*

1) Los siguientes productos de animales acuáticos enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *H. penaei*, las autoridades competentes no deberán exigir ningún tipo de condición relacionada con *H. penaei*. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de estos los siguientes productos de animales acuáticos, las autoridades competentes no deberán exigir ninguna medida sanitaria relacionada con *P. marinus*, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *P. marinus*: derivados de una de las especies mencionadas en el Artículo 11.5.2., cualquiera que sea el uso al que se destinan y siempre que reúnan las condiciones descritas en el Artículo 5.4.1.:

1) productos de animales acuáticos que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 121°C durante por lo menos 3 minutos y 36 segundos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive *P. marinus*.

2) Las autoridades competentes deberán exigir las condiciones prescritas en los Artículos 11.5.7. a 11.5.11. que correspondan al estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *P. marinus* cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de cualesquiera animales acuáticos y productos de animales acuáticos relacionados con las especies mencionadas en el Artículo 11.5.2. que no sean unos de los enumerados en el apartado 1 del Artículo 11.5.3.

3) La autoridad competente deberá proceder a un análisis del riesgo acorde con las recomendaciones del Capítulo 2.1. cuando contemple la importación o el tránsito por su territorio de animales acuáticos y productos de animales acuáticos de cualquier especie no mencionada en el Artículo 11.5.2. pero que se considere que podría plantear un riesgo de propagación de la infección por *P. marinus*. La autoridad competente del país exportador deberá ser informada del resultado de la evaluación.

[...]

(VERSIÓN EN LIMPIO)

CAPÍTULO 11.5.

INFECCIÓN POR *PERKINSUS MARINUS*

[...]

Artículo 11.5.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por *P. marinus*

Los *productos de animales acuáticos* enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de estos *productos de animales acuáticos*, las *autoridades competentes* no deberán exigir ninguna *medida sanitaria* relacionada con *P. marinus*, independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por *P. marinus*:

- 1) *productos de animales acuáticos* que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 121°C durante por lo menos 3 minutos y 36 segundos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive *P. marinus*.

[...]

(VERSIÓN CON SEGUIMIENTO DE CAMBIOS)

CAPÍTULO 11.6.

INFECCIÓN POR *PERKINSUS OLSENI*

[...]

Artículo 11.6.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por *P. olseni*

- ~~1) Los siguientes productos de animales acuáticos enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *H. penaei*, las autoridades competentes no deberán exigir ningún tipo de condición relacionada con *H. penaei*. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de estos los siguientes productos de animales acuáticos, las autoridades competentes no deberán exigir ninguna medida sanitaria relacionada con *P. olseni*, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *P. olseni*; derivados de una de las especies mencionadas en el Artículo 11.6.2., cualquiera que sea el uso al que se destinan y siempre que reúnan las condiciones descritas en el Artículo 5.4.1.:~~
- ~~1) productos de animales acuáticos que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 121°C durante por lo menos 3 minutos y 36 segundos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive *P. olseni*.~~
 - ~~2) Las autoridades competentes deberán exigir las condiciones prescritas en los Artículos 11.6.7. a 11.6.11. que correspondan al estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *P. olseni* cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de cualesquiera animales acuáticos y productos de animales acuáticos relacionados con las especies mencionadas en el Artículo 11.6.2. que no sean unos de los enumerados en el apartado 1 del Artículo 11.6.3.~~
 - ~~3) La autoridad competente deberá proceder a un análisis del riesgo acorde con las recomendaciones del Capítulo 2.1. cuando contemple la importación o el tránsito por su territorio de animales acuáticos y productos de animales acuáticos de cualquier especie no mencionada en el Artículo 11.6.2. pero que se considere que podría plantear un riesgo de propagación de la infección por *P. olseni*. La autoridad competente del país exportador deberá ser informada del resultado de la evaluación.~~

[...]

(VERSIÓN EN LIMPIO)

CAPÍTULO 11.6.

INFECCIÓN POR *PERKINSUS OLSENI*

[...]

Artículo 11.6.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por *P. olseni*

Los *productos de animales acuáticos* enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de estos *productos de animales acuáticos*, las *autoridades competentes* no deberán exigir ninguna *medida sanitaria* relacionada con *P. olseni*, independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por *P. olseni*:

- 1) *productos de animales acuáticos* que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 121°C durante por lo menos 3 minutos y 36 segundos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive *P. olseni*.

[...]

(VERSIÓN CON SEGUIMIENTO DE CAMBIOS)

CAPÍTULO 11.7.

INFECCIÓN POR *XENOHALLOTIS CALIFORNIENSIS*

[...]

Artículo 11.7.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por *X. californiensis*

- ~~1) Los siguientes productos de animales acuáticos enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *H. penaei*, las autoridades competentes no deberán exigir ningún tipo de condición relacionada con *H. penaei* cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de estos los siguientes productos de animales acuáticos. las autoridades competentes no deberán exigir ninguna medida sanitaria relacionada con *X. californiensis*, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *X. californiensis*; derivados de una de las especies mencionadas en el Artículo 11.7.2., cualquiera que sea el uso al que se destinan y siempre que reúnan las condiciones descritas en el Artículo 5.4.1.:~~
- ~~1) productos de animales acuáticos que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 121°C durante por lo menos 3 minutos y 36 segundos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive *X. californiensis*.~~
 - 2) Las autoridades competentes deberán exigir las condiciones prescritas en los Artículos 11.7.7. a 11.7.11. que correspondan al estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *X. californiensis* cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de cualesquiera animales acuáticos y productos de animales acuáticos relacionados con las especies mencionadas en el Artículo 11.7.2. que no sean unos de los enumerados en el apartado 1 del Artículo 11.7.3.
 - 3) La autoridad competente deberá proceder a un análisis del riesgo acorde con las recomendaciones del Capítulo 2.1. cuando contemple la importación o el tránsito por su territorio de animales acuáticos y productos de animales acuáticos de cualquier especie no mencionada en el Artículo 11.7.2. pero que se considere que podría plantear un riesgo de propagación de la infección por *X. californiensis*. La autoridad competente del país exportador deberá ser informada del resultado de la evaluación.

[...]

(VERSIÓN EN LIMPIO)

CAPÍTULO 11.7.

INFECCION À *XENOHALLOTIS CALIFORNIENSIS*

[...]

Artículo 11.7.3.

Medidas para la importación o tránsito por el territorio de productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan, independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por *X. californiensis*

Los *productos de animales acuáticos* enumerados a continuación se han evaluado y cumplen con los criterios de seguridad aplicables a este tipo de productos de acuerdo con el Artículo 5.4.1. Cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de estos *productos de animales acuáticos*, las *autoridades competentes* no deberán exigir ninguna *medida sanitaria* relacionada con *X. californiensis*, independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por *X. californiensis*:

- 1) *productos de animales acuáticos* que se hayan sometido a un tratamiento térmico suficiente como para alcanzar una temperatura interna de al menos 121°C durante por lo menos 3 minutos y 36 segundos, o un tiempo/temperatura equivalente que inactive *X. californiensis*.

[...]

[Volver al orden del día](#)

CAPÍTULO 9.3.

INFECCIÓN POR *HEPATOBACTER PENA EI* (HEPATOPANCREATITIS NECROTIZANTE)

Artículo 9.3.1.

A efectos del *Código Acuático*, la infección por *Hepatobacter penaei* (hepatopancreatitis necrotizante) es la *infección* causada por el *agente patógeno Candidatus Hepatobacter penaei*, una bacteria intracelular obligada de la orden de las proteobacterias alfa. ~~La enfermedad se conoce comúnmente como hepatopancreatitis necrotizante.~~

La información sobre los métodos de *diagnóstico* figura en el *Manual Acuático*.

[Volver al orden del día](#)

CAPÍTULO 9.4.

**INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA NECROSIS
HIPODÉRMICA Y HEMATOPOYÉTICA
INFECCIOSA**

Artículo 9.4.1.

A efectos del *Código Acuático*, la infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa es la *infección* causada por el *agente patógeno* de los decápodos *penstylhamaparvovirus 1* ~~del virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa del género *Penstylidenseovirus*~~ *Penstylhamaparvovirus* y de la familia de los Parvoviridos.

La información sobre los métodos de *diagnóstico* figura en el *Manual Acuático*.

Artículo 9.4.2.

Ámbito de aplicación

Las recomendaciones de este capítulo se aplican a las siguientes especies que cumplen con los criterios de inclusión en la lista de especies susceptibles de acuerdo con el Capítulo 1.5.: camarón azul (*Penaeus stylirostris*), camarón tigre gigante (*Penaeus monodon*), camarón blanco del Golfo (*Penaeus setiferus*), camarón patiamarillo (*Penaeus californiensis*), camarón tigre gigante (*Penaeus monodon*), camarón blanco nortño (*Penaeus setiferus*), camarón azul (*Penaeus stylirostris*) y camarón patiblanco (*Penaeus vannamei*).

[...]

[Volver al orden del día](#)

CHAPTER 2.2.1.

ACUTE HEPATOPANCREATIC NECROSIS DISEASE**1. Scope**

Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) means infection with strains of *Vibrio parahaemolyticus* (V_{AHPND}) that contain a ~70-kbp plasmid with genes that encode homologues of the *Photobacterium* insect-related (Pir) toxins, PirA and PirB. Although there are reports of the isolation of other *Vibrio* species from clinical cases of AHPND, only V_{AHPND} has been demonstrated to cause AHPND.

2. Disease information**2.1. Agent factors****2.1.1. Aetiological agent**

AHPND has a bacterial aetiology (Kondo *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013). It is caused by specific virulent strains of *V. parahaemolyticus* (V_{AHPND}) that contain a ~70-kbp plasmid with genes that encode homologues of the *Photobacterium* insect-related (Pir) binary toxin, PirA and PirB (Gomez-Gil *et al.*, 2014; Gomez-Jimenez *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2015a; Kondo *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2014). The plasmid within V_{AHPND} has been designated pVA1, and its size may vary slightly. Removal (or “curing”) of pVA1 abolishes the AHPND-causing ability of V_{AHPND} strains.

Within a population of V_{AHPND} bacteria, natural deletion of the Pir^{vp} operon may occur in a few individuals (Lee *et al.*, 2015; Tinwongger *et al.*, 2014). This deletion is due to the instability caused by the repeat sequences or transposase that flank the Pir toxin operon. When the deletion occurs, it means that a V_{AHPND} strain will lose its ability to induce AHPND. However, if the Pir toxin sequence is used as a target for detection, then a colony that has this deletion will produce a negative result even though the colony was derived from an isolate of AHPND-causing V_{AHPND} . A recent report describes a naturally occurring deletion mutant of V_{AHPND} that does not cause a clinical manifestation of AHPND (Aranguren *et al.*, 2020a).

The plasmid pVA1 also carries a cluster of genes related to conjugative transfer, which means that this plasmid is potentially able to transfer to other bacteria.

2.1.2. Survival and stability in processed or stored samples

AHPND cannot be transmitted from infected samples that have been stored frozen (Tran *et al.*, 2013). Some *Vibrio* species are sensitive to freezing (Muntada-Garriga *et al.*, 1995; Thomson & Thacker, 1973).

2.1.3. Survival and stability outside the host

V_{AHPND} is expected to possess similar properties to other strains of *V. parahaemolyticus* found in seafood that have been shown to survive up to 9 and 18 days in filtered estuarine water and filtered seawater at an ambient temperature of $28 \pm 2^\circ\text{C}$ (Karunasagar *et al.*, 1987).

For inactivation methods, see Section 2.4.5.

2.2. Host factors**2.2.1. Susceptible host species**

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to AHPND according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Code* are: giant tiger prawn (*Penaeus monodon*) and whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*).

2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility

Species for which there is incomplete evidence to fulfil the criteria for listing as susceptible to AHPND according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Code* are: fleshy prawn (*Penaeus chinensis*).

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results have been reported in the following organisms, but an active infection has not been demonstrated: kuruma prawn (*Penaeus japonicus*).

2.2.3. Likelihood of infection by species, host life stage, population or sub-populations

Mortalities occur within 30–35 days, and as early as 10 days, of stocking shrimp ponds with postlarvae (PL) or juveniles (Joshi *et al.*, 2014b; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013). De la Pena *et al.* (2015) reported disease outbreaks in the Philippines occurring as late as 46–96 days after pond-stocking.

2.2.4. Distribution of the pathogen in the host

Gut, stomach, and hepatopancreas.

2.2.5. Aquatic animal reservoirs of infection

In experimental challenges, *Macrobrachium rosenbergii* and *Cherax quadricarinatus* did not show clinical signs of the disease or histopathological changes induced by AHPND but tested positive by PCR assay. However, whether these species serve as reservoirs of infection or are resistant to AHPND needs further investigation (Powers *et al.*, 2021; Schofield *et al.*, 2020).

2.2.6. Vectors

No vector is known, although as *Vibrio* spp. are ubiquitous in the marine environment, the possibility that there are vector species could be expected.

2.3. Disease pattern

2.3.1. Mortality, morbidity and prevalence

AHPND is characterised by sudden, mass mortalities (up to 100%) usually within 30–35 days of stocking grow-out ponds with PLs or juveniles (Hong *et al.*, 2016). Older juveniles may also be affected (de la Pena *et al.*, 2015).

In regions where AHPND is enzootic in farmed shrimp, evidence indicates a near 100% prevalence (Tran *et al.*, 2014).

2.3.2. Clinical signs, including behavioural changes

The onset of clinical signs and mortality can start as early as 10 days post-stocking. Clinical signs include a pale-to-white hepatopancreas (HP), significant atrophy of the HP, soft shells, guts with discontinuous, or no contents and black spots or streaks visible within the HP (due to melanised tubules). In addition, the HP does not squash easily between the thumb and forefinger (probably due to increased fibrous connective tissue and haemocytes) (NACA, 2014).

2.3.3. Gross pathology

AHPND has three infection phases. In the acute phase, there is massive and progressive degeneration of the HP tubules from proximal to distal, with significant rounding and sloughing of the HP tubule epithelial cells into the lumen of the tubule, the HP collecting ducts and the posterior stomach and the absence of bacterial cells. In the terminal phase, the HP shows intra-tubular haemocytic inflammation and develops massive secondary bacterial infections that occur in association with the necrotic and sloughed HP tubule cells. Animals that survive an acute infection reach a chronic phase, in which they present with limited cellular changes in the hepatopancreas tubule and only a few tubules with epithelial necrosis accompanied by bacteria and inflammation. The chronic phase pathology resembles a septic hepatopancreatic necrosis (SHPN) (Aranguren *et al.*, 2020a; NACA, 2014; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013; 2014).

2.3.4. Modes of transmission and life cycle

V_{AHPND} has been transmitted experimentally by immersion, feeding (*per os*) and reverse gavage (Dabu *et al.*, 2017; Joshi *et al.*, 2014b; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013), simulating natural horizontal transmission via oral routes and co-habitation.

2.3.5. Environmental factors

Water sources with low salinity (<20 ppt) seem to reduce the incidence of the disease. Peak occurrence seems to occur during the hot, dry season from April to July. Overfeeding, poor seed quality, poor water quality, poor feed quality, algal blooms or crashes are also factors that may lead to occurrences of AHPND in endemic areas (NACA, 2014).

2.3.6. Geographical distribution

The disease was initially reported in Asia in 2010. It has since been reported in the Americas (2013) and Africa (2017).

See OIE WAHIS (<https://wahis.oeint/#/home>) for recent information on distribution at the country level.

2.4. Biosecurity and disease control strategies

2.4.1. Vaccination

Not available.

2.4.2. Chemotherapy including blocking agents

Not available.

2.4.3. Immunostimulation

None known to be effective.

2.4.4. Breeding resistant strains

Not available.

2.4.5. Inactivation methods

Experimental studies have shown that *Vp*_{AHPND} could not be transmitted via frozen infected shrimp (Tran *et al.*, 2013). Similarly, other strains of *V. parahaemolyticus* are known to be sensitive to freezing, refrigeration, heating and common disinfectants (Muntada-Garriga *et al.*, 1995; Thomson & Thacker, 1973).

2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

Not available.

2.4.7. General husbandry

As with other infectious diseases of shrimp, established good sanitary and biosecurity practices, such as improvement of hatchery sanitary conditions and PL screening are likely to be beneficial; good broodstock management, use of high-quality post-larvae and good shrimp farm management including strict feeding rate control, appropriate stocking density etc. are all well-established practices that reduce the impact of disease, including AHPND. An AHPND-tolerant line of *P. vannamei* was recently reported, but at present (2022) no genetically improved lines are commercially available (Aranguren *et al.*, 2020b).

3. Specimen selection, sample collection, transportation and handling

This section draws on information in Sections 2.2, 2.3 and 2.4 to identify populations, individuals and samples that are most likely to be infected.

3.1. Selection of populations and individual specimens

Samples of moribund shrimp or shrimp that show clinical signs (see Section 2.3.2) should be selected for AHPND diagnosis. It is assumed that adults (broodstock) can carry strains of *Vp*_{AHPND} (Lee *et al.*, 2015; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013). Therefore, broodstock without clinical signs may also be selected for diagnostic testing.

3.2. Selection of organs or tissues

Samples may be taken from gut-associated tissues and organs, such as the hepatopancreas, stomach, midgut and hindgut. In the case of valuable broodstock, non-lethal faecal samples may be collected instead, however the utility of faecal samples compared with tissue samples has not been evaluated.

3.3. Samples or tissues not suitable for pathogen detection

Samples other than gut-associated tissues and organs are not appropriate (NACA, 2014; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013).

3.4. Non-lethal sampling

Faecal matter may be collected from valuable broodstock for AHPND diagnosis. However, compared with tissue sampling, the relative utility of faecal samples for detecting AHPND-causing bacteria has not been evaluated.

3.5. Preservation of samples for submission

Samples to be submitted are (i) fresh and chilled on ice for bacterial isolation, (ii) fixed in 90% ethanol for PCR detection and (iii) preserved in Davidson's AFA fixative for histology (Joshi *et al.*, 2014a; 2014b; Lee *et al.*, 2015; Nunan *et al.*, 2014; Sirikharin *et al.*, 2015; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013).

For guidance on sample preservation methods for the intended test methods, see Chapter 2.2.0.

3.5.1. Samples for pathogen isolation

High quality samples are essential for successful pathogen isolation and bioassay. Sample quality depends mainly on the time since collection and time spent in storage. Fresh specimens should be kept on ice and preferably sent to the laboratory within 24 hours of collection. To avoid degradation of samples, use alternative storage methods only after consultation with the receiving laboratory.

3.5.2. Preservation of samples for molecular detection

Tissue samples for PCR testing should be preserved in 90% (v/v) analytical/reagent-grade (undenatured) ethanol. The recommended ratio of ethanol to tissue is 10:1 based on studies in terrestrial animals and human health. The use of lower grade (laboratory or industrial grade) ethanol is not recommended. Alternatively, samples can be preserved in DNAzol for PCR testing. If material cannot be fixed it may be frozen.

3.5.3. Samples for histopathology, immunohistochemistry or *in-situ* hybridisation

Tissue samples for histopathology, immunohistochemistry or *in-situ* hybridization can be preserved in Davidson's AFA fixative for histology (Joshi *et al.*, 2014a; 2014b; Nunan *et al.*, 2014; Sirikharin *et al.*, 2015; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013).

3.5.4. Samples for other tests

Not applicable.

3.6. Pooling of samples

Pooling of samples from more than one individual animal for a given purpose should only be recommended where robust supporting data on diagnostic sensitivity and diagnostic specificity have been evaluated and found to be suitable. The effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been thoroughly evaluated, therefore, larger specimens should be processed and tested individually. Small life stages can be pooled to obtain the minimum amount of material for bacterial isolation or molecular detection.

4. Diagnostic methods

The methods currently available for pathogen detection that can be used in i) surveillance of apparently healthy animals, ii) presumptive diagnosis in clinically affected animals and iii) confirmatory diagnostic purposes are listed in Table 4.1. by animal life stage.

Ratings for purposes of use. For each recommended assay a qualitative rating for the purpose of use is provided. The ratings are determined based on multiple performance and operational factors relevant to application of an assay for a defined purpose. These factors include appropriate diagnostic performance characteristics, level of assay validation, availability cost, timeliness, and sample throughput and operability. For a specific purpose of use, assays are rated as:

- +++ = Methods are most suitable with desirable performance and operational characteristics.
- ++ = Methods are suitable with acceptable performance and operational characteristics under most circumstances.
- + = Methods are suitable, but performance or operational characteristics may limit application under some circumstances.
- Shaded boxes = Not appropriate for this purpose.

Validation stage. The validation stage corresponds to the assay development and validation pathway in chapter 1.1.2. The validation stage is specific to each purpose of use. Where available, information on the diagnostic performance of recommended assays is provided in Section 6.3.

OIE Reference Laboratories welcome feedback on diagnostic performance of recommended assays, in particular PCR methods. Of particular interest are any factors affecting expected assay sensitivity (e.g. tissue components inhibiting amplification) or expected specificity (e.g. failure to detect particular genotypes, detection of homologous sequences within the host genome). These issues should be communicated to the OIE Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

Table 4.1. OIE recommended diagnostic methods and their level of validation for surveillance of apparently healthy animals and investigation of clinically affected animals

Method	1. Surveillance of apparently healthy animals				2. Presumptive diagnosis of clinically affected animals				3. Confirmatory diagnosis ¹ of a suspect result from surveillance or presumptive diagnosis			
	Early life stages ²	Juveniles ²	Adults	LV	Early life stages ²	Juveniles ²	Adults	LV	Early life stages ²	Juveniles ²	Adults	LV
Wet mounts												
Histopathology		+	+	NA		+	+	NA				
Cell culture												
Real-time PCR	++	++	++	1	++	++	++	1				
Conventional PCR	++	++	++	2	++	++	++	2	++	++	++	2
Amplicon sequencing									+++	+++	+++	1
<i>In-situ</i> hybridisation												
Bioassay					+	+	+	NA	+	+	+	NA
LAMP												
Ab-ELISA												
Ag-ELISA												
Other antigen detection methods ³												
Other methods ³												

LV = level of validation, refers to the stage of validation in the OIE Pathway (chapter 1.1.2); PCR = polymerase chain reaction; LAMP = loop-mediated isothermal amplification; Ab- or Ag-ELISA = antibody or antigen enzyme-linked immunosorbent assay, respectively; NA = Not available.

¹For confirmatory diagnoses, methods need to be carried out in combination (see Section 6). ²Susceptibility of early and juvenile life stages is described in Section 2.2.3.

³Specify the test used. Shading indicates the test is inappropriate or should not be used for this purpose.

4.1. Wet mounts

Not applicable.

4.2. Histopathology and cytopathology

The disease has three distinct phases:

- i) The acute phase is characterised by a massive and progressive degeneration of the HP tubules from proximal to distal, with significant rounding and sloughing of HP tubule epithelial cells into the HP tubules, HP collecting ducts and posterior stomach in the absence of bacterial cells (Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013; 2014).
- ii) The terminal phase is characterised by marked intra-tubular haemocytic inflammation and development of massive secondary bacterial infections that occur in association with the necrotic and sloughed HP tubule cells (NACA, 2012; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013; 2014).
- iii) The chronic phase is characterised by only a few tubules with epithelial necrosis accompanied by bacteria and inflammation. This phase resembles a septic hepatopancreatic necrosis (SHPN) (Aranguren *et al.*, 2020b).

4.3. Cell culture for isolation

4.3.1. Enrichment of samples prior to DNA extraction

Preliminary enrichment culture for detection of *Vp_{AHPND}* from sub-clinical infections or environmental samples may be carried out using any suitable bacteriological medium (e.g. tryptic–soy broth or alkaline peptone water containing 2.5% NaCl supplement) incubated for 4 hours at 30°C with shaking. Then, after letting any debris settle, the bacteria in the culture broth are pelleted by centrifugation. Discarding the supernatant, DNA can be extracted from the bacterial pellet in preparation for PCR analysis.

4.3.2. Agent purification

Vp_{AHPND} may be isolated in pure culture from diseased shrimp, sub-clinically infected shrimp, or environmental samples using standard microbiological media for isolation of *Vibrio* species from such sources (Lightner, 1996; Tran *et al.*, 2013). Confirmation of identification of *Vp_{AHPND}* may be undertaken by PCR analysis.

4.4. Nucleic acid amplification

PCR methods have been developed that target the *Vp_{AHPND}* toxin genes. The AP3 method is a single-step PCR that targets the 12.7 kDa PirA^{VP} gene (Sirikharin *et al.*, 2015). It was validated for 100% positive and negative predictive value by testing 104 isolates of *Vp_{AHPND}* and non-pathogenic bacteria (including other *Vibrio* and non-*Vibrio* species) that had previously been tested by bioassay (Sirikharin *et al.*, 2015). Subsequently, Soto-Rodriguez *et al.* (2015), using 9 *Vp_{AHPND}* and 11 non-pathogenic isolates of *V. parahaemolyticus* reported that the AP3 method produced the highest positive (90%) and negative (100%) predictive values of five PCR methods tested.

Single-step PCRs such as the AP3 method and others, e.g. VpPirA-284, VpPirB-392 (Han *et al.*, 2015a) and TUMSAT-Vp3 (Tinwongger *et al.*, 2014), have relatively low sensitivity when used for detection of *Vp_{AHPND}* at low levels (e.g. sub-clinical infections) or in environmental samples such as sediments and biofilms. For such samples, a preliminary enrichment step (see Section 4.3.1. *Enrichment of samples prior to DNA extraction*) is recommended.

Alternatively, a nested PCR method, AP4, has been developed with a 100% positive predictive value for *Vp_{AHPND}* using the same 104 bacterial isolates used to validate AP3 above (Dangtip *et al.*, 2015), and has greater sensitivity (1 fg of DNA extracted from *Vp_{AHPND}*), allowing it to be used directly with tissue and environmental samples without an enrichment step.

In addition, real-time PCR methods, for example the *Vp_{AHPND}*-specific TaqMan real-time PCR developed by Han *et al.* (2015b), and an isothermal loop-mediated amplification protocol (LAMP) method developed by Koiwai *et al.* (2016) also have high sensitivity and can be used directly with tissue and environmental samples without an enrichment step.

A general DNA extraction method may be used to extract DNA from the stomach or hepatopancreatic tissue of putatively infected shrimp, from cultures of purified bacterial isolates or from bacterial pellets from enrichment cultures (see Section 4.3). The amount of template DNA in a 25 µl PCR reaction volume should be in the range of 0.01–1 ng of DNA when extracted from bacterial isolates (i.e. directly from a purified culture) and in the range of 10–100 ng of total DNA when extracted from shrimp tissues or from a bacterial pellet derived from an enrichment culture.

The following controls should be included in all *Vp_{AHPND}* PCR assays: a) negative extraction control i.e. DNA template extracted at the same time from a known negative sample; b) DNA template from a known positive sample, such as *Vp_{AHPND}*-affected shrimp tissue or DNA from an *Vp_{AHPND}*-positive bacterial culture, or plasmid DNA that contains the target region of the specific set of primers; c) a non-template control. In addition, a further control is required to demonstrate that extracted nucleic acid is free from PCR inhibitors, for example, for shrimp tissues use of the decapod 18S rRNA PCR (Lo *et al.*, 1996) or use the 16S rRNA PCR for bacteria (Weisburg *et al.*, 1991).

4.4.1. Real-time PCR

This protocol is based on the method described by Han *et al.* (2015b). The TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Life Technologies) is used and extracted DNA is added to the real-time PCR mixture containing 0.3 µM of each primer and 0.1 µM probe to a final volume of 10 µl. Real-time PCR conditions consist of 20 seconds at 95°C, followed by 45 cycles of 3 seconds at 95°C and 30 seconds at 60°C. At the completion of the TaqMan real-time PCR assay, the presence of PirA DNA is demonstrated by the presence of specific amplicons, identified by software-generated characteristic amplification curves. No-template controls must have no evidence of specific amplicons. The primers and probe and target gene for the *Vp_{AHPND}*-specific real-time PCR are listed in Table 4.4.1.1.

Table 4.4.1.1. Primers and probe for the real-time PCR method for detection of *pirA* toxin gene

Primer/ probe name	Sequence (5'–3')	Target gene	Reference
VpPirA-F	TTG-GAC-TGT-CGA-ACC-AAA-CG	pirA	Han <i>et al.</i> , 2015b
VpPirA-R	GCA-CCC-CAT-TGG-TAT-TGA-ATG		
VpPirA Probe	FAM-AGA-CAG-CAA-ACA-TAC-ACC-TAT-CAT-CCC-GGA-TAMRA		

4.4.2. Conventional PCR

One-step PCR detection of pVA1 plasmid

Two one-step PCR methods (AP1 and AP2) are described here for detection of the pVA1 plasmid in enrichment broth cultures. The primers, target gene and the size of the expected amplicons are listed in Table 4.4.2.1.

Table 4.4.2.1. PCR primers for one-step PCR detection of pVA1 plasmid

Method name	Primers (5'–3')	Target gene	Expected amplicon size	Reference
AP1	AP1F: 5CCT-TGG-GTG-TGC-TTA-GAG-GAT-G AP1R: GCA-AAC-TAT-CGC-GCA-GAA-CAC-C	<i>pVA1</i>	700bp	Flegel & Lo (2014)
AP2	AP2F: TCA-CCC-GAA-TGC-TCG-CTT-GTG-G AP2R: CGT-CGC-TAC-TGT-CTA-GCT-GAA-G	<i>pVA1</i>	700bp	Flegel & Lo (2014)

Protocol for the AP1 and AP2 PCR methods

This protocol follows the method described by Flegel & Lo (2014). The PCR reaction mixture consists of 2.5 µl 10× PCR mix, 0.7 µl 50 mM MgCl₂, 0.4 µl 10 mM dNTPs, 0.5 µl 10 µM AP1/AP2F, 0.5 µl 10 µM AP1/AP2R, 0.2 µl Taq DNA polymerase and approximately 0.01–1 ng of template DNA in a total volume of 25 µl made up with distilled water. For PCR a denaturation step of 94°C for 5 minutes is followed by 25–30 cycles of 94°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds and 72°C for 60 seconds with a final extension step at 72°C for 10 minutes and then the reaction mixture can be held at 4°C (<https://enaca.org/publications/health/disease-cards/ahpnd-detection-method-announcement.pdf>).

One-step PCR detection of PirA/PirB toxin genes

Four one-step PCR methods (AP3, TUMSAT-Vp3, VpPirA-284 and VpPirB-392) are described here for detection of Pir toxin genes in enrichment broth cultures. The primers, target gene and the size of the expected amplicons are listed in Table 4.4.2.3.

Table 4.4.2.2. PCR primers for one-step PCR detection of PirA and PirB toxin genes

Method name	Primers (5'–3')	Target gene	Expected amplicon size	Reference
AP3	AP3-F: ATG-AGT-AAC-AAT-ATA-AAA-CAT-GAA-AC AP3-R: GTG-GTA-ATA-GAT-TGT-ACA-GAA	<i>pirA^{VP}</i>	333bp	Sirikharin <i>et al.</i> , 2015
TUMSAT-Vp3	TUMSAT-Vp3 F: GTG-TTG-CAT-AAT-TTT-GTG-CA TUMSAT-Vp3 R: TTG-TAC-AGA-AAC-CAC-GAC-TA	<i>pirA^{VP}</i>	360bp	Tinwongger <i>et al.</i> , 2014
VpPirA-284	VpPirA-284F: TGA-CTA-TTC-TCA-CGA-TTG-GAC-TG VpPirA-284R: CAC-GAC-TAG-CGC-CAT-TGT-TA	<i>pirA^{VP}</i>	284bp	Han <i>et al.</i> , 2015a
VpPirB-392	VpPirB-392F: TGA-TGA-AGT-GAT-GGG-TGC-TC VpPirB-392R: TGT-AAG-CGC-CGT-TTA-ACT-CA	<i>pirB^{VP}</i>	392bp	Han <i>et al.</i> , 2015a

Protocol for the AP3 PCR method

This protocol follows the method described by Sirikharin *et al.* (2015). The PCR reaction mixture consists of 2.5 µl 10× PCR mix, 0.7 µl 50 mM MgCl₂, 0.4 µl 10 mM dNTPs, 0.5 µl 10 µM AP3-F1, 0.5 µl 10 µM AP3-R1, 0.2 µl Taq DNA polymerase and approximately 100 ng of template DNA in a total volume of 25 µl made up with distilled water. For PCR a denaturation step of 94°C for 5 minutes is followed by 30 cycles of 94°C for 30 seconds, 53°C for 30 seconds and 72°C for 40 seconds with a final extension step at 72°C for 5 minutes and then the reaction mixture can be held at 4°C.

Protocol for the VpPirA-284 and VpPirB-392 PCR methods

This protocol follows the method described by Han *et al.* (2015a) and uses PuReTaq ready-to-go PCR beads (GE Healthcare). A 25 µl PCR reaction mixture is prepared with PuReTaq ready-to-go PCR beads. Each reaction contains 0.2 µM of each primer, 10 mM Tris/HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 2.5 U of Taq DNA polymerase, and 1 µl of extracted DNA. For PCR a 3-minute denaturation step at 94°C is followed by 35 cycles of 94°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds, and a final extension at 72°C for 7 minutes.

Protocol for the TUMSAT-Vp3 PCR method

This protocol follows the method described by Tinwongger *et al.* (2014). A 30 µl PCR mixture is prepared containing 1 µl DNA template, 10× PCR buffer, 0.25 mM dNTP mixture, 0.6 µM of each primer and 0.01 U Taq polymerase. PCR conditions consist of an initial preheating stage of 2 minutes at 95°C, followed by 30 cycles of 30 seconds denaturation at 95°C, 30 seconds annealing at 56°C and 30 seconds extension at 72°C.

AP4 nested PCR protocol for detection of Vp_{AHPND}

This protocol follows the method described by Dangtip *et al.* (2015). The first PCR reaction mixture consists of 2.5 µl 10× PCR mix, 1.5 µl 50 mM MgCl₂, 0.5 µl 10 mM dNTPs, 0.5 µl 10 µM AP4-F1, 0.5 µl 10 µM AP4-R1, 0.3 µl of Taq DNA pol (5 units µl⁻¹) and approximately 100 ng of template DNA in a total volume of 25 µl made up with distilled water. The PCR protocol is 94°C for 2 minutes followed by 30 cycles of 94°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds and 72°C for 90 seconds with a final extension step at 72°C for 2 minutes and hold at 4°C.

The nested PCR reaction mixture consists of 2.5 µl 10x PCR mix, 1.5 µl 50 mM MgCl₂, 0.5 µl 10 mM dNTPs, 0.375 µl 10 µM AP4-F2, 0.375 µl 10 µM AP4-R2, 0.3 µl Taq DNA pol (5 units µl⁻¹) and 2 µl of the first PCR reaction in a total volume of 25 µl. The nested PCR protocol is 94°C for 2 minutes followed by 25 cycles of 94°C for 20 seconds, 55°C for 20 seconds and 72°C for 20 seconds and hold at 4°C.

The nested PCR primers, designed using the China (People's Rep. of) isolate of AHPND bacteria (Yang *et al.*, 2014), are shown in Table 4.4.2.7. The expected amplicon sizes are 1269 bp for the outer primers (AP4-F1 and AP4-R1) and 230 bp for the inner primers (AP4-F2 and AP4-R2). At high concentrations of target DNA, additional amplicons may occur as the product of residual primer AP4-F1 pairing with AP4-R2 (357 bp) or AP4-F2 with AP4-R1 (1142 bp) in the nested step.

Table 4.4.2.3. Primers for the AP4, nested PCR method for detection of *PirA* and *PirB* toxin genes

Method name	Primers (5'–3')	Expected amplicon size	Reference
AP4 Step 1	AP4-F1: ATG-AGT-AAC-AAT-ATA-AAA-CAT-GAA-AC AP4-R1: ACG-ATT-TCG-ACG-TTC-CCC-AA	1269	Dangtip <i>et al.</i> , 2015
AP4 Step 2	AP4-F2: TTG-AGA-ATA-CGG-GAC-GTG-GG AP4-R2: GTT-AGT-CAT-GTG-AGC-ACC-TTC	230	

Analysis of conventional PCR products by agarose gel electrophoresis

After PCR, amplicons are visualised by agarose gel electrophoresis. Twenty μl of the PCR reaction mixture, with 6 \times loading dye added, is loaded onto a 1.5% agarose gel and electrophoresis is carried out at 90 volts for 40 minutes. Amplicons are visualised with SYBR Safe gel stain (Invitrogen, Cat. No. 33102) according to the manufacturer's instructions. Amplicons of the expected size appropriate for the PCR methods used (Tables 4.4.2.1, 4.4.2.2 and 4.4.2.3) indicate a positive result.

4.4.3. Other nucleic acid amplification methods

Cruz-Flores *et al.* (2019) developed a multiplex real-time PCR-based SYBR green assay for simultaneous detection of *pirA*, *pirB*, 16S rRNA and 18S rRNA, and a duplex real-time PCR-based Taqman probe assay showing high specificity and sensitivity – limit of detection was 10 copies for both *pirA* and *pirB*.

A recombinase polymerase amplification assay was developed by Mai *et al.* (2021). This assay has a limit of detection of five copies of the *pirAB* gene and high specificity. A LAMP-based assay for AHPND detection developed by Koiwai *et al.* (2016) also shows high specificity and sensitivity.

4.5. Amplicon sequencing

The positive results obtained from conventional PCR described in 4.4.2 need to be confirmed by sequencing.

4.6. *In-situ* hybridisation

ISH is not currently available (December 2021).

4.7. Immunohistochemistry

An immunohistochemistry assay to detect AHPND was developed by Kumar *et al.*, (2019). However, the assay requires further validation.

4.8. Bioassay

V_{AHPND} has been transmitted experimentally by immersion and by reverse gavage (Joshi *et al.*, 2014b; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013), simulating natural horizontal transmission via oral routes and co-habitation. Thus, following isolation and purification of a bacterium that is suspected to cause AHPND, a bioassay can be performed to confirm the presence of the causative agent. The immersion procedure is carried out by immersing 15 shrimp for 15 minutes, with aeration, in a suspension (150 ml clean artificial seawater) of 2×10^8 cells of the cultured bacterium per ml. Following this initial 15-minute period, the shrimp and the inoculum are transferred to a larger tank with a volume of clean artificial seawater to make the final concentration of the bacterium 2×10^6 cells ml^{-1} . Shrimp are monitored at 6- to 8-hour intervals. Dead shrimp can be processed for V_{AHPND} PCR and sequence analysis. Moribund or surviving shrimp are processed for histology, bacterial re-isolation, PCR and sequence analysis. A positive bioassay is indicated by the detection of characteristic histological lesions and V_{AHPND} by PCR and amplicon sequence analysis.

4.9. Antibody- or antigen-based detection methods

An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (I-ELISA) for AHPND detection developed by Mai *et al.* (2020) showed high sensitivity (the limit of detection was $0.008 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ for PirA^{vp} and $0.008 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ for PirB^{vp}) and specificity.

4.10. Other methods

None.

5. Test(s) recommended for surveillance to demonstrate freedom in apparently healthy populations

Real-time PCR (Han *et al.*, 2015b) is recommended for demonstrating freedom from AHPND in an apparently healthy population.

6. Corroborative diagnostic criteria

This section only addresses the diagnostic test results for detection of infection in the absence (Section 6.1.) or in the presence of clinical signs (Section 6.2.) but does not evaluate whether the infectious agent is the cause of the clinical event.

The case definitions for suspect and confirmed cases have been developed to support decision-making related to trade and confirmation of disease status at the country, zone or compartment level. Case definitions for disease confirmation in endemically affected areas may be less stringent. It is recommended that all samples that yield suspect positive test results in an otherwise pathogen-free country or zone or compartment should be referred immediately to the OIE Reference Laboratory for confirmation, whether or not clinical signs are associated with the case. If a laboratory does not have the capacity to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate OIE Reference Laboratory.

6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status³

Apparently healthy populations may fall under suspicion, and therefore be sampled, if there is an epidemiological link(s) to an infected population. Geographic proximity to, or movement of animals or animal products or equipment, etc., from a known infected population equate to an epidemiological link. Alternatively, healthy populations are sampled in surveys to demonstrate disease freedom.

6.1.1. Definition of suspect case in apparently healthy animals

The presence of infection with AHPND shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) A positive result by any of the real-time or conventional PCR methods recommended in Table 4.1
- ii) Histo- or cytopathological changes consistent with the presence of the pathogen or the disease

6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy animals

The presence of infection with *Vibrio parahaemolyticus* (Vp_{AHPND}) is considered to be confirmed if the following criterion is met:

- i) Positive results by real-time PCR and conventional PCR followed by amplicon sequence analysis.

Reference Laboratories should be contacted for specimen referral when testing laboratories cannot undertake any of the recommended test methods and testing is being undertaken that will result in notification to the OIE.

6.2 Clinically affected animals

Clinical signs are not pathognomonic for a single disease; however, they may narrow the range of possible diagnoses.

6.2.1. Definition of suspect case in clinically affected animals

The presence of infection with *Vibrio parahaemolyticus* (Vp_{AHPND}) shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Gross pathology or clinical signs associated with the disease as described in this chapter, with or without elevated mortality

³ For example transboundary commodities.

- ii) A positive result by real-time PCR
- iii) A positive result by conventional PCR

6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

The presence of infection with *Vibrio parahaemolyticus* (Vp_{AHPND}) is considered to be confirmed if the following criterion is met:

- i) Positive results by real-time PCR and conventional PCR followed by amplicon sequence analysis.

Reference Laboratories should be contacted for specimen referral when testing laboratories cannot undertake any of the recommended test methods and testing is being undertaken that will result in notification to the OIE.

6.3. Diagnostic sensitivity and specificity for diagnostic tests

The diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis of infection with *Vibrio parahaemolyticus* (Vp_{AHPND}) are provided in Tables 6.3.1. and 6.3.2. This information can be used for the design of surveys for infection with *Vibrio parahaemolyticus* (Vp_{AHPND}), however, it should be noted that diagnostic performance is specific to the circumstances of each diagnostic accuracy study (including the test purpose, source population, tissue sample types and host species) and diagnostic performance may vary under different conditions. Data are only presented where tests are validated to at least level 2 of the validation pathway described in Chapter 1.1.2. and the information is available within published diagnostic accuracy studies.

6.3.1. For presumptive diagnosis of clinically affected animals

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation
Conventional PCR	Diagnosis	Clinically diseased and apparently healthy shrimp	AHPND causing and non-causing bacterial isolates	<i>Penaeus vannamei</i>	100	100	Bioassay	Sirikharin <i>et al.</i> , 2015
Conventional PCR	Diagnosis	Clinically diseased and apparently healthy shrimp	AHPND causing and non-causing bacterial isolates	NA	100 ¹	100	Bioassay	Tinwongger <i>et al.</i> , 2014
Real-time PCR	Diagnosis	Clinically diseased animals	Hepato-pancreas	<i>Penaeus vannamei</i>	100	NA	Bioassay and histopathology	Han <i>et al.</i> 2015b

DSe = diagnostic sensitivity, DSp = diagnostic specificity, NA= Not available, PCR: = polymerase chain reaction.

¹100% sensitivity for TUMSAT-Vp3 primer set

6.3.2. For surveillance of apparently healthy animals

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation

DSe = diagnostic sensitivity, DSp = diagnostic specificity NA= Not available, PCR: = polymerase chain reaction.

7. References

- ARANGUREN CARO L.F., MAI H.N., KANRAR S., CRUZ-FLORES R. & DHAR A.K. (2020a). A mutant of *Vibrio parahaemolyticus* pirAB_{VP} (+) that carries binary toxin genes but does not cause acute hepatopancreatic necrosis disease. *Microorganisms*, **8**, 1549.
- CRUZ-FLORES R., MAI H.N. & DHAR A.K. (2019). Multiplex SYBR Green and duplex TaqMan real-time PCR assays for the detection of *Photobacterium* Insect-Related (Pir) toxin genes *pirA* and *pirB*. *Mol. Cell. Probes*, **43**, 20–28.
- DABU I.M., LIM J.J., ARABIT P.M.T., ORENSE S.J.A.B., TABARDILLO J.A., CORRE V.L. & MANINGAS M.B.B. (2017). The first record of acute hepatopancreatic necrosis disease in the Philippines. *Aquacult. Res.*, **48**, 792–799.
- DANGTIP S., SIRIKHARIN R., SANGUANRUT P., THITAMADEE S., SRITUNYALUCKSANA K., TAENGCHAIYAPHUM S., MAVICHAK R., PROESPRAIWONG P. & FLEGEL T.W. (2015). AP4 method for two-tube nested PCR detection of AHPND isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture Rep.*, **2**, 158–162.
- DE LA PENA L.D., CABILLON N.A.R., CATEDRAL D.D., AMAR E.C., USERO R.C., MONOTILLA W.D., CALPE A.T., FERNANDEZ D.D. & SALOMA C.P. (2015). Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) outbreaks in *Penaeus vannamei* and *P. monodon* cultured in the Philippines. *Dis. Aquat. Org.*, **116**, 251–254.
- FLEGEL T.W. & LO C.F. (2014). Free release of primers for specific detection of bacterial isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). Published by the Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, Bangkok, Thailand.
- GOMEZ-GIL B., SOTO-RODRÍGUEZ S., LOZANO R. & BETANCOURT-LOZANO M. (2014). Draft genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus* strain M0605, which causes severe mortalities of shrimps in Mexico. *Genome Announc.*, **2**, e00055-14.
- GOMEZ-JIMENEZ S., NORIEGA-OROZCO L., SOTELO-MUNDO R.R., CANTU-ROBLES V.A., COBIAN-GUEMES A.G., COTA-VERDUGO R.G., GAMEZ-ALEJO L.A., DEL POZO-YAUNER L., GUEVARA-HERNANDEZ E., GARCIA-OROZCO K.D., LOPEZ-ZAVALA A.A. & OCHOA-LEYVA A. (2014). High-quality draft genomes of two *Vibrio parahaemolyticus* strains aid in understanding acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimps in Mexico. *Genome Announc.*, **2**, e00800-14.
- HAN J.E., TANG K.F.J., TRAN L.H. & LIGHTNER D.V. (2015a). *Photobacterium* insect related (*Pir*) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **113**, 33–40.
- HAN J.E., TANG K.F.J., PANTOJA C.R., WHITE B.L. & LIGHTNER D.V. (2015b). qPCR assay for detecting and quantifying a virulence plasmid in acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) due to pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*, **442**, 12–15.
- HONG X.P., XU D., ZHUO Y., LIU H.Q. & LU L.Q. (2016). Identification and pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* isolates and immune responses of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* (Boone). *J. Fish Dis.*, **39**, 1085–1097.
- JOSHI J., SRISALA J., SAKAEW W., PRACHUMWAT A., SRITUNYALUCKSANA K., FLEGEL T.W. & THITAMADEE S. (2014a). Identification of bacterial agent(s) for acute hepatopancreatic necrosis syndrome, a new emerging shrimp disease. *Suranaree J. Sci. Technol.* Available from: <http://ird.sut.ac.th/e-journal/Journal/pdf/140283.pdf>.
- JOSHI J., SRISALA J., TRUONG V.H., CHEN I.T., NUANGSAENG B., SUTHIENKUL O., LO C.F., FLEGEL T.W., SRITUNYALUCKSANA K. & THITAMADEE S. (2014b). Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture*, **428–429**, 297–302.
- KARUNASAGAR I., KARUNASAGAR I., VENUGOPAL M.N. & NAGESHA C.N. (1987). Survival of *Vibrio parahaemolyticus* in estuarine and sea water and in association with clams. *Syst. Appl. Microbiol.*, **9**, 316–319.
- KOIWAI K., TINWONGGER S., NOZAKI R., KONDO H. & HIRONO I. (2016). Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease strain of *Vibrio parahaemolyticus* using loop-mediated isothermal amplification. *J. Fish Dis.*, **39**, 603–606.
- KONDO H., TINWONGGER S., PROESPRAIWONG P., MAVICHAK R., UNAJAK S., NOZAKI R. & HIRONO I. (2014). Draft genome sequences of six strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease shrimp in Thailand. *Genome Announc.*, **2**, e00221-14.
- KONDO H., VAN P.T., DANG L.T. & HIRONO I. (2015). Draft genome sequences of non-*Vibrio parahaemolyticus* acute hepatopancreatic necrosis disease strain KC13.17.5, isolated from diseased shrimp in Vietnam. *Genome Announc.*, **3**, e00978-15.

- KUMAR V., BELS L.D., COUCK L., BARUAH K., BOSSIER P. & BROECK W.V.D. (2019). PirABVP Toxin Binds to Epithelial Cells of the Digestive Tract and Produce Pathognomonic AHPND Lesions in Germ-Free Brine Shrimp. *Toxins*, **11**, 717.
- LEE C.T., CHEN I.T., YANG Y.T., KO T.P., HUANG Y.T., HUANG J.Y., HUANG M.F., LIN S.J., CHEN C.Y., LIN S.S., LIGHTNER D.V., WANG A.H., WANG H.C., HOR L.I. & LO C.F. (2015). The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **112**, 10798–10803.
- LIGHTNER D.V. (1996). A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.
- LO C.-F., LEU J.-H., HO C.-H., CHEN C.-H., PENG S.-E., CHEN Y.-T., CHOU C.-M., YEH P.-Y., HUANG C.-J., CHOU H.-Y., WANG C.-H. & KOU G.-H. (1996). Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, **25**, 133–141.
- MAI N.H., ARANGUREN L.F.C, CRUZ-FLORES R. & DHAR A.K. (2021). Development of a Recombinase Polymerase Amplification (RPA) assay for acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) detection in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Mol. Cell. Probes*, **57**, 101710.
- MAI H.N., CRUZ-FLORES R. & DHAR A.K. (2020). Development of an indirect Enzyme Linked Immunoassay (iELISA) using monoclonal antibodies against Photobacterium insect related toxins, PirA^{Vp} and PirB^{Vp} released from *Vibrio* spp. *J. Microbiol. Methods*, **176**, 106002.
- MUNTADA-GARRIGA J.M., RODRIGUEZ-JEREZ J.J., LOPEZ-SABATER E.I. & MORA-VENTURA M.T. (1995). Effect of chill and freezing temperatures on survival of *Vibrio parahaemolyticus* inoculated in homogenates of oyster meat. *Let. Appl. Microbiol.*, **20**, 225–227.
- NACA (2014). Acute hepatopancreatic necrosis disease card (updated June 2014). Published by the Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, Bangkok, Thailand.
- NUNAN L., LIGHTNER D., PANTOJA C. & GOMEZ-JIMENEZ S. (2014). Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Dis. Aquat. Org.*, **111**, 81–86.
- POWERS Q.M., ARANGUREN L.F., FITZSIMMONS K.M., MCLAIN J.E. & DHAR A.K. (2021). Crayfish (*Cherax quadricarinatus*) susceptibility to acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *J. Invertebr. Pathol.*, **186**, 107554.
- SCHOFIELD P.J., NOBLE B.L., ARANGUREN CARO L.F., MAI H.N., PADILLA T.J., MILLABAS J. & DHAR A.K. (2020). Pathogenicity of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) on the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, and Pacific White Shrimp, *Penaeus vannamei*, at various salinities. *Aquac. Res.*, **52**, 1480–1489.
- SIRIKHARIN R., TAENGCHAIYAPHUM S., SANGUANRUT P., CHI T.D., MAVICHAK R., PROESPRAWONG P., NUANGSAENG B., THITAMADEE S., FLEGEL T.W. & SRITUNYALUCKSANA K. (2015). Characterization and PCR detection of binary, Pir-like toxins from *Vibrio parahaemolyticus* isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *PLoS ONE*, **10**, e0126987. doi:10.1371/journal.pone.0126987.
- SOTO-RODRIGUEZ S.A., GOMEZ-GIL B., LOZANO-OLVERA R., BETANCOURT-LOZANO M. & MORALES-COVARRUBIAS M.S. (2015). Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in northwestern Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 1689–1699.
- THOMSON W.K. & THACKER C.L. (1973). Effect of temperature on *Vibrio parahaemolyticus* in oysters at refrigerator and deep freeze temperatures. *Can. Inst. Food Sci. Tech. J.*, **6**, 156–158.
- TINWONGGER S., PROESPRAWONG P., THAWONSUWAN J., SRIWANAYOS P., KONGKUMNERD J., CHAWEEPCK T., MAVICHAK R., UNAJAK S., NOZAKI R., KONDO H. & HIRONO I. (2014). Development of PCR diagnosis method for shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) strain of *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Pathol.*, **49**, 159–164.
- TRAN L.H., FITZSIMMONS K. & LIGHTNER D.V. (2014). AHPND/EMS: From the academic science perspective to the production point of view. *Aquaculture Asia Pacific*, **10**, 14–18.
- TRAN L., NUNAN L., REDMAN R.M., MOHNEY L.L., PANTOJA C.R., FITZSIMMONS K. & LIGHTNER D.V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **105**, 45–55.
- WEISBURG W.G., BARNES S.M., PELLETIER D.A. & LANE D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, **173**, 697–703.

YANG Y.T., CHEN I.T., LEE C.T., CHEN C.Y., LIN S.S., HOR L.I., TSENG T.C., HUANG Y.T., SRITUNYALUCKSANA K., THITAMADEE S., WANG H.C. & LO C.F. (2014). Draft genome sequences of four strains of *Vibrio parahaemolyticus*, three of which cause early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp in China and Thailand. *Genome Announc.*, **2**, e00816-14.

*
* *

NB: There are OIE Reference Laboratories for acute hepatopancreatic necrosis disease (see Table at the end of this *Aquatic Manual* or consult the OIE web site for the most up-to-date list: <https://www.oie.int/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>). Please contact the OIE Reference Laboratory for any further information on acute hepatopancreatic necrosis disease

NB: FIRST ADOPTED IN 2017; MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2018.

[Volver al orden del día](#)

CHAPTER 2.2.3.

INFECTION WITH *HEPATOBACTER PENAEI* (NECROTISING HEPATOPANCREATITIS)

1. Scope

Infection with Candidatus *Hepatobacter penaei* means infection with the pathogenic agent *H. penaei*, an obligate intracellular bacterium of the Order α -Proteobacteria.

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent

Hepatobacter penaei is a pleomorphic, Gram-negative, intracytoplasmic bacterium (Nunan *et al.*, 2013). It is a member of the α -Proteobacteria (Frelier *et al.*, 1992; Lightner & Redman, 1994; Loy & Frelier, 1996; Loy *et al.*, 1996). More recently it has been suggested that it belongs to the *Holosporaceae* family within the *Rickettsiales* (Leyva *et al.*, 2018). The predominant form is a rod-shaped rickettsial-like organism (0.25 × 0.9 µm), whereas the helical form (0.25 × 2–3.5 µm) possesses eight flagella at the basal apex (Frelier *et al.*, 1992; Lightner & Redman, 1994; Loy & Frelier, 1996; Loy *et al.*, 1996). Genetic analysis of *H. penaei* associated with North and South American outbreaks suggests that the isolates are either identical or very closely related subspecies (Loy *et al.*, 1996). Recently analysis based on the 16S rRNA confirm the high similarity among different *H. penaei* isolates in the Americas (99–100%) (Aranguren & Dhar, 2018).

2.1.2. Survival and stability in processed or stored samples

Hepatobacter penaei-infected tissues remain infectious after repeated cycles of freeze–thawing and after storage in 50% glycerine. *Hepatobacter penaei* frozen at –20°C to –70°C and –80°C have been shown to retain infectivity in experimental transmission trials with *Penaeus vannamei* (Crabtree *et al.*, 2006; Frelier *et al.*, 1992). Flash freezing *H. penaei* at –70°C to –80°C does not significantly affect the infectivity (Aranguren *et al.*, 2010; Crabtree *et al.*, 2006).

2.1.3. Survival and stability outside the host

No information available.

2.2. Host factors

2.2.1. Susceptible host species

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with *H. penaei* according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code)* include: whiteleg shrimp (*P. vannamei*)

2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility

Species for which there is incomplete evidence to fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with *H. penaei* according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Code* include: aloha prawn (*P. marginatus*), banana prawn (*P. merguensis*), blue shrimp (*P. stylirostris*), giant tiger prawn (*P. monodon*), northern brown shrimp (*P. aztecus*), northern pink shrimp (*P. duorarum*) and northern white shrimp (*P. setiferus*).

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results have been reported in the following species, but an active infection has not been demonstrated: American lobster (*Homarus americanus*) (Avila-Villa *et al.*, 2012; Bekavac *et al.*, 2022).

2.2.3. Likelihood of infection by species, host life stage, population or sub-populations

Infection with *H. penaei* has been demonstrated in postlarvae, juveniles, adults and broodstock of *P. vannamei* (Aranguren *et al.*, 2006).

2.2.4. Distribution of the pathogen in the host

The target tissue is the hepatopancreas: infection with *H. penaei* has been reported in all hepatopancreatic cell types (Lightner 2012). *Hepatobacter penaei* is also present in the faeces (Brinez *et al.*, 2003).

2.2.5. Aquatic animal reservoirs of infection

Some members of *P. vannamei* populations that survive infection with *H. penaei* may carry the intracellular bacteria for life and transmit it to other populations by horizontal transmission (Aranguren *et al.*, 2006; Lightner, 2005; Morales-Covarrubias, 2010; Vincent & Lotz, 2005).

2.2.6. Vectors

No vectors are known in natural infections.

2.3. Disease pattern

2.3.1. Mortality, morbidity and prevalence

Infection with *H. penaei* results in the mortalities approaching 100% in *P. vannamei*, 5.6–15% in *P. duorarum*, and 5–17% in *P. aztecus* (Aguirre-Guzman *et al.*, 2010).

The prevalence was reported as 0.77% in cultured *P. vannamei* and 0.43 in cultured *P. stylirostris* in Peru (Lightner & Redman, 1994), 5–86.2% in Mexico (Ibarra-Gamez *et al.*, 2007), and 0.6–1.3% in *P. vannamei* in Belize, Brazil, Guatemala, Honduras, Mexico, Nicaragua and Venezuela (Morales-Covarrubias *et al.*, 2011).

NHP-affected broodstock ponds in Colombia reported mortalities of up to 85%, while non NHP-affected broodstock ponds in the same farm experienced mortalities of 40–50% (Aranguren *et al.*, 2006)

2.3.2. Clinical signs, including behavioural changes

A wide range of gross signs can be used to indicate the possible presence of infection with *H. penaei*. These include lethargy, reduced food intake, atrophied hepatopancreas, anorexia and empty guts, noticeably reduced growth and poor length weight ratios ('thin tails'); soft shells and flaccid bodies; black or darkened gills; heavy surface fouling by epicomensals organisms; bacterial shell disease, including ulcerative cuticle lesions or melanised appendage erosion; and expanded chromatophores resulting in the appearance of darkened edges in uropods and pleopods. None of these signs are pathognomonic. (Lightner, 1996; Loy *et al.*, 1996).

2.3.3. Gross pathology

Infection with *H. penaei* often causes an acute disease with very high mortalities in young juveniles, adults and broodstock. In horizontally infected young juveniles, adult and broodstock, the incubation period and severity of the disease are somewhat size or age dependent. Gross signs are not specific, but shrimp with acute infection with *H. penaei* show a marked reduction in food consumption, followed by changes in behaviour and appearance including pale discoloration of the hepatopancreas with further size reduction.

2.3.4. Modes of transmission and life cycle

Horizontal transmission of *H. penaei* can be through cannibalism or by contaminated water (Aranguren *et al.*, 2006; 2010; Frelief *et al.*, 1993; Gracia-Valenzuela *et al.*, 2011; Vincent *et al.*, 2004). *Hepatobacter penaei* in faeces shed into pond water has also been suggested as a source of contamination (Aranguren *et al.*, 2006; Briñez *et al.*, 2003; Morales-Covarrubias *et al.*, 2006). *Hepatobacter penaei*-positive broodstock females produce postlarvae that were also *H. penaei*-positive, which suggests that a transmission from broodstock to progeny can occur (Aranguren *et al.*, 2006).

2.3.5. Environmental factors

The occurrence of infection with *H. penaei* in farms may increase during long periods of high temperatures (>29°C) and high salinity (20–38 ppt) (Morales-Covarrubias, 2010). In the months when temperatures are high during the day and low at night, high prevalence and mortality (>20%) are observed (Morales-Covarrubias, 2010).

2.3.6. Geographical distribution

Hepatobacter penaei appears to have a Western Hemisphere distribution in both wild and cultured penaeid shrimp (Aguirre-Guzman *et al.*, 2010; Del Rio-Rodriguez *et al.*, 2006). In the Western Hemisphere, *H. penaei* is commonly found in cultured penaeid shrimp in the Americas (Aranguren *et al.*, 2010; Frelier *et al.*, 1992; Ibarra-Gamez *et al.*, 2007; Morales-Covarrubias, 2010; Morales-Covarrubias *et al.*, 2011). *Hepatobacter penaei*, was introduced into Africa from North America via movement of infected *P.vannamei* broodstock, however NHP was later eradicated by fallowing (Lightner *et al.*, 2012).

See OIE WAHIS (<https://wahis.oie.int/#/home>) for recent information on distribution at the country level.

2.4. Biosecurity and disease control strategies

Early detection (initial phase) of clinical infection with *H. penaei* is important for successful treatment because of the potential for cannibalism to amplify and transmit the disease. Shrimp starvation and cannibalism of infected shrimp, and positive conditions for *H. penaei* enaei multiplication, are important factors for the spread of *H. penaei* in *P. vannamei*. Preventive measures include raking, tilling, and removing sediments from the bottom of the ponds, prolonged drying (through exposure to sunlight) of ponds and water distribution canals for several weeks, disinfection of fishing gear and other farm equipment using calcium hypochlorite, extensive liming of ponds and the use of ponds liners. The use of specific pathogen-free (SPF) broodstock is an effective preventive measure. NHP, particularly in the initial phase, can be treated by using antibiotics in medicated feeds. *Hepatobacter penaei* is sensitive to oxytetracycline (Lightner & Redman, 1994).

2.4.1. Vaccination

No scientifically confirmed reports.

2.4.2. Chemotherapy including blocking agents

No scientifically confirmed reports.

2.4.3. Immunostimulation

No scientifically confirmed reports.

2.4.4. Breeding resistant strains

One population from Latin America that has been selected for several generations for resistance to Taura syndrome virus in the presence of infection with *H. penaei*, seems to be more resistant to NHP disease than the Kona line under experimental conditions (Aranguren *et al.*, 2010)

2.4.5. Inactivation methods

The use of hydrated lime (Ca(OH)₂) to treat the bottom of ponds during pond preparation before stocking can help reduce infection with *H. penaei*.

2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

Disinfection of eggs and larvae is a good management practice and is recommended for its potential to reduce *H. penaei* contamination of spawned eggs and larvae (and contamination by other disease agents).

2.4.7. General husbandry

The prevalence and severity of infection with *H. penaei* may be increased by rearing shrimp in relatively crowded or stressful conditions. Some husbandry practices have been successfully applied to the prevention of infection with *H. penaei*. Among these has been the application of PCR to pre-screening of wild or pond-reared broodstock.

3. Specimen selection, sample collection, transportation and handling

3.1. Selection of populations and individual specimens

Suitable specimens for testing for infection with *H. penaei* are the following life stages: postlarvae (PL), juveniles and adults.

3.2. Selection of organs or tissues

Hepatobacter penaei infects most enteric tissue. The principal target tissue for *H. penaei* is the hepatopancreas (Lightner, 2012).

3.3. Samples or tissues not suitable for pathogen detection

Hepatobacter penaei does not replicate in the midgut, caeca, connective tissue cells, the gills, haematopoietic nodules and haemocytes, ventral nerve cord and ganglia, antennal gland tubule epithelial cells, and lymphoid organ parenchymal cells. Samples of pleopods or haemolymph are not recommended for *H. penaei* detection by PCR.

3.4. Non-lethal sampling

Faeces may be collected and used for testing (usually by PCR, when non-lethal testing of valuable broodstock is necessary (Brinez *et al.*, 2003; Frelie *et al.*, 1993; Lightner, 1996). Faeces samples have not been validated to the same level as hepatopancreas samples.

3.5. Preservation of samples for submission

For guidance on sample preservation methods for the intended test methods, see Chapter 2.2.0 *General information (diseases of crustaceans)*

3.5.1. Samples for pathogen isolation

The success of pathogen isolation and results of bioassay depend strongly on the quality of samples (time since collection and time in storage). Fresh specimens should be kept on ice and preferably sent to the laboratory within 24 hours of collection. To avoid degradation of samples, use alternate storage methods only after consultation with the receiving laboratory.

3.5.2. Preservation of samples for molecular detection

Tissue samples of hepatopancreas or faeces for PCR testing should be preserved in 70–95% (v/v) analytical/reagent-grade (undenatured) ethanol. The recommended ratio of ethanol to tissue is 10:1. The use of lower grade (laboratory or industrial grade) ethanol is not recommended. If material cannot be fixed it may be frozen.

3.5.3. Samples for histopathology, immunohistochemistry or *in-situ* hybridisation

Standard sample collection, preservation and processing methods for histological techniques can be found in Section 5.3 of Chapter 2.2.0.

3.5.4. Samples for other tests

No scientifically confirmed reports.

3.6. Pooling of samples

Pooling of samples from more than one individual animal for a given purpose should only be recommended where robust supporting data on diagnostic sensitivity and diagnostic specificity have been evaluated and found to be suitable. The effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been thoroughly evaluated, therefore, larger shrimp should be processed and tested individually. Small life stages such as PL or specimens up to 0.5 g can be pooled to obtain the minimum amount of material for *H. penaei* molecular detection.

4. Diagnostic methods

The methods currently available for pathogen detection that can be used in i) surveillance of apparently healthy animals, ii) presumptive diagnosis in clinically affected animals and iii) confirmatory diagnostic purposes are listed in Table 4.1. by animal life stage.

Ratings for purposes of use. For each recommended assay a qualitative rating for the purpose of use is provided. The ratings are determined based on multiple performance and operational factors relevant to application of an assay for a defined purpose. These factors include appropriate diagnostic performance characteristics, level of

assay validation, availability cost, timeliness, and sample throughput and operability. For a specific purpose of use, assays are rated as:

- +++ = Methods are most suitable with desirable performance and operational characteristics.
- ++ = Methods are suitable with acceptable performance and operational characteristics under most circumstances.
- + = Methods are suitable, but performance or operational characteristics may limit application under some circumstances.
- Shaded boxes = Not appropriate for this purpose.

Validation stage. The validation stage corresponds to the assay development and validation pathway in chapter 1.1.2. The validation stage is specific to each purpose of use. Where available, information on the diagnostic performance of recommended assays is provided in Section 6.3.

OIE Reference Laboratories welcome feedback on diagnostic performance of recommended assays, in particular PCR methods. Of particular interest are any factors affecting expected assay sensitivity (e.g. tissue components inhibiting amplification) or expected specificity (e.g. failure to detect particular genotypes, detection of homologous sequences within the host genome). These issues should be communicated to the OIE Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

Table 4.1. OIE recommended diagnostic methods and their level of validation for surveillance of apparently healthy animals and investigation of clinically affected animals

Method	4. Surveillance of apparently healthy animals				5. Presumptive diagnosis of clinically affected animals				6. Confirmatory diagnosis ¹ of a suspect result from surveillance or presumptive diagnosis			
	Early life stages ²	Juveniles ²	Adults	LV	Early life stages ²	Juveniles ²	Adults	LV	Early life stages ²	Juveniles ²	Adults	LV
Wet mounts						+	+	NA				
Histopathology						++	++	NA				
Cell culture												
Real-time PCR	++	+++	+++	1	++	+++	+++	1	++	++	++	1
Conventional PCR	++	+++	+++	1	++	+++	+++	1	++	+++	+++	1
Amplicon sequencing									+++	+++	+++	1
<i>In-situ</i> hybridisation					+	++	++	NA	+	++	++	NA
Bioassay					+	+	+	NA	+	+	+	NA
LAMP												
Ab-ELISA												
Ag-ELISA												
Other antigen detection methods ³												
Other methods ³												

LV = level of validation, refers to the stage of validation in the OIE Pathway (chapter 1.1.2); NA = not available; PCR = polymerase chain reaction; LAMP = loop-mediated isothermal amplification; Ab- or Ag-ELISA = antibody or antigen enzyme-linked immunosorbent assay, respectively.

¹For confirmatory diagnoses, methods need to be carried out in combination (see Section 6). ²Susceptibility of early and juvenile life stages is described in Section 2.2.3.

³Specify the test used. Shading indicates the test is inappropriate or should not be used for this purpose.

4.1. Wet mounts

Wet mount squash examination of hepatopancreas tissue is generally conducted to detect presumptive infection with *H. penaei*. The hepatopancreas may be atrophied and have any of the following characteristics: soft and watery; fluid filled centre; pale colour with or without black stripes (melanised tubules). Hepatopancreatic tubules show deformity at the distal portion; multifocal melanisation initially at the distal portion of the tubule and, later on, in the medial and proximal portion; reduced or absence of lipid droplets (Lightner, 2012).

4.2. Histopathology and cytopathology

Histological methods can be useful for indicating acute and chronic infection with *H. penaei*.

Initial infection with *H. penaei* is difficult to diagnose using routine H&E histological methods. Therefore molecular methods are recommended for initial *H. penaei* detection (e.g. by PCR or application of *H. penaei*-specific DNA probes or *in-situ* hybridisation [ISH] of histological sections).

Acute infection with *H. penaei* is characterised by atrophied hepatopancreas with moderate atrophy of the tubule epithelia, presence of bacterial cells and infiltrating haemocytes involving one or more of the tubules (multifocal encapsulations). Hypertrophic cells, individual epithelial cells, appeared to be separated from adjacent cells, undergo necrosis and desquamation into the tubular lumen. The tubular epithelial cell lipid content is variable.

The transitional phase of infection with *H. penaei* is characterised by haemocytic inflammation of the intertubular spaces in response to necrosis, cytolysis, and sloughing of hepatopancreas tubule epithelial cells. The hepatopancreas tubule epithelium is markedly atrophied, resulting in the formation of large oedematous (fluid filled or 'watery') areas in the hepatopancreas. Tubule epithelial cells within multifocal encapsulation are typically atrophied and reduced from simple columnar to cuboidal morphology. They contain little or no stored lipid vacuoles, markedly reduced or no secretory vacuoles and masses of bacteria. At this phase haemocyte nodules are observed in the presence of masses of bacteria in the centre of the nodule.

In the chronic phase of infection with *H. penaei*, tubular lesions, multifocal encapsulation and oedematous areas decline in abundance and severity and are replaced by infiltration and accumulation of haemocytes at the sites of necrosis. There are areas with fibrosis, few melanised and necrotic tubules and very low presence of hypertrophied cells with masses of bacteria in the cytoplasm and low numbers of haemocyte nodules.

4.3. Cell culture for isolation

Hepatobacter penaei has not been grown *in vitro*. No crustacean cell lines exist (Vincent & Lotz, 2007).

4.4. Nucleic acid amplification

PCR methods including PCR and real-time PCR have been developed that target several *H. penaei* genes including 16S rRNA and Flg E genes (Aranguren & Dhar, 2018; Aranguren *et al.*, 2010; Loy *et al.*, 1996).

DNA extraction

A general DNA extraction method may be used to extract DNA from the hepatopancreatic tissue of putatively infected shrimp. The amount of template DNA in a 10–25 µl PCR reaction volume should be in the range of 10–100 ng of total DNA

4.4.1. Real-time PCR

Real-time PCR methods for detection of *H. penaei* have the advantages of speed, specificity and sensitivity. The sensitivity of real-time PCR is ~100 copies of the target sequence from the *H. penaei* genome (Aranguren & Dhar, 2018; Aranguren *et al.*, 2010; Vincent & Lotz, 2005).

Protocol 1

The real-time PCR method using TaqMan chemistry described below for *H. penaei* based on the 16S rRNA gene generally follows the method used in Aranguren *et al* (2010).

- i) The PCR primers and TaqMan probe are selected from the 16S, rRNA gene of *H. penaei* (GenBank U65509) (Loy & Frelier, 1996). The primers and TaqMan probe were designed by the Primer Express software version 2.0 (Applied Biosystems). The upstream (NHP1300F) and downstream (NHP1366R) primer sequences are: 5'-CGT-TCA-CGG-GCC-TTG-TACAC-3' and 5'-GCT-CAT-CGC-CTT-AAA-GAA-AAG-ATA-A-3', respectively. The TaqMan probe NHP: 5'-CCG-CCC-GTC-AAG-CCA-TGG-AA-3', which corresponds to the region from nucleotides 1321–1340, is synthesised and labelled with fluorescent dyes 6-carboxyfluorescein (FAM) on the 5' and N,N,N,N-tetramethyl-6-carboxyrhodamine (TAMRA) on the 3' end.
- ii) *The real-time PCR reaction mixture contains:* TaqMan One-step real-time PCR SuperMix (Quanta, Biosciences), 0.3 µM of each primer, 0.1 µM of TaqMan probe, 5–50 ng DNA, and water in a reaction volume of 25 µl. For optimal results, the reaction mixture should be vortexed and mixed well.
- iii) Amplification is performed with the master cycler Realplex 2.0 (Eppendorf). The cycling consists of initial denaturation at 95°C for 3 minutes, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 seconds and annealing/extension at 60°C for 1 minute. After each cycle, the levels of fluorescence are measured.
- iv) It is necessary to include a 'no template control' in each reaction run. This is to rule out the presence of fluorescence contaminants in the reaction mixture and also to rule out reagent contamination with the specific target of the assay. A positive control should also be included, and this can be plasmid DNA containing the target sequence, purified bacteria, or DNA extracted from *H. penaei*-infected hepatopancreas.

Protocol 2

Another real-time PCR method using TaqMan chemistry described below for *H. penaei* is based on the flagella gene (flagella hook protein, flgE) (Aranguren & Dhar 2018).

- i) The PCR primers and TaqMan probe were selected from the Flg E gene of *H. penaei* (GenBank JQAJ01000001.1) (Aranguren & Dhar, 2018). The primers and TaqMan probe were designed by the Primer Express software version 3.0 (Applied Biosystems). The upstream (NHP FlgE3qF) and downstream (FlgE3qR) primer sequences are: 5'-AAC-ACC-CTG-TCT-CCC-CAA-TTC-3'; and 5'-CCA-GCC-TTG-GAC-AAA-CAC-CTT-3', respectively. The TaqMan probe NHP: 5'-CGC-CCC-AAA-GCA-TGC-CGC-3', is synthesised and labelled with fluorescent dyes 6-carboxyfluorescein (FAM) on the 5' and N,N,N,N-tetramethyl-6-carboxyrhodamine (TAMRA) on the 3' end.
- ii) *The real-time PCR reaction mixture contains:* The amplification reactions were conducted as follows: 0.5 µM of each primer, 0.1 µM TaqMan probe, 1× TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Life Technologies), 5–50 ng DNA template and HPLC water in a reaction volume of 10 µl. For optimal results, the reaction mixture should be vortexed and mixed well.
- iii) The real-time PCR profile consists of 20 seconds at 95°C followed by 40 cycles of 1 second at 95°C and 20 seconds at 60°C. Amplification detection and data analysis for real-time PCR assays are carried out with the StepOnePlus real-time PCR system (Life Technologies).
- iv) It is necessary to include a 'no template control' in each reaction run. This is to rule out the presence of fluorescence contaminants in the reaction mixture and also to rule out reagent contamination with the specific target of the assay. A positive control should also be included, and this can be plasmid DNA containing the target sequence, or DNA extracted from *H. penaei*-infected hepatopancreas.

4.4.2. Conventional PCR

Hepatopancreas may be assayed for *H. penaei* using PCR. Two different PCR methods have been developed for *H. penaei* detection using 16S rRNA gene and Flg E gene separately.

Protocol 1

The PCR based on 16S rRNA is based on Aranguren *et al.* (2010). Primers designated as NHPF2: 5'-CGT-TGG-AGG-TTC-GTC-CTT-CAGT-3' and NHPR2: 5'-GCC-ATG-AGG-ACC-TGA-CAT-CAT-C-3', amplify a 379-base pair (bp) fragment corresponding to the 16S rRNA of *H. penaei*. The PCR method outlined below generally follows the method described in Aranguren *et al.* (2010).

- i) The following controls should be included when performing the PCR assay a) known *H. penaei* negative tissue sample; b) a known *H. penaei* positive sample (hepatopancreas); and c) a 'no template' control.

- ii) The PuReTaq™ Ready-To-Go PCR Bead (RTG beads, GE Healthcare) is used for all amplification reactions described here.
- iii) The optimised PCR conditions (5–50 ng DNA) (final concentrations in 25 µl total volume) for detection of *H. penaei* in shrimp hepatopancreas samples are: primers (0.2 µM each), dNTPs (200 µM each), Taq polymerase (0.1 U µl⁻¹), magnesium chloride (1.5 mM) in 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 50 mM KCl.
- iv) The cycling parameters are: Step 1: 95°C for 5 minutes, 1 cycle; Step 2: 95°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds and 72°C for 30 seconds, 35 cycles; Step 3: 60°C for 1 minute, 72°C for 2 minutes, 1 cycle; 4°C infinite hold.

Protocol 2

The PCR based on flagella gene (flagella hook protein, flgE) is based on Aranguren & Dhar (2018). Primers designated as NHP FlgE 1143F (5'-AGG CAA ACA AAC CCT TG-3') and the NHP FlgE 1475R (5'- GCG TTG GGA AAG TT-3') amplify a 333-base pair (bp) fragment corresponding to the Flg E of *H. penaei*.

- i) The following controls should be included when performing the PCR assay a) known *H. penaei* negative tissue sample; b) a known *H. penaei* positive sample (hepatopancreas); and c) a 'no template' control.
- ii) The PuReTaq™ Ready-To-Go PCR Bead (RTG beads, GE Healthcare) is used for all amplification reactions described here.
- iii) The optimised PCR conditions (5–50 ng DNA) (final concentrations in 25 µl total volume) for detection of *H. penaei* in shrimp hepatopancreas samples are: primers (0.2 µM each), dNTPs (200 µM each), Taq polymerase (0.1 U µl⁻¹), magnesium chloride (1.5 mM) in 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 50 mM KCl.
- iv) The cycling parameters are: initial denaturation at 95°C for 5 minutes followed by 35 cycles of 95°C for 30 seconds, 62°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds, and a final extension at 72°C for 5 minutes followed by 4°C infinite hold.

Note: The conditions should be optimised for each thermal cycler using known positive controls.

The following controls should be run with each assay: negative extraction control; positive control; no template control; internal PCR control.

4.4.3. Other nucleic acid amplification methods

None.

4.5. Amplicon sequencing

PCR products may be cloned and sequenced or sequenced directly when necessary to confirm infection with *H. penaei* or to identify false positives or nonspecific amplification (Aranguren *et al.*, 2010; Aranguren & Dhar, 2018; Vincent & Lotz, 2005).

4.6. *In-situ* hybridisation

The ISH method of Loy & Frelier (1996) and Lightner (1996) provides greater diagnostic sensitivity than do more traditional methods for *H. penaei* detection and diagnosis of infection that employ classical histological methods (Lightner, 1996; Morales-Covarrubias, 2010). The ISH assay of routine histological sections of acute, transition and chronic phase lesions in hepatopancreas with a specific DIG-labelled DNA probe to *H. penaei* 16S rRNA provides a definitive diagnosis of infection with *H. penaei* (Lightner, 1996; Loy & Frelier, 1996; Morales-Covarrubias *et al.*, 2006). Pathognomonic *H. penaei* positive lesions display prominent blue to blue-black areas in the cytoplasm of affected cells when reacted with the DNA probes. (See Chapter 2.2.4 *Infection with infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus* for details of the ISH method, and Chapter 2.2.0 Section B.5.3.ii for detailed information on the use of Davidson's AFA fixative.)

4.7. Immunohistochemistry

Immunohistochemistry (IHC) tests using monoclonal antibodies (MAbs) to *H. penaei*, according to the methods described in Bradley-Dunlop *et al.* (2004), are available for *H. penaei* detection.

4.8. Bioassay

Confirmation of infection with *H. penaei* may be accomplished by bioassay of suspect animals with SPF juvenile *P. vannamei* serving as the indicator of the intracellular bacteria (Aranguren *et al.*, 2010; Lightner, 2005). Oral protocols may be used. The oral method is relatively simple to perform and is accomplished by feeding chopped hepatopancreas of suspect shrimp to SPF juvenile *P. vannamei* in small tanks. The use of a negative control tank of indicator shrimp, which receive only a normal feed, is required. When the hepatopancreas feeding (*per os*) protocol is used to bioassay for *H. penaei*, positive indicator shrimp (by gross signs and histopathology) are typically apparent within 3–4 days of initial exposure, and significant mortalities occur by 3–8 days after initial exposure. The negative control shrimp must remain negative (for at least 10–15 days) for gross or histological signs of infection with *H. penaei* and unusual mortalities.

4.9. Antibody- or antigen-based detection methods

Serological tests are not applicable because shrimp are invertebrate animals that do not produce specific antibodies that could be used to demonstrate infection by or prior exposure to *H. penaei*.

4.10. Other methods

No scientifically confirmed reports.

5. Test(s) recommended for surveillance to demonstrate freedom in apparently healthy populations

Real-time PCR are the recommended test for surveillance to demonstrate freedom from infection with *H. penaei* in apparently healthy populations as described in Section 4.4.1 and 4.4.2.

6. Corroborative diagnostic criteria

This section only addresses the diagnostic test results for detection of infection in the absence (Section 6.1.) or in the presence of clinical signs (Section 6.2.) but does not evaluate whether the infectious agent is the cause of the clinical event.

The case definitions for a suspect and confirmed case have been developed to support decision making related to trade and confirmation of disease status at the country, zone or compartment level. Case definitions for disease confirmation in endemically affected areas may be less stringent. It is recommended that all samples that yield suspect positive test results in an otherwise pathogen-free country or zone or compartment should be referred immediately to the OIE Reference Laboratory for confirmation, whether or not clinical signs are associated with the case. If a laboratory does not have the capacity to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate OIE Reference Laboratory.

6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status ⁴

Apparently healthy populations may fall under suspicion, and therefore be sampled, if there is an epidemiological link(s) to an infected population. Geographical proximity to, or movement of animals or animal products or equipment, etc., from a known infected population equate to an epidemiological link. Alternatively, healthy populations are sampled in surveys to demonstrate disease freedom.

6.1.1. Definition of suspect case in apparently healthy animals

The presence of infection with *H. penaei* shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Positive result by real-time PCR
- ii) Positive result by conventional PCR

6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy animals

The presence of infection with *H. penaei* is considered to be confirmed if at least one of the following criteria is met:

⁴ For example transboundary commodities.

- i) Positive result by two different probe-based real-time PCR tests targeting different region of the *H. penaei* genome
- ii) Positive result by real-time PCR and conventional PCR targeting different region of the *H. penaei* genome and amplicon sequencing

Reference Laboratories should be contacted for specimen referral when testing laboratories cannot undertake any of the recommended test methods and testing is being undertaken that will result in notification to the OIE.

6.2. Clinically affected animals

Clinical signs are not pathognomonic for a single disease; however, they may narrow the range of possible diagnoses.

6.2.1. Definition of suspect case in clinically affected animals

The presence of infection with *H. penaei* shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Gross pathology or clinical signs consistent with *H. penaei* infection
- ii) Histopathology consistent with *H. penaei* infection
- iii) Positive result by real-time PCR
- iv) Positive result by conventional PCR
- v) Positive result by *in-situ* hybridisation

6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

The presence of infection with *H. penaei* is considered to be confirmed if at least at least one of the following criteria is met:

- i) A positive result by two different probe-based real-time PCR tests targeting different regions of the *H. penaei* genome
- ii) A positive result by real-time PCR and conventional PCR targeting different regions of the *H. penaei* genome and amplicon sequencing
- iii) Histopathology consistent with *H. penaei* and positive in-situ hybridisation test

Reference Laboratories should be contacted for specimen referral when testing laboratories cannot undertake any of the recommended test methods and testing is being undertaken that will result in notification to the OIE.

6.3. Diagnostic sensitivity and specificity for diagnostic tests

The diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis of infection with *H. penaei* are provided in Tables 6.3.1. and 6.3.2. This information can be used for the design of surveys for infection with *H. penaei*, however, it should be noted that diagnostic performance is specific to the circumstances of each diagnostic accuracy study (including the test purpose, source population, tissue sample types and host species) and diagnostic performance may vary under different conditions. Data are only presented where tests are validated to at least level 2 of the validation pathway described in Chapter 1.1.2. and the information is available within published diagnostic accuracy studies.

6.3.1. For presumptive diagnosis of clinically affected animals

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation

DSe = diagnostic sensitivity, DSp = diagnostic specificity, n = number of samples used in the study, PCR: = polymerase chain reaction, ND = Not determined.

6.3.2. For surveillance of apparently healthy animals

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation

DSe = diagnostic sensitivity, DSp = diagnostic specificity, n = number of samples used in the study, PCR = polymerase chain reaction.

7. References

- AGUIRRE-GUZMAN G., SANCHEZ-MARTINEZ J.G., PÉREZ-CASTAÑEDA R. & ORTA-RODRIGUEZ R. (2010). Detection of necrotizing hepatopancreatitis (NHP) in wild shrimp from Laguna Madre, Mexico by a multiplex polymerase chain reaction. *Thai J. Vet. Med.*, **40**, 337–341.
- ARANGUREN L.F., BRIÑEZ B., ARAGON L., PLATZ C., CARABALLO X., SUAREZ A. & SALAZAR M. (2006). Necrotizing hepatopancreatitis (NHP) infected *Penaeus vannamei* female broodstock: effect on reproductive parameters nauplii and larvae quality. *Aquaculture*, **258**, 337–343.
- ARANGUREN L.F. & DHAR ARUN K. (2018). Detection and quantification of *Hepatobacter penaei* bacteria (NHPB) by new PCR and real-time quantitative PCR assays. *Dis. Aquat. Org.*, **131**,: 49–57.
- ARANGUREN L.F., TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2010). Quantification of the bacterial agent of necrotizing hepatopancreatitis (NHP-B) by real-time PCR and comparison of survival and NHP load of two shrimp populations. *Aquaculture*, **307**, 187–192.
- AVILA-VILLA L.A., GOLLAS-GALVAN T., MARTINEZ-PORCHAS M., MENDOZA-CANO F. & HERNANDEZ-LOPEZ J. (2012). Experimental infection and detection of necrotizing hepatopancreatitis bacterium in the American lobster *Homarus americanus*. *Sci. World J.*, **2012**, 979381, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3356760/>
- BEKAVAC A., BECK A., DRAGIČEVIĆ P., DRAGUN Z., MAGUIRE I., IVANKOVIĆ D., FIKET Ž., GRAČAN R., HUDINA S. (2022). Disturbance in invasion? Idiopathic necrotizing hepatopancreatitis in the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) in Croatia. *J. Fish Dis.*, **45**, 261–276.
- BRADLEY-DUNLOP D.J., PANTOJA C. & LIGHTNER D.V. (2004). Development of monoclonal antibodies for detection of necrotizing hepatopancreatitis in penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **60**, 233–240.
- BRIÑEZ B., ARANGUREN F. & SALAZAR M. (2003). Fecal samples as DNA source for the diagnosis of necrotizing hepatopancreatitis (NHP) in *Penaeus vannamei* broodstock. *Dis. Aquat. Org.*, **55**, 69–72.
- CRABTREE B.G., ERDMAN M.M., HARRIS D.L. & HARRIS I.T. (2006). Preservation of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) by freezing tissue collected from experimentally infected *Litopenaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **70**, 175–179.
- DEL RÍO-RODRIGUEZ R.E., SOTO-RODRÍGUEZ S., LARA-FLORES M., CU-ESCAMILLA A.D. & GOMEZ-SOLANO M.I. (2006). A necrotizing hepatopancreatitis (NHP) outbreak in a shrimp farm in Campeche, Mexico: A first case report. *Aquaculture*, **255**, 606–609.
- FRELIER P.F., LOY J.K. & KRUPPENBACH B. (1993). Transmission of necrotizing hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei*. *J. Invertebr. Pathol.*, **61**, 44–48.
- FRELIER P.F., SIS R.F., BELL T.A. & LEWIS D.H. (1992). Microscopic and ultrastructural studies of necrotizing hepatopancreatitis in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) cultured in Texas. *Vet. Pathol.*, **29**, 269–277.
- GRACIA-VALENZUELA M.H., LUZ ANGELICA ÁVILA-VILLA L.A., GLORIA YEPIZ-PLASCENCIA G., HERNÁNDEZ-LÓPEZ J., MENDOZA-CANO F., GARCÍA-SANCHEZ G. & GOLLAS-GALVÁN T. (2011). Assessing the viability of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) stored at –20°C for use in forced-feeding infection of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture*, **311**, 105–109.
- IBARRA-GAMEZ J.C., GALAVÍZ-SILVA L. & MOLINA-GARZA Z.J. (2007). Distribution of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) in cultured white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, from Mexico. *Cienc. Mar.*, **33**, 1–9.

- KROL R.M., HAWKINS W.E. & OVERSTREET R.M. (1991). Rickettsial and mollicute infections in hepatopancreatic cells of cultured pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *J. Invertebr. Pathol.*, **57**, 362–370.
- LEYVA J.M., MARTINEZ-PORCHAS M., HERNANDEZ-LOPEZ J., VARGAS-ALBORES F. & T. GOLLAS-GALVAN (2018). Identifying the causal agent of necrotizing hepatopancreatitis in shrimp: Multilocus sequence analysis approach *Aquaculture Res.*, 1–8.
- LIGHTNER D.V. (ed.) (1996). A handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 304 p.
- LIGHTNER D.V. (2005). Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. *J. World Aquac. Soc.*, **36**, 229–248.
- LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1994). An epizootic of necrotizing hepatopancreatitis in cultured penaeid shrimp (Crustacea: Decapoda) in northwestern Peru. *Aquaculture*, **122**, 9–18.
- LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., PANTOJA C.R., TANG K.F.J., NOBLE B.L., SCHOFIELD P., MOHNEY L.L., NUNAN L.M. & NAVARRO S.A. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. *J. Invertebr. Pathol.*, **110**, 174–183.
- LOY J.K., DEWHIRST F.E., WEBER W., FRELIER P.F., GARBAR T.L., TASCIA S.I & TEMPLETON J.W. (1996). Molecular phylogeny and *in situ* detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in shrimp. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 3439–3445.
- LOY J.K. & FRELIER P.F. (1996). Specific, nonradioactive detection of the NHP bacterium in *Penaeus vannamei* by *in situ* hybridization. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **8**, 324–331.
- LOY J.K., FRELIER P.F., VARNER P. & TEMPLETON J.W. (1996). Detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in cultured *Penaeus vannamei* from Texas and Peru by polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, **25**, 117–122.
- MORALES-COVARRUBIAS M.S. (2010). Enfermedades del camarón. Detección mediante análisis en fresco e histopatología. Editorial Trillas, SA de CV., Av. Río Churubusco 385, Col. Pedro María Anaya, México, D.F. Segunda edición. ISBN: ISBN 978-607-17-0436-8. 1-180.
- MORALES-COVARRUBIAS M.S., OSUNA-DUARTE A.G., GARCIA-GASCA A., LIGHTNER D.V. & MOTA-URBINA J.C. (2006). Prevalence of necrotizing hepatopancreatitis in female broodstock of *Penaeus vannamei* with unilateral eyestalk ablation and hormone injection. *J. Aquat. Anim. Health*, **18**, 19–25.
- MORALES-COVARRUBIAS M.S., RUIZ-LUNA A., MOURA-LEMUS A.P., SOLÍS MONTIEL V.T. & CONROY G. (2011). Prevalencia de enfermedades de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) cultivado en ocho regiones de latinoamérica. *Rev. Cient. (Maracaibo)*, **XXI**, 434–446.
- NUNAN L.M., PANTOJA C.R., GOMEZ-JIMENEZ S. & LIGHTNER D.V. (2013). “*Candidatus* Hepatobacter penaei,” an intracellular pathogenic enteric bacterium in the hepatopancreas of the marine shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Appl. Environ. Microbiol.*, **79**, 1407–1409.
- VINCENT A.G., BRELAND V.M. & LOTZ J.M. (2004). Experimental infection of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* with necrotizing hepatopancreatitis (NHP) bacterium by *per os* exposure. *Dis. Aquat. Org.*, **61**, 227–233
- VINCENT A.G. & LOTZ J.M. (2005). Time course of necrotizing hepatopancreatitis (NHP) in experimentally infected *Litopenaeus vannamei* and quantification of NHP-bacterium using real-time PCR. *Dis. Aquat. Org.*, **67**, 163–169.
- VINCENT A.G. & LOTZ J.M. (2007). Effect of salinity on transmission of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) to Kona stock *Litopenaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **75**, 265–268.

*
* *

NB: There is an OIE Reference Laboratory for infection with *Hepatobacter penaei* (necrotising hepatopancreatitis)
(see Table at the end of this *Aquatic Manual* or consult the OIE web site for the most up-to-date list:
<https://www.oie.int/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>).

Please contact the OIE Reference Laboratories for any further information on infection with *Hepatobacter penaei* (necrotising hepatopancreatitis).

NB: FIRST ADOPTED IN 2012; MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2017.

[Volver al orden del día](#)

CHAPTER 2.2.4.

INFECTION WITH INFECTIOUS HYPODERMAL AND HAEMATOPOIETIC NECROSIS VIRUS

1. Scope

Infection with infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus means infection with the pathogenic agent infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV), Family *Parvoviridae*, subfamily *Hamaparvovirinae*, Genus *Penstylhamaparvovirus* with IHHNV (*Decapod penstylhamaparvovirus 1*) as the Type species (Penez *et al.*, 2020).

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent

IHHNV is the smallest of the known penaeid shrimp viruses. The virion is a 20–22 nm, non-enveloped icosahedron, with a density of 1.40 g ml⁻¹ in CsCl that contains linear single-stranded DNA with an estimated size of 3.9 kb, and has a capsid with four polypeptides of molecular weight 74, 47, 39, and 37.5 kD (Bonami *et al.*, 1990; Nunan *et al.*, 2000; GenBank NC_002190).

At least two distinct genotypes of IHHNV have been identified (Tang *et al.*, 2003): Type 1 is from the Americas and East Asia (principally the Philippines) and Type 2 is from South-East Asia. These genotypes are infectious to *Penaeus vannamei* and *P. monodon*. Two sequences homologous to part of the IHHNV genome are found embedded in the genome of penaeids. These were initially described as Type 3A from East Africa, India and Australia, and Type 3B from the western Indo-Pacific region including Madagascar, Mauritius and Tanzania (Tang & Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007). Tissues containing the IHHNV-homologous sequences (also known as endogenous viral elements; Taengchaiyaphum *et al.*, 2021) in the *P. monodon* genome are not infectious to susceptible host species (Lightner *et al.*, 2009; Tang & Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007).

2.1.2. Survival and stability in processed or stored samples

IHHNV is believed to be the most stable virus of the known penaeid shrimp viruses. Infected tissues remain infectious after repeated cycles of freeze–thawing and after storage in 50% glycerine (Lightner, 1996; Lightner *et al.*, 1987; Lightner *et al.*, 2009).

2.1.3. Survival and stability outside the host

No data.

For inactivation methods, see Section 2.4.5.

2.2. Host factors

2.2.1. Susceptible host species

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with IHHNV according to Chapter 1.5 of *Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code)* are: yellowleg shrimp (*Penaeus californiensis*), giant tiger prawn (*P. monodon*), northern white shrimp (*P. setiferus*), blue shrimp (*P. stylirostris*), and white leg shrimp (*P. vannamei*).

2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility

Species for which there is incomplete evidence to fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with IHHNV according to Chapter 1.5 of the *Aquatic Code* are: northern brown shrimp (*Penaeus aztecus*). Evidence is lacking for this species to either confirm that the identity of the pathogenic agent is IHHNV,

transmission mimics natural pathways of infection, or presence of the pathogenic agent constitutes an infection.

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results have been reported in the following organisms, but an active infection has not been demonstrated: giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*), northern pink shrimp (*Penaeus duorarum*), western white shrimp (*P. occidentalis*), kuruma prawn (*P. japonicus*), green tiger prawn (*P. semisulcatus*), *Hemigrapsus penicillatus*, Argentine stiletto shrimp (*Artemesia longinaris*), Cuata swimcrab (*Callinectes arcuatus*), Mazatlan sole (*Achirus mazatlanus*), yellowfin mojarra (*Gerres cinereus*), tilapias (*Oreochromis* sp.), Pacific piquitinga (*Lile stolifera*) and blackfin snook (*Centropomus medius*).

2.2.3. Likelihood of infection by species, host life stage, population or sub-populations

IHHNV has been detected in all life stages (i.e. eggs, larvae, postlarvae, juveniles and adults) of *P. vannamei*. Nauplii produced from infected broodstock have a high prevalence of infection with IHHNV (Motte *et al.*, 2003).

2.2.4. Distribution of the pathogen in the host

IHHNV targets gills, haematopoietic nodules and haemocytes, ventral nerve cord and ganglia, antennal gland tubule epithelial cells, lymphoid organ, parenchymal cells, connective tissue cells and ovaries (Chayaburakul, 2005; Lightner, 1996; Lightner & Redman, 1998).

2.2.5. Aquatic animal reservoirs of infection

Some members of *P. stylirostris* and *P. vannamei* populations that survive IHHNV infection may carry the virus subclinically and infect their progeny or other populations by vertical and horizontal transmission (Bell & Lightner, 1984; Lightner, 1996; Motte *et al.*, 2003).

2.2.6. Vectors

IHHNV was found in wild crabs (*Hemigrapsus penicillatus*, *Neohelice granulata*), but there were no clinical signs. Adults of *Macrobrachium rosenbergii* are carriers of IHHNV without apparent signs. Although the mussel *Mytilus edulis* is an important reservoir of IHHNV (Wei *et al.*, 2017), its capacity to transmit virus is unknown.

2.3. Disease pattern

2.3.1. Mortality, morbidity and prevalence

The effects of infection with IHHNV varies among shrimp species and populations, where infections can be either acute or chronic. For example, in unselected populations of *P. stylirostris*, infection with IHHNV results in acute, usually catastrophic, disease with mortalities approaching 100%. In contrast, in populations of *P. vannamei*, some selected lines of *P. stylirostris*, and some populations of *P. monodon*, infection with IHHNV results in a more subtle, chronic disease, runt-deformity syndrome (RDS), in which high mortalities are unusual, but where growth suppression and cuticular deformities are common (Kalagayan *et al.*, 1991; Sellars *et al.*, 2019).

Infection with IHHNV interferes with normal egg, larval, and postlarval development. When broodstock are used from wild or farmed stocks where the disease is enzootic, hatching success of eggs may be reduced, and survival and culture performance of the larval and postlarval stages lowered (Motte *et al.*, 2003).

In the past, stocks of *P. stylirostris*, juveniles, subadults, and adults showed persistently high mortality rates due to infection with IHHNV. However, selected lines of *P. stylirostris* do not show mortality and appear to be tolerant to this virus. *Penaeus vannamei* and *P. monodon* stocks infected with IHHNV show poor and highly disparate growth and cuticular deformities, particularly bent rostrums and deformed sixth abdominal segments (Jagadeesan *et al.*, 2019; Sellars *et al.*, 2019).

In regions where the virus is enzootic in wild stocks, the prevalence of IHHNV has been found in various surveys to range from 0 to 100%. Some reported mean values for IHHNV prevalence in wild stocks are: 26% and 46% in *P. stylirostris* in the lower and upper Gulf of California, respectively (Pantoja *et al.*, 1999); 100% and 57%, respectively, in adult female and adult male *P. stylirostris* from the mid-region of the Gulf of California (Morales-Covarrubias *et al.*, 1999); 28% in wild *P. vannamei* collected from the Pacific coast of Panama (Nunan *et al.*, 2001); from 51 to 63% in *P. vannamei* collected from the Pacific coasts of Ecuador, Colombia and Panama (Motte *et al.*, 2003), and from 6 to 63% in *P. vannamei*

broodstock and 49.5% in post-larvae from Mexico (Fernando *et al.*, 2016). In farms where IHNV is present, its prevalence can range from very low to 100%, but high prevalence is typical (Aly *et al.*, 2021; Chayaburakul *et al.*, 2004; Lightner, 1996; Lightner *et al.*, 1983).

2.3.2. Clinical signs, including behavioural changes

Certain cuticular deformities, specifically a deformed rostrum bent to the left or right, which may be presented by *P. vannamei* and *P. stylirostris* with RDS, are indicative of infection with IHNV (see Section 2.3.3 *Gross pathology: Infection with IHNV in Penaeus vannamei*). However, this clinical sign is not always apparent in shrimp populations chronically infected with IHNV.

In acute disease, *P. stylirostris* may present behavioural changes (see Section 2.3.3 *Gross pathology: Infection with IHNV in Penaeus stylirostris*) but with RDS, no consistent behavioural changes have been reported for affected shrimp.

2.3.3. Gross pathology

Infection with IHNV in Penaeus stylirostris

Infection with IHNV may result in acute disease with very high mortalities in juveniles. Vertically infected larvae and early postlarvae do not become diseased, but in approximately 35-day-old or older juveniles, gross signs of the disease may be observed, followed by mass mortalities. In horizontally infected juveniles, the incubation period and severity of the disease is somewhat size- or age-dependent, with young juveniles always being the most severely affected. Infected adults seldom show signs of the disease or mortalities (Bell & Lightner, 1984; 1987; Lightner, 1996; Lightner *et al.*, 1983). Gross signs are non-specific, but juvenile *P. stylirostris* with acute infection with IHNV show a marked reduction in food consumption, followed by changes in behaviour and appearance. Shrimp of this species infected with IHNV have been observed to rise slowly in culture tanks to the water surface, where they become motionless and then roll-over and slowly sink (ventral side up) to the tank bottom. Shrimp exhibiting this behaviour may repeat the process for several hours until they become too weak to continue, or until they are attacked and cannibalised by their healthier siblings. *Penaeus stylirostris* at this stage of infection often have white or buff-coloured spots (which differ in appearance and location from the white spots that sometimes occur in shrimp with WSSV infections) in the cuticular epidermis, especially at the junction of the tergal plates of the abdomen, giving such shrimp a mottled appearance. This mottling later fades in moribund *P. stylirostris* and individuals become more bluish. In *P. stylirostris* and *P. monodon* with terminal-phase infection with IHNV, moribund shrimp are often distinctly bluish in colour, with opaque abdominal musculature (Lightner *et al.*, 1983).

Infection with IHNV in Penaeus vannamei

RDS, a chronic form of infection with IHNV, occurs in *P. vannamei*. The severity and prevalence of RDS in infected populations of juvenile or older *P. vannamei* may be related to infection during the larval or early postlarval stages. RDS has also been reported in cultured stocks of *P. stylirostris* and *P. monodon*. Juvenile shrimp with RDS may display a bent (45° to 90° bend to left or right) or otherwise deformed rostrum, a deformed sixth abdominal segment, wrinkled antennal flagella, cuticular roughness, 'bubble-heads', and other cuticular deformities. Populations of juvenile shrimp with RDS display disparate growth with a wide distribution of sizes and many smaller than expected ('runted') shrimp. The coefficient of variation (CV = the standard deviation divided by the mean of different size groups within a population) for populations with RDS is typically greater than 30% and may approach 90%, while populations of juvenile *P. vannamei* and *P. stylirostris* free from infection with IHNV (and thus RDS-free) usually show CVs of 10–30% (Lightner, 1996; Primavera & Qunitio, 2000).

2.3.4. Modes of transmission and life cycle

Transmission of IHNV can be by horizontal or vertical. Horizontal transmission has been demonstrated by cannibalism or by contaminated water (Lightner, 1996; Lightner *et al.*, 1983), and vertical transmission via infected eggs (Motte *et al.*, 2003).

2.3.5. Environmental factors

The replication rate of IHNV at high water temperatures was significantly reduced in a study in which viral replication was compared in *P. vannamei* experimentally infected and held at 24°C and 32°C. After a suitable incubation period, shrimp held at 32°C had approximately 10² times lower viral load than shrimp held at 24°C (Montgomery-Brock *et al.*, 2007).

2.3.6. Geographical distribution

Infection with IHNV has been reported from cultured shrimp in most of the major shrimp-culturing regions of the world including Asia, Oceania, North and South America and the Middle East.

IHNV homologous sequences have been found within the genome of *P. monodon* from East Africa, Australia, and the western Indo-Pacific region (Tang & Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007). These sequences do not represent viral DNA (refer Section 2.1.1 *Aetiological agent*).

See OIE WAHIS (<https://wahis.oie.int/#/home>) for recent information on distribution at the country level.

2.4. Biosecurity and disease control strategies

2.4.1. Vaccination

None available.

2.4.2. Chemotherapy including blocking agents

No scientifically confirmed reports.

2.4.3. Immunostimulation

No scientifically confirmed reports.

2.4.4. Breeding resistant strains

Selected stocks of *P. stylirostris* that are resistant to infection with IHNV have been developed and these have had some successful application in shrimp farms (Lightner, 1996). However, lines of *P. stylirostris* bred for resistance to infection with IHNV (Tang *et al.*, 2000) do not have increased resistance to other diseases, such as white spot syndrome virus (WSSV), so their use has been limited. In some stocks a genetic basis for IHNV susceptibility in *P. vannamei* has been reported (Alcivar-Warren *et al.*, 1997).

2.4.5. Inactivation methods

IHNV is a stable shrimp virus; infected tissues remain infectious after repeated cycles of freeze–thawing and after storage in 50% glycerine (Lightner, 1996; Lightner *et al.*, 2009).

2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

IHNV is transmitted vertically by the transovarian route (Motte *et al.*, 2003). Disinfection of eggs and larvae is good management practice (Chen *et al.*, 1992) that may reduce IHNV contamination of spawned eggs and larvae but is not effective for preventing transovarian transmission of IHNV (Motte *et al.*, 2003).

2.4.7. General husbandry

Some husbandry practices have been successful in preventing the spread of IHNV. Among these has been the application of PCR pre-screening of wild or pond-reared broodstock or their spawned eggs/nauplii and discarding those that test positive for the virus (Motte *et al.*, 2003), as well as the development of specific pathogen-free (SPF) shrimp stocks of *P. vannamei* and *P. stylirostris* (Lightner, 2005). The latter has proven to be the most successful husbandry practice for the prevention and control of infection with IHNV (Lightner, 2005).

3. Specimen selection, sample collection, transportation and handling

This section draws on information in Sections 2.2, 2.3 and 2.4 to identify populations, individuals and samples that are most likely to be infected.

3.1. Selection of populations and individual specimens

Infection with IHNV may be below detection limits in spawned eggs and larval stages, so these life stages are not suitable for surveillance to demonstrate freedom from infection with IHNV.

3.2. Selection of organs or tissues

IHHNV infects tissues of ectodermal and mesodermal origin. The principal target tissues for IHHNV include connective tissue cells, the gills, haematopoietic nodules and haemocytes, ventral nerve cord and ganglia, antennal gland tubule epithelial cells, and lymphoid organ parenchymal cells (Lightner, 1996; Lightner & Redman, 1998). Hence, whole shrimp (e.g. larvae or postlarvae) or tissue samples containing the aforementioned target tissues are suitable for most tests using molecular methods.

3.3. Samples or tissues not suitable for pathogen detection

Enteric tissues (e.g. the hepatopancreas, the midgut or its caeca) are inappropriate samples for detection of IHHNV (Lightner, 1996; Lightner & Redman, 1998). Shrimp eyes contain PCR inhibitors and their use should be avoided.

3.4. Non-lethal sampling

Haemolymph or excised pleopods may be collected and used for testing when non-lethal testing of valuable broodstock is necessary (Lightner, 1996; Lightner & Redman, 1998).

3.5. Preservation of samples for submission

For routine histology or molecular assays, and guidance on preservation of samples for the intended test method see Chapter 2.2.0.

3.5.1. Samples for pathogen isolation

The success of pathogen isolation and results of bioassay depend strongly on the quality of samples (time since collection and time in storage). Fresh specimens should be kept on ice and preferably sent to the laboratory within 24 hours of collection. To avoid degradation of samples, use alternative storage methods only after consultation with the receiving laboratory.

3.5.2. Preservation of samples for molecular detection

Standard sample collection, preservation and processing methods for histological techniques can be found in Section B.2.5 of Chapter 2.2.0 *General information* (diseases of crustaceans).

3.5.3. Samples for histopathology, immunohistochemistry or *in-situ* hybridisation

Standard sample collection, preservation and processing methods for histological techniques can be found in Section B.2.2 of Chapter 2.2.0 *General information* (diseases of crustaceans).

3.5.4. Samples for other tests

Not relevant.

3.6. Pooling of samples

Pooling of samples from more than one individual animal for a given purpose should only be recommended where robust supporting data on diagnostic sensitivity and diagnostic specificity have been evaluated and found to be suitable. The effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been thoroughly evaluated, therefore, larger shrimp should be processed and tested individually. Small life stages such as PL can be pooled to obtain the minimum amount of material for virus isolation or molecular detection.

4. Diagnostic methods

The methods currently available for pathogen detection that can be used in i) surveillance of apparently healthy animals, ii) presumptive diagnosis in clinically affected animals and iii) confirmatory diagnostic purposes are listed in Table 4.1. by animal life stage.

Ratings for purposes of use. For each recommended assay a qualitative rating for the purpose of use is provided. The ratings are determined based on multiple performance and operational factors relevant to application of an assay for a defined purpose. These factors include appropriate diagnostic performance characteristics, level of assay validation, availability cost, timeliness, and sample throughput and operability. For a specific purpose of use, assays are rated as:

- +++ = Methods are most suitable with desirable performance and operational characteristics.
- ++ = Methods are suitable with acceptable performance and operational characteristics under most circumstances.
- + = Methods are suitable, but performance or operational characteristics may limit application under some circumstances.
- Shaded boxes = Not appropriate for this purpose.

Validation stage. The validation stage corresponds to the assay development and validation pathway in chapter 1.1.2. The validation stage is specific to each purpose of use. Where available, information on the diagnostic performance of recommended assays is provided in Section 6.3.

OIE Reference Laboratories welcome feedback on diagnostic performance of recommended assays, in particular PCR methods. Of particular interest are any factors affecting expected assay sensitivity (e.g. tissue components inhibiting amplification) or expected specificity (e.g. failure to detect particular genotypes, detection of homologous sequences within the host genome). These issues should be communicated to the OIE Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

Table 4.1. OIE recommended diagnostic methods and their level of validation for surveillance of apparently healthy animals and investigation of clinically affected animals

Method	7. Surveillance of apparently healthy animals				8. Presumptive diagnosis of clinically affected animals				9. Confirmatory diagnosis ¹ of a suspect result from surveillance or presumptive diagnosis			
	Early life stages ²	Juveniles ²	Adults	LV	Early life stages ²	Juveniles ²	Adults	LV	Early life stages ²	Juveniles ²	Adults	LV
Wet mounts												
Histopathology						++	++	NA		++	++	NA
Cell culture												
Real-time PCR	++	+++	+++	1	++	+++	+++	1	++	++	++	1
Conventional PCR	+	++	++	1	++	++	++	1	++	++	++	1
Amplicon sequencing									+++	+++	+++	1
<i>In-situ</i> hybridisation						+	+	1		++	++	1
Bioassay												
LAMP												
Ab-ELISA												
Ag-ELISA												
Other antigen detection methods ³												
Other methods ³												

LV = level of validation, refers to the stage of validation in the OIE Pathway (chapter 1.1.2); NA = not available; PCR = polymerase chain reaction;

LAMP = loop-mediated isothermal amplification; Ab- or Ag-ELISA = antibody or antigen enzyme-linked immunosorbent assay, respectively.

¹For confirmatory diagnoses, methods need to be carried out in combination (see Section 6). ²Susceptibility of early and juvenile life stages is described in Section 2.2.3.

³Specify the test used. Shading indicates the test is inappropriate or should not be used for this purpose.

4.1. Wet mounts

No reliable methods have been developed for direct microscopic pathology.

4.2. Histopathology and cytopathology

Presumptive acute infections in *P. stylirostris* can be readily diagnosed using routine haematoxylin and eosin (H&E) stained sections whereas chronic infection are much more difficult to diagnose using these staining methods. For diagnosis of chronic infections and confirmation of acute infections however, the use of molecular methods is required for IHHNV detection (e.g. by PCR or application of IHHNV-specific DNA probes to dot-blot hybridisation tests or *in-situ* hybridisation [ISH] of histological sections).

Histological demonstration of prominent intranuclear, Cowdry type A inclusion bodies provides a provisional diagnosis of infection with IHHNV. These characteristic IHHNV inclusion bodies are eosinophilic and often haloed (with H&E stains of tissues preserved with fixatives that contain acetic acid, such as Davidson's AFA and Bouin's solution) (Bell & Lightner, 1988; Lightner, 1996), intranuclear inclusion bodies within chromatin-margined, hypertrophied nuclei of cells in tissues of ectodermal (epidermis, hypodermal epithelium of fore- and hindgut, nerve cord and nerve ganglia) and mesodermal origin (haematopoietic organs, antennal gland, gonads, lymphoid organ, and connective tissue). Intranuclear inclusion bodies caused by infection with IHHNV may be easily confused with developing intranuclear inclusion bodies caused by WSSV infection. ISH assay (see Section 4.6 *In-situ hybridisation*) of such sections with a DNA probe specific to IHHNV provides a definitive diagnosis of infection with IHHNV (Lightner, 1996a; 2011; Lightner & Redman, 1998a).

The use of Davidson's fixative (containing 33% ethyl alcohol [95%], 22% formalin [approximately 37% formaldehyde], 11.5% glacial acetic acid and 33.5% distilled or tap water) is highly recommended for all routine histological studies of shrimp (Bell & Lightner, 1988; Lightner, 1996a). To obtain the best results, dead shrimp should not be used. Only live, moribund, or compromised shrimp should be selected for fixation and histological examination. Selected shrimp are killed by injection of fixative directly into the hepatopancreas; the cuticle over the cephalothorax and abdomen just lateral to the dorsal midline is opened with fine-pointed surgical scissors to enhance fixative penetration (the abdomen may be removed and discarded), the whole shrimp (or cephalothorax) is immersed in fixative for 24 to 48 hours, and then transferred to 70% ethyl alcohol for storage. After transfer to 70% ethyl alcohol, fixed specimens may be transported by wrapping in cloth or a paper towel saturated with 70% ethyl alcohol and packed in leak-proof plastic bags.

4.3. Cell culture for isolation

IHHNV has not been grown *in vitro*. No crustacean cell lines exist.

4.4. Nucleic acid amplification

There are multiple geographical variants of IHHNV, some of which are not detected by all of the available methods. Two primer sets, 392F/R and 389F/R, are the most suitable for detecting all the known genetic variants of IHHNV (Tang *et al.*, 2000; 2007). However, these tests also detect non-infectious endogenous viral elements (EVE) within the *P. monodon* genome (previously known as types 3A and 3B), which are inserted into the genome of certain stocks of *P. monodon* from the western Indo-Pacific, East Africa, Australia and India (Saksmerprom *et al.*, 2011; Tang & Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007). As these PCR methods may result in positive test results in uninfected *P. monodon*, positive results should be confirmed by a method that detects IHHNV but not the IHHNV-related EVEs.

PCR primers have been developed that can detect the IHHNV sequence but do not amplify IHHNV-related EVEs present in the *P. monodon* stocks from Africa, Australia (Tang *et al.*, 2007), or Thailand (Saksmerprom *et al.*, 2011). Primer set 309F/R amplifies only a genomic segment of IHHNV types 1 and 2 (the infectious forms of IHHNV), but not the non-infectious EVEs within the *P. monodon* genome (Tang & Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007). Primer set MG831F/R reacts only with non-infectious EVEs within the *P. monodon* genome (Tang *et al.*, 2007). Hence, confirmation of unexpected positive or negative PCR results for IHHNV with a second primer set, or use of another diagnostic method (i.e. histology, bioassay, ISH) is highly recommended.

4.4.1. Real-time PCR

The following controls should be run with each assay: negative extraction control; positive control; no template control; internal PCR control.

Real-time PCR methods have been developed for the detection of IHNV (Dhar *et al.*, 2001; Tang & Lightner, 2001). A highly sensitive SYBR Green real-time PCR targeting a segment of the IHNV genome that is less susceptible to endogenisation was developed (Encinas-Garcia *et al.*, 2015). More recently, a TaqMan real-time assay capable of differentiating endogenous virus element from infectious form of IHNV in *P. monodon* has been reported (Cowley *et al.*, 2018). The real-time PCR method using TaqMan chemistry described below for IHNV generally follows the method used in Tang & Lightner (2001).

- i) The PCR primers and TaqMan probe are selected from a region of the IHNV genomic sequence (GenBank AF218266) that encodes for a non-structural protein. The upstream (IHNV1608F) and downstream (IHNV1688R) primer sequences are: 5'-TAC-TCC-GGA-CAC-CCA-ACC-A-3' and 5'-GGC-TCT-GGC-AGC-AAA-GGT-AA-3', respectively. The TaqMan probe 5'-ACC-AGA-CAT-AGA-GCT-ACA-ATC-CTC-GCC-TAT-TTG-3', is synthesised and labelled with FAM on the 5' end and TAMRA on the 3' end.
- ii) Preparation of DNA template: DNA extracted from tissues or haemolymph that was preserved in 95% ethanol and then dried. A control consisting of tissues or haemolymph from known negative animals should be included during the DNA extraction step. The DNA can be extracted by a variety of methods. Commercial DNA extraction kits include QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), MagMax™ Nucleic Acid kits (Life Technologies), or Maxwell® 16 Cell LEV DNA Purification Kit (Promega), or DNazol (Life Technologies). Spectrophotometric readings of the final DNA will indicate the purity of the DNA and the amount of total DNA extracted from the sample.
- iii) The real-time PCR reaction mixture contains: TaqMan Fast virus 1-step Master Mix (Life Technologies, or commercially-available equivalent reagents), 0.3 µM of each primers, 0.15 µM of TaqMan probe, 5–50 ng DNA, and water in a reaction volume of 20 µl. For optimal results, the reaction mixture should be vortexed and mixed well.
- iv) The cycling profile is: initial denaturation of 20 seconds at 95°C, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 1 second and annealing/extension at 60°C for 20 seconds.

4.4.2. Conventional PCR

The following controls should be run with each assay: negative extraction control; positive control; no template control; internal PCR control.

Several one-step PCR methods (Krabetsve *et al.*, 2004; Nunan *et al.*, 2000; Shike *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2000; 2007), and a number of commercial PCR kits are available for IHNV detection. Nested methods are also available.

Table 4.4.2.1. Recommended primer sets for one-step PCR detection of IHNV

Primer	Product	Sequence (5'-3')	G+C%/Temp.	GenBank & References	Specificity
389F	389 bp	CGG-AAC-ACA-ACC-CGA-CTT-TA	50%/72°C	AF218266	All genetic variants of IHNV <u>and</u> IHNV-related EVEs
389R		GGC-CAA-GAC-CAA-AAT-ACG-AA	45%/71°C	(Tang <i>et al.</i> , 2007)	
77012F	356 bp	ATC-GGT-GCA-CTA-CTC-GGA	50%/68°C	AF218266	Not given in the reference
77353R		TCG-TAC-TGG-CTG-TTC-ATC	55%/63°C	(Nunan <i>et al.</i> , 2000)	
392F	392 bp	GGG-CGA-ACC-AGA-ATC-ACT-TA	50%/68°C	AF218266	All genetic variants of IHNV <u>and</u> IHNV-related EVEs
392R		ATC-CGG-AGG-AAT-CTG-ATG-TG	50%/71°C	(Tang <i>et al.</i> , 2000)	
309F	309 bp	TCC-AAC-ACT-TAG-TCA-AAA-CCA-A	36%/68°C	AF218266	IHNV <u>but not</u> IHNV-related EVEs
309R		TGT-CTG-CTA-CGA-TGA-TTA-TCC-A	40%/69°C	(Tang <i>et al.</i> , 2007)	
MG831F	831 bp	TTG-GGG-ATG-CAG-CAA-TAT-CT	45%/58°C	DQ228358	IHNV-related EVEs <u>but not</u> IHNV
MG831R		GTC-CAT-CCA-CTG-ATC-GGA-CT	55%/62°C	(Tang <i>et al.</i> , 2007)	

NOTE: Primers 389F/R and 392F/R described above are from the nonstructural protein-coding region of the IHHNV genome. Primers 77012F/77353R are from a region in between the nonstructural and capsid protein-coding region of the genome. In the event that results are ambiguous using the 389F/R 'universal' primer set, it is recommended to use primers from a different region of the genome for confirmatory testing. In this case, that would mean using primers 77012F/77353R or the 392F/R primer sets and follow up with sequencing of PCR amplicons for confirmation.

General PCR method for IHHNV: the PCR method described below for IHHNV generally follows the methods outlined in Tang *et al.* (2007) and Nunan *et al.* (2000). However, recent minor modifications including the sources of the reagents and the use of an automated DNA extraction instrument are acceptable. The modifications include DNA extraction method, choice of primers (Table 4.4.2.1), and the volume of reaction. These slightly modified methods have been validated in accordance with Chapter 1.1.2 *Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases* and do not affect the diagnostic performance of the assay.

- i) Use as a template, the extraction of DNA templates is the same as that described above. Use 1–5 µl of extracted DNA as a template per 25 µl reaction volume.
- ii) The following controls should be included in every PCR assay for IHHNV: (a) DNA from a known negative tissue sample; (b) DNA from a known positive sample (either from tissue or haemolymph or from a plasmid clone that contains the fragment that the specific set of primers amplifies; and (c) a 'no template' control.
- iii) Use as primers, primers 389F and 389R, which elicit a band 389 bp in size from IHHNV-infected material, or primers 77012F and 77353R, which elicit a band 356 bp in size from IHHNV-infected material. Prepare primers at 10 µM in distilled water.
- iv) If PuReTaq™ Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare) are used, the PCR profile involves a 3–5 minutes at 95°C to denature DNA followed by 35 cycles of 95°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds, and final extension at 72°C for 5 minutes.
- v) Prepare a 'Master Mix' consisting of water and primers.
- vi) For a 25 µl reaction mix, add 24 µl Master Mix to each tube and then add 1 µl of the DNA template to be tested.
- vii) Vortex each tube, spin quickly to bring down all liquid. Insert tubes into the thermal cycler and start the PCR program.
- viii) After PCR, run 6–10 µl of the sample in a 1.5% agarose gel (containing SYBR™ Safe (Thermo Fisher Scientific) or equivalent to stain the DNA). Look for the 389 bp band (if using primers 389F and 389R) or for the 356 bp band (if using primers 77012F and 77353R). Bands are not always seen, as it is necessary to have at least 10 ng DNA µl⁻¹ to see DNA in a gel. A direct sequencing of amplified products can be performed through gel extraction of a PCR band with correct size and the sequencing primer(s) used for amplification to confirm the presence of IHHNV.

4.4.3. Other nucleic acid amplification methods

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays and real-time isothermal recombinase polymerase amplification (RPA) assay are available to detect and confirm IHHNV infection (Arunrut *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2006; Xia *et al.*, 2015), however, they are currently not recommended as they are not sufficiently validated.

4.5. Amplicon sequencing

PCR products may be directly sequenced or cloned and sequenced when necessary to confirm infection with IHHNV, to identify false positives or nonspecific amplification, or to distinguish the amplified products from the infectious form of the virus and demonstrate the presence of the non-infectious IHHNV-related EVEs in the host genome (Tang & Lighter, 2006).

4.6. *In-situ* hybridisation

Direct detection methods using DNA probes specific for IHHNV are available in dot-blot and ISH formats. The ISH method uses a DIG-labelled DNA probe for IHHNV and generally follows the methods outlined in Mari *et al.* (1993) and Lightner (1996).

Gene probe and PCR methods provide greater diagnostic specificity and sensitivity than traditional techniques that employ classic histological approaches. Furthermore, these methods have the added advantage of being applicable to non-lethal testing of valuable broodstock shrimp. A haemolymph sample may be taken with a tuberculin syringe, or an appendage (a pleopod for example) may be biopsied (Bell *et al.*, 1990), and used as the sample for a dot-blot hybridisation test.

4.7. Immunohistochemistry

Not relevant.

4.8. Bioassay

If SPF shrimp are available, the following bioassay method is based on Tang *et al.* (2000), is suitable for IHHNV diagnosis.

- i) For bioassay, feed the minced shrimp tissue suspected of being infected with IHHNV to the indicator shrimp species (e.g. SPF *P. vannamei* and *P. stylirostris* at the PLs or juvenile stage) at 10% of their body weight twice daily for 1 days.
- ii) For the following, the indicator shrimp were maintained on a pelletised ration.
- iii) Examine moribund shrimp grossly or by using the methods described above. There may be no apparent mortality during the experimental period.
- iv) If at 30 days after feeding there are still no moribund shrimp and all test results are negative, then it is safe to conclude that the bioassay results are negative.

Known IHHNV positive and negative control groups should be included in the bioassay.

4.9. Antibody- or antigen-based detection methods

None has been successfully developed.

4.10. Other methods

Not available.

5. Test(s) recommended for surveillance to demonstrate freedom in apparently healthy populations

Conventional PCR and/or real-time PCR are the recommended test for surveillance to demonstrate freedom from infection with IHHNV in apparently healthy populations as described in Sections 4.4.1 and 4.4.2.

6. Corroborative diagnostic criteria

This section only addresses the diagnostic test results for detection of infection in the absence (Section 6.1.) or in the presence of clinical signs (Section 6.2.) but does not evaluate whether the infectious agent is the cause of the clinical event.

The case definitions for a suspect and confirmed case have been developed to support decision making related to trade and confirmation of disease status at the country, zone or compartment level. Case definitions for disease confirmation in endemically affected areas may be less stringent. It is recommended that all samples that yield suspect positive test results in an otherwise pathogen-free country or zone or compartment should be referred immediately to the OIE Reference Laboratory for confirmation, whether or not clinical signs are associated with the case. If a laboratory does not have the capacity to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate OIE Reference Laboratory.

6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status⁵

Apparently healthy populations may fall under suspicion, and therefore be sampled, if there is an epidemiological link(s) to an infected population. Geographical proximity to, or movement of animals or animal products or equipment, etc., from a known infected population equate to an epidemiological link. Alternatively, healthy populations are sampled in surveys to demonstrate disease freedom.

6.1.1. Definition of suspect case in apparently healthy animals

The presence of infection with IHHNV shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Positive result by conventional PCR
- ii) Positive result by real-time PCR

6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy animals

The presence of infection with IHHNV is considered to be confirmed if at least one of the following criteria is met:

- i) Positive result by real-time PCR and conventional PCR targeting non-overlapping regions of the viral genome and amplicon sequencing
- ii) Histopathology consistent with IHHNV infection coupled with *in-situ* hybridisation and detection of IHHNV by real-time PCR
- iii) Histopathology consistent with IHHNV infection coupled with *in-situ* hybridisation and detection of IHHNV by conventional PCR and amplicon sequencing

Reference Laboratories should be contacted for specimen referral when testing laboratories cannot undertake any of the recommended test methods and testing is being undertaken that will result in notification to the OIE.

6.2 Clinically affected animals

Clinical signs are not pathognomonic for a single disease; however they may narrow the range of possible diagnoses.

6.2.1. Definition of suspect case in clinically affected animals

The presence of infection with IHHNV shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Gross pathology or clinical signs associated with the disease as described in this chapter, with or without elevated mortality
- ii) Positive result by conventional PCR
- iii) Positive result by real-time PCR
- iv) Histopathology consistent with IHHNV infection
- v) Positive result by *in-situ* hybridisation

6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

The presence of infection with IHHNV is considered to be confirmed if at least one of the following criteria is met:

- i) Positive result by real-time PCR and conventional PCR targeting a non-overlapping region of the genome and amplicon sequencing
- ii) Histopathological changes characteristic of infection with IHHNV with a positive result by *in-situ* hybridisation and detection of IHHNV by real-time PCR

⁵ For example transboundary commodities.

- iii) Histopathological changes characteristic of infection with IHNV or positive result by *in-situ* hybridisation and detection of IHNV by conventional PCR and amplicon sequencing

Reference Laboratories should be contacted for specimen referral when testing laboratories cannot undertake any of the recommended test methods and testing is being undertaken that will result in notification to the OIE.

6.3. Diagnostic sensitivity and specificity for diagnostic tests [under study]

The diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis of infection with IHNV is provided in Table 6.3.1. This information can be used for the design of surveys for infection with IHNV, however, it should be noted that diagnostic performance is specific to the circumstances of each diagnostic accuracy study (including the test purpose, source population, tissue sample types and host species) and diagnostic performance may vary under different conditions. Data are only presented where tests are validated to at least level two of the validation pathway described in Chapter 1.1.2 and the information is available within published diagnostic accuracy studies.

6.3.1. For presumptive diagnosis of clinically affected animals

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation

10. DSe = diagnostic sensitivity, DSp = diagnostic specificity, *n* = number of samples used in the study, PCR: = polymerase chain reaction.

6.3.2. For surveillance of apparently healthy animals

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation

11. DSe = diagnostic sensitivity, DSp = diagnostic specificity, *n* = number of samples used in the study, PCR: = polymerase chain reaction.

7. References

ALY S.M., MANSOUR S.M., THABET R.Y. & MABROK M. (2021). Studies on infectious myonecrosis virus (IMNV) and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) in cultured penaeid shrimp in Egypt. *Dis. Aquat. Org.*, **143**, 57–67.

ARUNRUT N., PROMBUN P., SAKSMERPROME V., FLEGEL T. W. & KIATPATHOMCHAI W. (2011). Rapid and sensitive detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *J. Virol. Methods*, **171**, 21–25.

BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1984). IHNV virus: infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, **38**, 185–194.

BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1987). IHNV disease of *Penaeus stylirostris*: effects of shrimp size on disease expression. *J. Fish Dis.*, **10**, 165–170.

BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1988). A Handbook of Normal Shrimp Histology. Special Publication No. 1, World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 114 pp.

BONAMI J.R., TRUMPER B., MARI J., BREHELIN M. & LIGHTNER D.V. (1990). Purification and characterization of IHNV virus of penaeid shrimps. *J. Gen. Virol.*, **71**, 2657–2664.

CHAYABURAKUL K., LIGHTNER D.V., SRIURAIRATTANA S., NELSON K.T. & WITHYACHUMNARNKUL B. (2005). Different responses to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) in *Penaeus monodon* and *P. vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **67**, 191–200.

- CHAYABURAKUL K., NASH G., PRATANPIPAT P., SRIURARAIATANA S. & WITHYACHUMNARNKUL B. (2004). Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand. *Dis. Aquat. Org.*, **60**, 89–96.
- CHEN S.N., CHANG P.S. & KOU G.H. (1992). Infection route and eradication of *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) in larval giant tiger prawns, *Penaeus monodon*. In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States, Fulks W. & Main K.L., eds. Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 177–184.
- COWLEY J.A., RAO M., COMAN G.J. & COWLEY J. (2018). Real-time PCR tests to specifically detect Infectious hypodermal and haemopoietic necrosis virus (IHHNV) lineages and an IHHNV endogenous viral element (EVE) integrated in the genome of Black Tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Dis. Aquat. Org.*, **129**, 145–158.
- DHAR A.K., ROUX M.M. & KLIMPEL K.R. (2001). Detection and quantification of Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and White spot virus in shrimp using real-time quantitative PCR and SYBR green chemistry. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 2835–2845.
- ENCINAS-GARCIA T., MENDOZA-CANO F., ENRÍQUEZ-ESPINOZA T., LUKEN-VEGA L., VICHIDO-CHÁVEZ R. & SANCHEZ-PAZ A. (2015). An improved validated SYBR green-based real-time quantitative PCR assay for the detection of the *Penaeus stylirostris* densovirus in penaeid shrimp. *J. Virol. Methods*, **212**, 53–58.
- FERNANDO M.C., ENRIQUEZ-ESPINOZA T., VALENZUELA-CASTILLO A., ENCINAS-GARCIA T. & SANCHEZ-PAZ A. (2016). High Occurrence of the Decapod Penstyldensovirus (PstDV1) Detected in Postlarvae of *Penaeus vannamei* Produced in Commercial Hatcheries of Mexico. *EcoHealth*. **13**, 591–596.
- JAGADEESAN V., EZHIL PRAVEENA P., OTTA S.K. & JITHENDRAN K.P. (2019). Classical runt deformity syndrome cases in farmed *Penaeus vannamei* along the east coast of India. In: BRAQCON 2019: World Brackishwater Aquaculture Conference, Jithendran K.P., Saraswathy R., Balasubramanian C.P., Kumaraguru Vasagam K.P., Jayasankar V., Raghavan R., Alavandi S.V. & Vijayan K.K., eds. Journal of Coastal Research, Special Issue No. 86, pp. 107–111. Coconut Creek (Florida), ISSN 0749-0208.
- KALAGAYAN G., GODIN D., KANNA R., HAGINO G., SWEENEY J., WYBAN J. & BROCK J. (1991). IHHN virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. *J. World Aquacult. Soc.*, **22**, 235–243.
- KRABSETSVE K., CULLEN B.R. & OWENS L. (2004). Rediscovery of the Australian strain of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.*, **61**, 153–158.
- LIGHTNER D.V. (ED.) (1996). A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 304 pp.
- LIGHTNER D.V. (2005). Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. *J. World Aquaculture Soc.* **36**, 229–248.
- LIGHTNER D.V., MOHNEY L.L., WILLIAMS R.R. & REDMAN R.M. (1987). Glycerol tolerance of IHHN virus of penaeid shrimp. *J. World Aquac. Soc.*, **18**, 196–197.
- LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., ARCE S. & MOSS S.M. (2009). Specific pathogen-free (SPF) shrimp stocks in shrimp farming facilities as a novel method for disease control in crustaceans. In: Shellfish Safety and Quality, Shumway S. & Rodrick G., eds. Woodhead Publishers, London, UK, 384–424.
- LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, **164**, 201–220.
- LIGHTNER D.V., REDMAN R.M. & BELL T.A. (1983). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *J. Invertebr. Pathol.*, **42**, 62–70.
- MARI J., BONAMI J.R. & LIGHTNER D.V. (1993). Partial cloning of the genome of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, an unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps; diagnosis of the disease using a specific probe. *J. Gen. Virol.*, **74**, 2637–2643.
- MONTGOMERY-BROCK D., TACON A.G.J., POULOS B., & LIGHTNER D.V. (2007). Reduced replication of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in *Litopenaeus vannamei* held in warm water. *Aquaculture*, **265**, 41–48.

- MORALES-COVARRUBIAS M.S., NUNAN L.M., LIGHTNER D.V., MOTA-URBINA J.C., GARZA-AGUIRRE M.C. & CHAVEZ-SANCHEZ M.C. (1999). Prevalence of IHNV in wild broodstock of *Penaeus stylirostris* from the upper Gulf of California, Mexico. *J. Aquat. Anim. Health*, **11**, 296–301.
- MOTTE, E., YUGCHA E., LUZARDO J., CASTRO F., LECLERCQ G., RODRÍGUEZ J., MIRANDA P., BORJA O., SERRANO J., TERREROS M., MONTALVO K., NARVÁEZ A., TENORIO N., CEDEÑO V., MIALHE E. & BOULO V. (2003). Prevention of IHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, **219**, 57–70.
- NUNAN L.M., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (2000). Use of polymerase chain reaction (PCR) for the detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) in penaeid shrimp. *Mar. Biotechnol.*, **2**, 319–328.
- NUNAN L.M., ARCE S.M., STAHA R.J. & LIGHTNER D.V. (2001). Prevalence of Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) and White spot syndrome virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* in the Pacific Ocean off the coast of Panama. *J. World Aquacult. Soc.*, **32**, 330–334.
- PANTOJA C.R., LIGHTNER D.V. & HOLTSCHMIT K.H. (1999). Prevalence and geographic distribution of IHNV parvovirus in wild penaeid shrimp (Crustacea: Decapoda) from the Gulf of California, Mexico. *J. Aquat. Anim. Health*, **11**, 23–34.
- PENZES J.J., SODERLUND-VENERMO M., CANUTI M., EIS-HUBINGER A.M., HUGHES J., COTMORE S.F. & HARRACH B. (2020). Reorganizing the family *Parvoviridae*: a revised taxonomy independent of the canonical approach based on host association. *Arch. Virol.*, **165**, 2133–2146. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04632-4>
- PRIMAVERA, J.H. & QUINTIO E.T. (2000). Runt-deformity syndrome in cultured giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *J. Crust. Biol.*, **20**, 796–802.
- SAKSMPROM V., JITRAKORN S., CHAYABURAKUL K., LAIPHROM S., BOONSUA K. & FLEGEL T.W. (2011). Additional random, single to multiple genome fragments of *Penaeus stylirostris* densovirus in the giant tiger shrimp genome have implications for viral disease diagnosis. *Virus Res.*, **160**, 180–190.
- SELLARS M.J., COWLEY J.A., MUSSON D., RAO M., MENZIES M.L., COMAN G. J. & MURPHY B.S. (2019). Reduced growth performance of Black Tiger shrimp (*Penaeus monodon*) infected with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus. *Aquaculture*, **499**, 160–166.
- SHIKE H., DHAR A.K., BURNS J.C., SHIMIZU C., JOUSSET F.X., KLIMPEL K.R. & BERGOIN M. (2000). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of shrimp is related to mosquito Brevidensovirus. *Virology*, **277**, 167–177.
- SUN Z.F., HU C. Q., REN C. H. & SHEN Q. (2006). Sensitive and rapid detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) in shrimps by loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods*, **131**, 41–46.
- TAENGCHAIYAPHUM S., BUATHONGKAM P., SUKTHAWORN S., WONGKHALUANG P., SRITUNYALUCKSANA K. & FLEGEL T.W. (2021). Shrimp Parvovirus Circular DNA Fragments Arise From Both Endogenous Viral Elements and the Infecting Virus. *Front. Immunol.*, **12**, 729528. doi: 10.3389/fimmu.2021.729528.
- TANG K.F.J., DURAND S.V., WHITE B.L., REDMAN R.M., PANTOJA C.R. & LIGHTNER D.V. (2000). Postlarvae and juveniles of a selected line of *Penaeus stylirostris* are resistant to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus infection. *Aquaculture*, **190**, 203–210.
- TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2001). Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp by real-time PCR. *Dis. Aquat. Org.*, **44**, 79–85.
- TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2006). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) in the genome of the black tiger prawn *Penaeus monodon* from Africa and Australia. *Virus Res.*, **118**, 185–191.
- TANG K.F.J., NAVARRO S.A. & LIGHTNER D.V. (2007). A PCR assay for discriminating between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) and the virus-related sequences in the genome of *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.*, **74**, 165–170.
- TANG K.F.J., POULOS B.T., WANG J., REDMAN R.M., SHIH H.H. & LIGHTNER D.V. (2003). Geographic variations among infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) isolates and characteristics of their infection. *Dis. Aquat. Org.*, **53**, 91–99.
- WEI Y.W., FAN D.D. & CHEN J. (2017). The mussel *Mytilus edulis* L. as an important reservoir of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV). *Aquaculture Res.*, **48**, 1346–1350.

XIA X.X., YU Y.X., HU L.H., MANFRED W. & PAN Y.J. (2015). Rapid detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) by real-time, isothermal recombinase polymerase amplification assay. *Arch. Virol.*, **160**, 987–994.

*
* *

NB: There are OIE Reference Laboratories for infection with infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (see Table at the end of this *Aquatic Manual* or consult the OIE web site for the most up-to-date list: <http://www.oie.int/en/scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Please contact the OIE Reference Laboratories for any further information on infection with infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus

NB: FIRST ADOPTED IN 1995 AS INFECTIOUS HYPODERMAL AND HAEMATOPOIETIC NECROSIS;
MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2018.

[Volver al orden del día](#)

CHAPTER 2.3.1.

INFECTION WITH *APHANOMYCES INVADANS* (EPIZOOTIC ULCERATIVE SYNDROME)

1. Scope

Infection with *Aphanomyces invadans* means all infections caused by the oomycete fungus *A. invadans* of the Genus *Aphanomyces* and Family *Leptolegniaceae*.

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent

Infection with *A. invadans* is most commonly known as epizootic ulcerative syndrome (EUS) (Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 1986). It has also been known as red spot disease (RSD) (Mckenzie & Hall, 1976), mycotic granulomatosis (MG) (Egusa & Masuda, 1971; Hanjavanit, 1997) and ulcerative mycosis (UM) (Noga & Dykstra, 1986). The disease is caused by the oomycete *Aphanomyces invadans*.

Infection with *Aphanomyces invadans* is a seasonal epizootic condition of great importance in wild and farmed freshwater and estuarine fish. It is clinically characterised by the presence of invasive, non-septate hyphae in skeletal muscle, usually leading to a granulomatous response. Infections with *A. invadans* have spread widely since the first outbreak in 1971 in Japan and to date a high degree of genetic homogeneity is observed for this species based on publicly available genome sequences (Dieguez-Uribeondo *et al.*, 2009; European Food Safety Authority [EFSA] 2011a; Huchzermeyer *et al.*, 2018; Iberahim *et al.*, 2018; Lilley *et al.*, 2003). Other pathogenic viruses (mostly rhabdoviruses), bacteria (mainly *Aeromonas hydrophila*), fungi, oomycetes and parasites are routinely co-isolated from *A. invadans*-infected fish (Iberahim *et al.*, 2018).

Aphanomyces invadans is within a group of organisms commonly known as the water moulds. Although long-regarded as fungi because of their characteristic filamentous growth, this group, the Oomycota, is not considered a member of the Eumycota (true fungi) but is classified with diatoms and brown algae in a group called the Heterokonta or Stramenopiles within the Kingdom Chromista (Cavalier-Smith & Chao 2006; Tsui *et al.*, 2009). Junior synonyms of *A. invadans* include *Aphanomyces piscicida* and *Aphanomyces invaderis*.

2.1.2. Survival and stability in processed or stored samples

There is limited published data on the stability of the pathogen in host tissues. It is not clear whether the pathogen continues to grow for some time following the death of the host (Oidtmann, 2012).

Aphanomyces invadans cultures can be maintained for extended periods in glucose phosphate broth (6 weeks at 10°C), agar slopes and sodium phosphate buffer (over 6 months at 20°C) (Lilley *et al.*, 1998).

2.1.3. Survival and stability outside the host

How *A. invadans* survives outside the host is unclear (Oidtmann, 2012). It is assumed that the motile zoospores, which are released from an infected fish, will encyst when unsuccessful in finding a suitable substrate to grow on (Oidtmann, 2012). Encysted zoospores of *A. invadans* are capable of releasing a new zoospore generation instead of germinating in a process called repeated zoospore emergence (Dieguez-Uribeondo *et al.*, 2009). There is no suitable method to recover or isolate the encysted zoospore from affected fish ponds (Afzali *et al.*, 2013). How long the encysted spore can survive in water or on a non-fish substrate is unclear. In an *in-vitro* experiment, the encysted zoospore survived for at least 19 days (Lilley *et al.*, 2001).

For inactivation methods, see Section 2.4.5.

2.2. Host factors

2.2.1. Susceptible host species

Table 2.1. Fish species susceptible to infection with *Aphanomyces invadans*

Family	Scientific name	Common Name
Alestidae	<i>Brycinus lateralis</i>	striped robber
	<i>Hydrocynus vittatus</i>	tigerfish
	<i>Micralestes acutidens</i>	silver robber
Ambassidae	<i>Ambassis agassizii</i>	chanda perch
Apogonidae	<i>Glossamia aprion</i>	mouth almighty
Ariidae	<i>Arius sp.</i>	fork-tailed catfish
Belontiidae	<i>Strongylura krefftii</i>	long tom
Centrarchidae	<i>Lepomis macrochirus</i>	bluegill
	<i>Micropterus salmoides</i>	largemouth black bass
Channidae	<i>Channa marulius</i>	great snakehead fish
	<i>Channa striatus</i>	striped snakehead
Cichlidae	<i>Coptodon rendalli</i>	redbreast tilapia
	<i>Oreochromis andersoni</i>	three-spotted tilapia
	<i>Oreochromis machrochir</i>	greenhead tilapia
	<i>Sargochromis carlottae</i>	rainbow bream
	<i>Sargochromis codringtonii</i>	green bream
	<i>Sargochromis giardi</i>	pink bream
	<i>Serranochromis angusticeps</i>	thinface largemouth
	<i>Serranochromis robustus</i>	Nembwe
Clariidae	<i>Clarias gariepinus</i>	sharp-tooth African catfish
	<i>Clarias ngamensis</i>	blunt-toothed African catfish
	<i>Clarius batrachus</i>	walking catfish
Clupeidae	<i>Alosa sapidissima</i>	American shad
	<i>Brevoortia tyrannus</i>	Atlantic menhaden
	<i>Nematalosa erebi</i>	bony bream
Cyprinidae	<i>Barbus paludinosus</i>	straightfin barb
	<i>Barbus poechii</i>	dashtail barb
	<i>Barbus thamalakanensis</i>	Thamalakane barb
	<i>Barbus unitaeniatus</i>	longbeard barb
	<i>Carassius auratus</i>	goldfish
	<i>Catla catla</i>	catla
	<i>Cirrhinus mrigala</i>	mrigal
	<i>Esomus sp.</i>	flying barb
	<i>Labeo cylindricus</i>	red-eye labeo
	<i>Labeo lunatus</i>	upper Zambezi labeo
	<i>Labeo rohita</i>	rohu
	<i>Puntius gonionotus</i>	silver barb
	<i>Puntius sophore</i>	pool barb
<i>Rohtee sp.</i>	keti-Bangladeshi	
Eleotridae	<i>Oxyeleotris lineolatus</i>	sleepy cod
	<i>Oxyeleotris marmoratus</i>	marble goby

Family	Scientific name	Common Name
Gobiidae	<i>Glossogobius giuris</i>	bar-eyed goby
	<i>Glossogobius sp.</i>	goby
	<i>Tridentiger obscurus obscurus</i>	dusky tripletooth goby
Helostomatidae	<i>Helostoma temmincki</i>	kissing gourami
Hepsetidae	<i>Hepsetus odoe</i>	African pike
Ictaluridae	<i>Ameiurus melas</i>	black bullhead
	<i>Ameiurus nebulosus</i>	black bullhead
	<i>Amniataba percoides</i>	striped grunter
	<i>Ictalurus punctatus</i>	channel catfish
Kurtidae	<i>Kurtus gulliveri</i>	nursery fish
Latidae	<i>Lates calcarifer</i>	barramundi or sea bass
Lutjanidae	<i>Lutjanus argentimaculatus</i>	mangrove jack
Melanotaeniidae	<i>Melanotaenia splendida</i>	rainbow fish
Mormyridae	<i>Marcusenius macrolepidotus</i>	bulldog
	<i>Petrocephalus catostoma</i>	churchill
Mugilidae	<i>Mugilidae (Mugil spp.; Liza spp.)</i>	mullet
	<i>Mugil cephalus</i>	grey mullet or striped mullet
	<i>Mugil curema</i>	white mullet
	<i>Myxus petardi</i>	mullet
Osmeroidei	<i>Plecoglossus altivelis</i>	ayu
Osphronemidae	<i>Colisa lalia</i>	dwarf gourami
	<i>Osphronemus goramy</i>	giant gourami
	<i>Trichogaster pectoralis</i>	snakeskin gourami
	<i>Trichogaster trichopterus</i>	three-spot gourami
Osteoglossidae	<i>Scleropages jardini</i>	saratoga
Percichthyidae	<i>Maccullochella ikei</i>	freshwater cod
	<i>Maccullochella peelii</i>	Murray cod
	<i>Macquaria ambigua</i>	golden perch
	<i>Macquaria novemaculeata</i>	Australian bass
Platycephalidae	<i>Platycephalus fuscus</i>	dusky flathead
Psettodidae	<i>Psettodes sp.</i>	spiny turbot
Salmonidae	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	rainbow trout
Scatophagidae	<i>Scatophagus argus</i>	spotted scat
	<i>Selenotoca multifasciata</i>	striped scat
Schilbeidae	<i>Schilbe intermedius</i>	silver catfish
	<i>Schilbe mystus</i>	African butter catfish
Sciaenidae	<i>Bairdiella chrysoura</i>	drums or croakers
	<i>Pogonias cromis</i>	black drum
Sillaginae	<i>Sillago ciliata</i>	sand whiting
Siluridae	<i>Silurus glanis</i>	<i>wells catfish</i>
Soleidae	<i>Aseraggodes macleayanus</i>	narrow banded sole
Sparidae	<i>Acanthopagrus australis</i>	yellowfin sea bream
	<i>Acanthopagrus berda</i>	black bream
	<i>Archosargus probatocephalus</i>	sheepshead
Synbranchidae	<i>Fluta alba</i>	swamp eel
Terapontidae	<i>Anabas testudineus</i>	climbing perch
	<i>Bidyanus bidyanus</i>	silver perch
	<i>Leiopotherapon unicolor</i>	spangled perch
	<i>Scortum barcoo</i>	Barcoo Grunter

Family	Scientific name	Common Name
	<i>Therapon sp.</i>	therapon
Toxotidae	<i>Toxotes chatareus</i>	common archer fish
	<i>Toxotes lorentzi</i>	primitive acher fish

2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility [under study]

Species for which there is incomplete evidence to fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with *A. invadans* according to Chapter 1.5 of the *Aquatic Code* are: [under study]

2.2.3. Likelihood of infection by species, host life stage, population or sub-populations

Subadult and adult fish are usually described as the susceptible life stages to natural outbreaks of EUS (FAO, 2009). However, there are reports of infection with *A. invadans* being found in early life stages (fish fry or fish larvae) (Baldock *et al.*, 2005; EFSA 2011a). While the size of the fish does not determine an EUS outbreak (Cruz-Lacierda & Shariff, 1995), younger fish seem to be more prone to EUS compared with adult fish (Gomo *et al.*, 2016; Pagrut *et al.*, 2017).

An experimental injection of *A. invadans* into the yearling life stage of Indian major carp, catla, rohu and mrigal, revealed resistance to *A. invadans* (Pradhan *et al.*, 2007), even though they are naturally susceptible species. Experimental infections demonstrated that goldfish are susceptible (Hatai *et al.*, 1977; 1994), but common carp (Wada *et al.*, 1996), Nile tilapia (Khan *et al.*, 1998) and European eel, (Oidtmann *et al.*, 2008) are considered resistant.

2.2.4. Distribution of the pathogen in the host

During the course of an infection with *A. invadans*, the free-swimming zoospore attaches to the skin of a fish host, encysts and germinates to develop hyphae invading and ramifying through host tissues (Kiryu *et al.*, 2003; Lilley *et al.*, 1998). The hyphal invasion and associated pathology are not confined to the region of dermal ulcers. The hyphae readily invade the body cavity and produce mycotic granulomas in all the visceral organs (Vishwanath *et al.*, 1998). In fish either suspected or confirmed to be infected with *Aphanomyces invadans*, hyphae have also been observed in kidney, liver, spleen, pancreatic tissue, gut, parietal peritoneum, swim bladder, gonads, spinal cord, meninges, vertebrae, inter-muscular bones, the mouth region, and the orbits (Chinabut & Roberts, 1999; Vishwanath *et al.*, 1998; Wada *et al.*, 1996).

2.2.5. Aquatic animal reservoirs of infection

There is no information to indicate that fish can be lifelong carriers of *A. invadans*. Generally, most infected fish die during an outbreak. Although some fish with mild or moderate infections could recover, they are unlikely to be lifelong carriers of *A. invadans*.

2.2.6. Vectors

No data available.

2.3. Disease pattern

2.3.1. Mortality, morbidity and prevalence

The prevalence of infection with *A. invadans* in the wild and in aquaculture farms may be high (20–90%), in endemic areas with high levels of mortality observed. Mortality patterns appear to be seasonal and can vary substantially (Herbert *et al.*, 2019).

2.3.2. Clinical signs, including behavioural changes

Fish usually develop red spots or small-to-large ulcerative lesions on the body. The occurrence of skin lesions and ultimately mortality varies according to fish species. Fish presenting with lesions are usually weak, appear darker in colour, have a reduced appetite, are immobile and may float at the surface of the water. Generally infected fish are encountered in shallow water and present a retarded ability to escape capture occasionally followed by short lived bouts of hyperactivity characterised by jerky movements (Huchzermeyer *et al.*, 2018; Ibrahimi *et al.*, 2018).

2.3.3 Gross pathology

Early-stage lesions on mildly infected fish are characterised by red spots observed on the lateral body surface, head, operculum or caudal peduncle of the infected fish. Scales of infected fish are often protruding or lost. In severe cases, swollen haemorrhagic areas, massive inflammation and large deep ulcers exposing the underlying necrotic muscle tissue are observed (Huchzermeyer *et al.*, 2018; Ibrahım *et al.*, 2018). In advanced stages of the disease, the severity of the disease results in death of the fish (Hawke *et al.*, 2003; Ibrahım *et al.*, 2018).

2.3.4. Modes of transmission and life cycle

Aphanomyces invadans has an aseptate fungal-like mycelia structure. This oomycete has two typical zoospore forms. The primary zoospore consists of round cells that develop inside the sporangium. The primary zoospore is released to the tip of the sporangium where it forms a spore cluster. It quickly transforms into the secondary zoospore, which is a reniform, laterally biflagellate cell and can swim freely in the water. The secondary zoospore remains motile for a period that depends on the environmental conditions and presence of the fish host or substratum. Typically, the zoospore encysts and germinates to produce new hyphae, although further tertiary generations of zoospores may be released from cysts (repeated zoospore emergence or polyplanetism) (Lilley *et al.*, 1998). The *A. invadans* zoospores can be horizontally transmitted from one fish to another through the water supply. It is believed that only the secondary zoospores or free-swimming stage zoospores are capable of attaching to the damaged skin of fish and germinating into hyphae. If the secondary zoospores cannot find the susceptible species or encounter unfavourable conditions, they can encyst in the pond environment. The cysts may wait for conditions that favour their transformation into tertiary generations of zoospores that are also in the free-swimming stage. The encysting property of *A. invadans* may play an important role in the cycle of outbreaks in endemic areas.

2.3.5. Environmental factors

Under natural conditions, infection with *A. invadans* has been reported at water temperatures in the range 10–33°C (Bondad-Reantaso *et al.* 1992; Hawke *et al.* 2003) often associated with massive rainfall (Bondad-Reantaso *et al.*, 1992). These conditions favour sporulation of *A. invadans* (Lumanlan-Mayo *et al.*, 1997), and temperatures of 17–19°C have been shown to delay the inflammatory response of fish to oomycete infection (Catap & Munday, 1998, Chinabut *et al.*, 1995). In some countries, outbreaks occur in wild fish first and then spread to fish ponds. Normally, a bath infection of *A. invadans* in healthy susceptible fish species does not result in clinical signs of disease. The presence of other pathogens (viruses, bacteria or ectoparasites, skin damage, water temperature (between 18 and 22 °C), low pH (6.0–7.0) and low oxygen concentration in the water have all been hypothesised as predisposing factors for infection or factors influencing the expression of the disease (Oidtmann, 2012; Ibrahım *et al.*, 2018).

Movements of live ornamental fish from countries from which infection with *A. invadans* is confirmed may spread the disease as was the case with the outbreak in Sri Lanka (Balasuriya, 1994). Flooding also caused the spread of infection with *A. invadans* in Bangladesh and Pakistan (Lilley *et al.*, 1998). Once an outbreak occurs in rivers/canals, the disease can spread downstream as well as upstream where the susceptible fish species exist.

Aphanomyces invadans grows best at 20–30°C; it does not grow *in-vitro* at 37°C. Water salinity over 2 parts per thousand (ppt) can stop spread of the agent. Under laboratory conditions the optimal growth temperature range for *A. invadans* is 19–22°C, while under natural conditions *A. invadans* seems to be more robust (Hawke *et al.*, 2003)

2.3.6. Geographical distribution

Infection with *A. invadans* was first reported in farmed freshwater ayu (*Plecoglossus altivelis*) in Asia in 1971 (Egusa & Masuda, 1971). It was later reported in estuarine fish, particularly grey mullet (*Mugil cephalus*) in eastern Australia in 1972 (Fraser *et al.*, 1992; McKenzie & Hall, 1976). Infection with *A. invadans* has extended its range into South-East and South Asia, and into West Asia (Lilley *et al.*, 1998; Tonguthai, 1985). Outbreaks of ulcerative disease in menhaden (*Brevoortia tyrannus*) in North America had the same aetiological agent as the disease observed in Asia (Blazer *et al.*, 1999; Lilley *et al.*, 1997a; Vandersea *et al.*, 2006). The first confirmed outbreaks of infection with *A. invadans* on the African continent occurred in 2007, and were connected to the Zambezi-Chobe river system (Andrew *et al.*, 2008; FAO, 2009; Huchzermeyer & Van der Waal, 2012; McHugh *et al.*, 2014). In 2010 and 2011, infection with *A. invadans* appeared in wild freshwater fish in Southern Africa and in wild brown bullhead fish in North America. Infection with *A. invadans* has been reported from more than 20 countries in four continents: North America, Southern Africa, Asia and Australia.

For recent information on distribution at the country level consult the OIE WAHIS interface (https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home/index/newlang/en).

2.4. Biosecurity and disease control strategies

2.4.1. Vaccination

There is no protective vaccine available.

2.4.2. Chemotherapy including blocking agents

There is no effective treatment for *A. invadans*-infected fish in the wild and in aquaculture ponds.

2.4.3. Immunostimulation

Experimentally infected snakehead fish fed a vitamin-supplemented feed exhibited clinical signs of infection with *A. invadans* but had higher survival than controls (Miles *et al.*, 2001).

2.4.4. Breeding resistant strains

No data available.

2.4.5. Inactivation methods

To minimise fish losses in infected fish ponds water exchange should be stopped and lime or hydrated lime and/or salt should be applied (Lilley *et al.*, 1998). Preparing fish ponds by sun-drying and liming are effective disinfection methods for *A. invadans* (EFSA 2011b; Kumar *et al.*, 2020; Oidtmann, 2012). Similar to other oomycetes or water moulds, general disinfection chemicals effectively destroy *A. invadans* that might contaminate farms, fish ponds or fishing gear (Iberahim *et al.*, 2018).

2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

Routine disinfection of fish eggs and larvae against water moulds is effective against *A. invadans*. It should be noted that there is no report of the presence of *A. invadans* in fish eggs or larvae.

2.4.7. General husbandry

Control of *A. invadans* in natural waters is probably impossible. In outbreaks occurring in small, closed water bodies or fish ponds, treating water with agricultural limes and improving water quality, together with removal of infected fish, is often effective in reducing mortalities and controlling the disease. Preventing entry of water from *A. invadans*-infected water bodies into fish ponds can prevent spread of the disease into farms. Sodium chloride or salt and agricultural lime are safe and effective chemicals for treating or preventing the spread of *A. invadans*.

3. Specimen selection, sample collection, transportation and handling

3.1. Selection of populations and individual specimens

Scoop net, cast net or seine net represent the best choices for catching diseased fish in natural waters or in fish ponds (FAO 2009).

Fish with characteristic EUS-like lesions should be sampled from affected populations

3.2. Selection of organs or tissues

The motile zoospore plays an important role in the spread of the disease. Once the motile spore attaches to the skin of the fish, the spore will germinate under suitable conditions and its hyphae will invade the fish skin, muscular tissue and reach the internal organs. Fish skeletal muscle is the target organ and exhibits major clinical signs of infection with *A. invadans* with mycotic granulomas (Iberahim *et al.*, 2018). Samples should not be taken from the middle of large lesions as these are likely to be devoid of visible and viable hyphae. Instead, samples should be taken from the leading edge of the infected area or lesion and where possible, multiple samples should be taken from an infected individual to obtain viable hyphae. Fungal hyphae can be seen in tissue squash mounts and histological sections at the leading edge of the infected area. Attempting to culture *A. invadans* from severe ulcers is often constrained because of contaminating bacteria, but still should be attempted. PCR on tissue taken from the leading edge of the ulcer also should be attempted.

3.3. Samples or tissues not suitable for pathogen detection

Samples should not be taken from the middle of large lesions as these are likely to be devoid of visible and viable hyphae.

3.4. Non-lethal sampling

None available.

3.5. Preservation of samples for submission

Fish specimens should be transported to the laboratory live or in ice-cooled boxes for further diagnosis. Samples must not be frozen since the fungus is killed by freezing. Fish collected from remote areas should be anaesthetised and can be fixed in normal 10% formalin or 10% phosphate-buffered formalin for at least 1–2 days. The fixed specimens are then transferred to double-layer plastic bags with formalin-moistened tissue paper.

For guidance on sample preservation methods for the intended test methods, see Chapter 2.3.0 *General information (diseases of fish)*.

3.5.1. Samples for pathogen isolation

The success of pathogen isolation depends strongly on the quality of samples (time since collection and time in storage). Fresh specimens should be kept on ice and preferably sent to the laboratory within 24 hours of collection. To avoid degradation of samples use alternative storage methods only after consultation with the receiving laboratory. Multiple samples should be taken from each lesion to increase the chances of obtaining viable hyphae.

3.5.2. Preservation of samples for molecular detection

Tissue samples for PCR testing should be preserved in 70–90% (v/v) analytical/reagent-grade (undenatured) ethanol. The recommended ratio of ethanol to tissue is 10:1.

3.5.3. Samples for histopathology, immunohistochemistry or *in-situ* hybridisation

Standard methods for histopathology can be found in Chapter 2.3.0.

3.5.4. Samples for other tests

None

3.6. Pooling of samples

Pooling of samples from more than one individual animal for a given purpose should only be recommended where supporting data on diagnostic sensitivity and diagnostic specificity are available. However, smaller life stages (e.g. fry) can be pooled to provide a minimum amount of material for testing.

4. Diagnostic methods

The methods currently available for pathogen detection that can be used in i) surveillance of apparently healthy animals, ii) presumptive diagnosis in clinically affected animals and iii) confirmatory diagnostic purposes are listed in Table 4.1. by animal life stage.

Ratings for purposes of use. For each recommended assay a qualitative rating for the purpose of use is provided. The ratings are determined based on multiple performance and operational factors relevant to application of an assay for a defined purpose. These factors include appropriate diagnostic performance characteristics, level of assay validation, availability cost, timeliness, and sample throughput and operability. For a specific purpose of use, assays are rated as:

- +++ = Methods are most suitable with desirable performance and operational characteristics.
- ++ = Methods are suitable with acceptable performance and operational characteristics under most circumstances.

+ = Methods are suitable, but performance or operational characteristics may limit application under some circumstances.

Shaded boxes = Not appropriate for this purpose.

Validation stage. The validation stage corresponds to the assay development and validation pathway in chapter 1.1.2. The validation stage is specific to each purpose of use. Where available, information on the diagnostic performance of recommended assays is provided in Section 6.3.

OIE Reference Laboratories welcome feedback on diagnostic performance of recommended assays, in particular PCR methods. Of particular interest are any factors affecting expected assay sensitivity (e.g. tissue components inhibiting amplification) or expected specificity (e.g. failure to detect particular genotypes, detection of homologous sequences within the host genome). These issues should be communicated to the OIE Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

Table 4.1. OIE recommended diagnostic methods and their level of validation for surveillance of apparently healthy animals and investigation of clinically affected animals

Method	12. Surveillance of apparently healthy animals				13. Presumptive diagnosis of clinically affected animals				14. Confirmatory diagnosis ¹ of a suspect result from surveillance or presumptive diagnosis			
	Early life stages ²	Juveniles ²	Adults	LV	Early life stages ²	Juveniles ²	Adults	LV	Early life stages ²	Juveniles ²	Adults	LV
Squash mounts					+	+	+	1	+	+	+	1
Histopathology					++	++	++	1	++	++	++	1
Cytopathology												
Cell or artificial media culture					++	++	++	1	+	+	+	1
Real-time PCR												
Conventional PCR					++	++	++	1	++	++	++	1
Amplicon sequencing ⁴									+++	+++	+++	1
<i>In-situ</i> hybridisation									++	++	++	1
Bioassay												
LAMP												
Ab ELISA												
Ag ELISA												
Other antigen detection methods ³												
Other method ³												

LV = level of validation, refers to the stage of validation in the OIE Pathway (Chapter 1.1.2); PCR = polymerase chain reaction; LAMP = loop-mediated isothermal amplification;

Ab- or Ag-ELISA = antibody or antigen enzyme-linked immunosorbent assay, respectively.

¹For confirmatory diagnoses, methods need to be carried out in combination (see Section 6). ²Susceptibility of early and juvenile life stages is described in Section 2.2.3.

³Specify the test used. Shading indicates the test is inappropriate or should not be used for this purpose.

Diagnosis of infection with *A. invadans* in clinically affected fish may be achieved by histopathology, oomycete isolation or polymerase chain reaction amplification.

4.1. Squash mounts

Aphanomyces invadans can be detected using microscopic examination of squash preparations prepared as follows:

- i) Remove ulcer surface using a sharp scalpel blade.
- ii) Cut the muscular tissue at the edge of the ulcer.
- iii) Place the pieces of tissue on a cutting board then make thin slices using a sharp scalpel blade.
- iv) Place the thinly sliced tissue between two glass slides and squeeze gently with fingers.
- v) Remove one of the glass slides and cover the tissue with a cover-slip. View under a light microscope to find the nonseptate hyphae structure of *A. invadans* (12–25 µm in diameter).

4.2. Histopathology and cytopathology

Aphanomyces invadans can be detected using microscopic examination of fixed sections, prepared as follows:

- i) Sample only live or moribund specimens of fish with clinical lesions.
- ii) Take samples of skin/muscle (<1 cm³), including the leading edge of the lesion and the surrounding tissue.
- iii) Fix the tissues immediately in 10% formalin. The amount of formalin should be 10 times the volume of the tissue to be fixed.

4.2.1. Histological procedure

Standard methods for processing are provided in chapter 2.3.0. H&E and general fungus stains (e.g. Grocott's stain) will demonstrate typical granulomas and invasive hyphae.

4.2.2. Histopathological changes

Early lesions are caused by erythematous dermatitis with no obvious oomycete involvement. *Aphanomyces invadans* hyphae are observed growing in skeletal muscle as the lesions progress from a mild chronic active dermatitis to a severe locally extensive necrotising granulomatous dermatitis with severe floccular degeneration of the muscle. The oomycete elicits a strong inflammatory response and granulomas are formed around the penetrating hyphae.

4.3. Cell culture for isolation

4.3.1. Isolation of *Aphanomyces invadans* from internal tissues

The following are two methods of isolation of *A. invadans* adapted from Lilley *et al.* (1998) and Willoughby & Roberts (1994).

Method 1: Moderate, pale, raised, dermal lesions are most suitable for oomycete isolation attempts. Remove the scales around the periphery of the lesion and sear the underlying skin with a red-hot spatula so as to sterilise the surface. Using a sterile scalpel blade and sterile fine-pointed forceps, cut through the stratum compactum underlying the seared area and, by cutting horizontally and reflecting superficial tissues, expose the underlying muscle. Ensure the instruments do not make contact with the contaminated external surface and thereby contaminate the underlying muscle. Using aseptic techniques, carefully excise pieces of affected muscle, approximately 2 mm³, and place on a Petri dish containing glucose/peptone (GP) agar (see Table 4.1) with penicillin G (100 units ml⁻¹) and streptomycin (100 µg ml⁻¹). Seal plates, incubate at room temperature or at 25°C and examine daily. Repeatedly transfer emerging hyphal tips on to fresh plates of GP agar with antibiotics until cultures are free of contamination.

Method 2: Lesions located on the flank or tail of fish <20 cm in length can be sampled by cutting the fish in two using a sterile scalpel and slicing a cross-section through the fish at the edge of the lesion. Flame the scalpel until red-hot and use this to sterilise the exposed surface of the muscle. Use a small-bladed sterile scalpel to cut out a circular block of muscle (2–4 mm³) from beneath the lesion and place it in a Petri dish of GP medium (see Table 4.1) with 100 units ml⁻¹ penicillin G and 100 µg ml⁻¹ streptomycin. Instruments should not contact the contaminated external surface of the fish. Incubate inoculated medium at approximately 25°C and examine under a microscope (preferably an inverted microscope) within 12 hours. Repeatedly transfer emerging hyphal tips to plates of GP medium with 12 g litre⁻¹ technical agar, 100 units ml⁻¹ penicillin G and 100 µg ml⁻¹ streptomycin until axenic cultures are obtained. The oomycete isolate can also be maintained at 25°C on GY agar (see Table 4.1) and transferred to a fresh GY agar tube once every 1–2 weeks (Hatai & Egusa, 1979).

4.3.2. Identification of *Aphanomyces invadans*

Aphanomyces invadans does not produce any sexual structures and should thus not be diagnosed by morphological criteria alone. However, the oomycete can be identified to the genus level by inducing sporogenesis and demonstrating typical asexual characteristics of *Aphanomyces* spp., as described in Lilley *et al.*, 1998. *Aphanomyces invadans* is characteristically slow-growing in culture and fails to grow at 37°C on GPY agar (Table 4.1). Detailed temperature–growth profiles are given in Lilley & Roberts (1997). *A. invadans* can be identified by polymerase chain reaction (PCR) amplification of the rDNA of *A. invadans*.

4.3.3. Inducing sporulation in *Aphanomyces invadans* cultures

The induction of asexual reproductive structures is necessary for identifying oomycete cultures as members of the genus *Aphanomyces*. To induce sporulation, place an agar plug (3–4 mm in diameter) of actively growing mycelium in a Petri dish containing GPY broth and incubate for 4 days at approximately 20°C. Wash the nutrient agar out of the resulting mat by sequential transfer through five Petri dishes containing autoclaved pond water (Table 4.1), and leave overnight at 20°C in autoclaved pond water. After about 12 hours, the formation of achlyoid clusters of primary cysts and the release of motile secondary zoospores should be apparent under the microscope.

Table 4.1. Media for isolation, growth and sporulation of *Aphanomyces invadans* cultures

GP (glucose/peptone) medium	GPY (glucose/peptone/yeast) broth	GPY agar	GY agar	Autoclaved pond water
3 g litre ⁻¹ glucose 1 g litre ⁻¹ peptone 0.128 g litre ⁻¹ MgSO ₄ .7H ₂ O 0.014 g litre ⁻¹ KH ₂ PO ₄ 0.029 g litre ⁻¹ CaCl ₂ .2H ₂ O 2.4 mg litre ⁻¹ FeCl ₃ .6H ₂ O 1.8 mg litre ⁻¹ MnCl ₂ .4H ₂ O 3.9 mg litre ⁻¹ CuSO ₄ .5H ₂ O 0.4 mg litre ⁻¹ ZnSO ₄ .7H ₂ O	GP broth + 0.5 g litre ⁻¹ yeast extract	GPY broth + 12 g litre ⁻¹ technical agar	1% glucose, 0.25% yeast extract, 1.5% agar	Sample pond/lake water known to support oomycete growth. Filter through Whatman 541 filter paper. Combine one part pond water with two parts distilled water and autoclave. pH to 6–7.

Agent purification

Maintaining *A. invadans* in the axenic culture is necessary. As it is characteristically slow-growing, it easily becomes contaminated with other micro-organisms, such as bacteria and other fast-growing oomycetes and fungi. Attempts to purify or isolate *A. invadans* from contaminated cultures usually fail.

4.4. Nucleic acid amplification

4.4.1. Real-time PCR

No real-time PCR methods for detecting *A. invadans* in fish tissues are available.

4.4.2. Conventional PCR

DNA preparation from *A. invadans* isolate

DNA is extracted from an actively growing colony of *A. invadans* culture in GY broth at about 4 days or when young mycelia reach 0.5–1.0 cm in diameter. The mycelia are transferred to sterile 100-mm Petri dishes, washed twice with PBS and then placed on tissue paper for liquid removal. Hyphal tips (~50–

250 mg) are excised with a sterile scalpel blade and transferred to a 1.5 ml microcentrifuge tube for DNA extraction. Commercial DNA extraction kits have been used successfully (Phadee *et al.*, 2004b; Vandersea *et al.*, 2006).

DNA preparation from *A. invadans*-infected tissue

Small pieces of *A. invadans*-infected tissue (25–50 mg) are suitable for DNA extractions (Phadee *et al.*, 2004a).

Diagnostic PCR technique

Three published techniques are specific to *A. invadans*.

Method 1

The species-specific forward primer site is located near the 3' end of the SSU (small subunit) gene and a species-specific reverse primer site is located in the ITS1 region for Ainvad-2F (5'-TCA-TTG-TGA-GTG-AAA-CGG-TG-3') and Ainvad-ITSR1 (5'-GGC-TAA-GGT-TTC-AGT-ATG-TAG-3'). The PCR mixture contained 25 µM of each primer, 2.5 mM each deoxynucleoside triphosphate, 0.5 U of Platinum *Taq* DNA polymerase and 20 ng of genomic DNA (either from an *Aphanomyces* isolate or from infected tissue) for a total volume of 50 µl. DNA is amplified in a thermocycle machine under the following cycle conditions: 2 minutes at 95°C; 35 cycles, each consisting of 30 seconds at 95°C, 45 seconds at 56°C, 2.5 minutes at 72°C; and a final extension of 5 minutes at 72°C. The PCR product is analysed by agarose gel electrophoresis and the target product is 234 bp (Vandersea *et al.*, 2006).

Method 2

The species-specific primer sites are located in the ITS1 and ITS2 regions. The forward primer is ITS11 (5'-GCC-GAA-GTT-TCG-CAA-GAA-AC-3') and the reverse is ITS23 (5'-CGT-ATA-GAC-ACA-AGC-ACA-CCA-3'). The PCR mixture contains 0.5 µM of each primer, 0.2 mM each deoxynucleoside triphosphate, 1.5 mM MgCl₂, 0.6 U of *Taq* DNA polymerase and 20 ng of genomic DNA (from an *Aphanomyces* isolate) for a total volume of 25 µl. The DNA is amplified under the following cycle conditions: 5 minutes at 94°C; 25 cycles, each consisting of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 65°C, 1 minute at 72°C; and a final extension of 5 minutes at 72°C. The PCR product is analysed by agarose gel electrophoresis and the target product is 550 bp. PCR amplification using the DNA template from the infected tissue is similar to the above protocol except that 5 ng of the DNA template is used for 35 cycles (Phadee *et al.*, 2004b).

Method 3

The species-specific primer sites are located in the ITS1 and ITS2 regions. The forward primer is BO73 (5'-CTT-GTG-CTG-AGC-TCA-CAC-TC-3') and the reverse is BO639 (5'-ACA-CCA-GAT-TAC-ACT-ATC-TC-3'). The PCR mixture contains 0.6 µM of each primer, 0.2 mM of each deoxynucleoside triphosphate, 1.5 mM MgCl₂, 0.625 units of *Taq* DNA polymerase, and approximately 5 ng of genomic DNA (or 2.5 µl of DNA template extracted from 25 mg of infected tissue and suspended in 100 µl buffer) in a 50 µl reaction volume (Oidtmann *et al.*, 2008). The DNA is amplified under the following cycle conditions: 96°C for 5 minutes; 35 cycles of 1 minute at 96°C, 1 minute at 58°C and 1 minute at 72°C; followed by a final extension at 72°C for 5 minutes (Oidtmann, pers. comm.). The PCR product is analysed by agarose gel electrophoresis and the target product is 564 bp.

The following controls should be run with each assay: negative extraction control; positive control; no template control; internal PCR control.

4.4.3. Other nucleic acid amplification methods

None

4.5. Amplicon sequencing

Nucleotide sequencing of all conventional PCR amplicons (Section 4.4.2) is recommended as one of the final steps for confirmatory diagnosis. *Aphanomyces invadans*-specific sequences will share a high degree of nucleotide similarity to one of the published reference sequences for *A. invadans* (Genbank accession AF396684)

4.6. *In-situ* hybridisation

A fluorescent peptide nucleic acid *in-situ* hybridisation (FISH) technique has demonstrated a high specificity for *A. invadans*. The technique can directly detect the mycelia-like structure of the oomycete in thinly sliced tissues of affected organs of susceptible fish. The fluorescein (FLU) probe designed to hybridise the small subunit of the rRNA *A. invadans* (bp 621 to 635; GenBank acc. AF396684) is 5'-FLU-GTA-CTG-ACA-TTT-CGT-3' or Ainv-FLU3.

The *A. invadans*-affected tissue is fixed and hybridised as soon as possible after the fish are collected to minimise RNA degradation. Tissue (~20 mg) is dissected from the periphery of the lesions with sterile scalpel blades and placed in individual wells of a 24-well microtitre plate. One ml ethanol-saline fixative (44 ml of 95% ethanol, 10 ml of deionised H₂O, and 6 ml of 25 × SET buffer [3.75 M NaCl, 25 mM EDTA (ethylene diamine tetra-acetic acid), 0.5 M Tris/HCl, pH 7.8]) containing 3% polyoxyethyl-enesorbitan monolaurate (Tween 20) is added to enhance tissue permeabilisation. The microtitre plate is gently agitated at room temperature on an orbital shaker (30 rpm) for 1.5 hours. The fixed tissues are rinsed (twice for 15 minutes each time) with 0.5 ml of hybridisation buffer (5 × SET, 0.1% [v/v] Igepal-CA630 and 25 µg ml⁻¹ poly[A]) containing 3% Tween 20. The hybridisation buffer is removed, and the tissues are resuspended in 0.5 ml of hybridisation buffer containing 3% Tween 20 and 100 nM Ainv-FLU3 probe. "No-probe" control specimens are incubated with 0.5 ml of hybridisation buffer/3% Tween 20. All tissues are incubated at 60°C for 1 hour in the dark. Following incubation, the tissues are rinsed twice with 1 ml of pre-warmed (60°C) 5 × SET buffer containing 3% Tween 20 to remove residual probe. The tissue specimens are mounted onto poly-L-lysine-coated microscope slides. One drop of the light anti-fade solution is placed on the specimens, which are then overlaid with a cover-slip. Analyses are performed by light and epifluorescence microscopy. The camera and microscope settings for epifluorescent analyses are held constant so that comparative analyses of relative fluorescence intensity can be made between probed and non-probed specimens. The fluorescent oomycete hyphae appear as green fluorescence against the dark tissue background. The above detailed protocols are published by Vandersea *et al.* (2006). Using the FISH technique, *A. invadans* can be visualised very well in thinly sliced tissue compared with freshly squashed tissue.

4.7. Immunohistochemistry

None

4.8. Bioassay

Fish can be experimentally infected by intramuscular injection of 0.1 ml suspension of 100+ motile zoospores into fish susceptible to infection with *A. invadans* at 20°C. Histological growth of aseptate hyphae, 12–25 µm in diameter, should be demonstrated in the muscle of fish sampled after 7 days, and typical mycotic granulomas should be demonstrated in the muscle of fish sampled after 10–14 days.

4.9. Antibody or antigen detection methods

Polyclonal antibodies against *A. invadans* or *Aphanomyces* saprophyte showed cross-reactivity to each other using protein gel electrophoresis and Western blot analysis and immunohistochemistry. (Lilley *et al.*, 1997b). However, a specific monoclonal antibody against *A. invadans* developed later was found to have high specificity and high sensitivity to *A. invadans* using immunofluorescence. This monoclonal antibody could detect *A. invadans* hyphae at the early stage of infection (Miles *et al.*, 2003).

A monoclonal antibody-based flow-through immunoassay was developed by Adil *et al.* (2013). This assay was found to have high analytical (0.007mg ml⁻¹) and diagnostic specificity comparable to PCR.

4.10. Other methods

Serological methods for detection and identification of *A. invadans* in diseased specimens are not practical. If necessary, the monoclonal antibody offers a better specificity and sensitivity than polyclonal antibody for serological detection or identification of *A. invadans* in diseased specimens or in pathogen isolates.

5. Test(s) recommended for surveillance to demonstrate freedom in apparently healthy populations

The test for targeted surveillance to declare freedom from infection with *A. invadans* is examination of target populations for gross signs of infection with *A. invadans*. Surveys should be conducted during seasons that favour clinical manifestation of infection with *A. invadans* or when water temperatures are in the range 18–25°C.

Using the gross sign test for targeted surveillance, a large sample of the fish population should be examined live with a sample size sufficient to meet survey design assumptions as described in Chapter 1.4 of the Aquatic Code.

If fish show gross signs consistent with infection with *A. invadans*, they should be categorised as suspect fish, and the location/farm/compartments/zone should be considered suspect. Suspect specimens should be further tested using the methods listed under presumptive diagnosis followed by confirmative diagnosis as described in the Table 4.1.

6. Corroborative diagnostic criteria

This section only addresses the diagnostic test results for detection of infection in the absence (6.1) or presence of clinical signs (6.2) but does not evaluate whether the infectious agent is the cause of the clinical event.

The case definitions for suspect and confirmed cases have been developed to support decision making related to trade and confirmation of disease status at the country, zone or compartment level. Case definitions for disease confirmation in endemically affected areas may be less stringent.

6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status⁶

Apparently healthy populations may fall under suspicion, and therefore be sampled, if there is an epidemiological link(s) to an infected population. Geographical proximity to, or movement of animals or animal products or equipment, etc., from a known infected population equate to an epidemiological link. Alternatively, healthy populations are sampled in surveys to demonstrate disease freedom.

6.1.1. Definition of suspect case in apparently healthy populations

The presence of infection with *A. invadans* shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Observation of clinical signs consistent with infection with *A. invadans*
- ii) A positive result obtained by any of the diagnostic techniques described in Section 4.

6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy populations

The presence of infection with *A. invadans* is considered to be confirmed if one or more of the following criteria is met:

- i) Histopathology consistent with infection with *A. invadans* and positive result by PCR and amplicon sequencing
- ii) Histopathological changes consistent with infection with *A. invadans* and positive result for *in-situ* hybridisation
- iii) Artificial media culture and positive result by PCR and sequencing of the amplicon

6.2 Clinically affected animals

6.2.1. Definition of suspect case in clinically affected animals

The presence of infection with *A. invadans* shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Gross pathology or clinical signs associated with infection with *A. invadans* as described in this chapter, with or without elevated mortality
- ii) Positive result by a recommended molecular detection test
- iii) Histological changes consistent with infection with *A. invadans*
- iv) Visual observation (direct or by microscopy) of *A. invadans*
- v) Culture and isolation of *A. invadans*

6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

⁶ For example transboundary commodities.

The presence of infection with *A. invadans* is considered to be confirmed if one or more of the following criteria is met:

- i) Visualisation of hyphae under squash mounts and a positive result by PCR and sequencing of the amplicon
- ii) Histopathological changes consistent with infection with *A. invadans* and a positive result by PCR and sequencing of the amplicon
- iii) Histopathological changes consistent with infection with *A. invadans* and positive result for *in-situ* hybridisation
- iv) Artificial media culture and a positive result by PCR and sequencing of the amplicon
- v) Positive result for *in-situ* hybridisation and a positive result by PCR and sequencing of the amplicon

6.3. Diagnostic sensitivity and specificity for diagnostic tests [under study]

The diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis of infection with *A. invadans* is provided in Table 6.3.1. (**note:** no data are currently available). This information can be used for the design of surveys for infection with *A. invadans*, however, it should be noted that diagnostic performance is specific to the circumstances of each diagnostic accuracy study (including the test purpose, source population, tissue sample types and host species) and diagnostic performance may vary under different conditions. Data is only presented where tests are validated to at least level two of the validation pathway described in Chapter 1.1.2 and the information is available within published diagnostic accuracy studies.

6.3.1. For presumptive diagnosis of clinically affected animals

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation

15. DSe: = diagnostic sensitivity, DSp = diagnostic specificity, qPCR: = real-time polymerase chain reaction.

6.3.2. For surveillance of apparently healthy animals

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation

16. DSe: = diagnostic sensitivity, DSp = diagnostic specificity, qPCR: = real-time polymerase chain reaction.

7. References

ADIL B., SHANKAR K.M., NAVEEN KUMAR B.T., PATIL R., BALLYAYA A., RAMESH K.S., POOJARY S.R., BYADGI O.V. & SIRIYAPPAGOUDER P. (2013). Development and standardization of a monoclonal antibody-based rapid flow-through immunoassay for the detection of *Aphanomyces invadans* in the field. *J. Vet. Sci.*, **14**, 413–419.

AFZALI S.F., HASSAN M.D., ABDUL-RAHIM A.M., SHARIFPOUR I. & SABRI J. (2013). Isolation and identification of *Aphanomyces* species from natural water bodies and fish farms in Selangor, Malaysia. *Malaysian Appl. Biol.*, **42**, 21–31.

ANDREW T., HUCHZERMAYER K., MBEHA B. & NENGU S. (2008). Epizootic ulcerative syndrome affecting fish in the Zambezi river system in Southern Africa. *Vet. Rec.*, **163**, 629–632.

BALDOCK F.C., BLAZER V., CALLINAN R., HATAI K., KARUNASAGAR I., MOHAN C.V. & BONDAD-REANTASO M.G. (2005). Outcomes of a short expert consultation on epizootic ulcerative syndrome (EUS): Re-examination of causal factors, case definition and nomenclature. *In: Diseases in Asian Aquaculture V*, Walker P., Lester R. & Bondad-Reantaso M.G., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, 555–585.

- BALASURIYA L.K.S.W. (1994). Epizootic ulcerative syndrome in fish in Sri Lanka, country status report. *In: Proceeding of the ODA Regional Seminar on Epizootic Ulcerative*, Robert R.J., Campbell B. & MacRae I.H., eds. Aquatic Animal Health Research Institute, Bangkok, Thailand, pp 39–47.
- BLAZER V.S., VOGELBEIN W.K., DENSMORE C.L., MAY E.B., LILLEY J.H. & ZWERNER D.E. (1999). *Aphanomyces* as a cause of ulcerative skin lesions of menhaden from Chesapeake Bay tributaries. *J. Aquat. Anim. Health*, **11**, 340–349.
- BONDAD-REANTASO M.G., LUMANLAN S.C., NATIVIDAD J.M. & PHILLIPS M.J. (1992). Environmental monitoring of the epizootic ulcerative syndrome (EUS) in fish from Munoz, Nueva Ecija in the Philippines. *In: Diseases in Asian Aquaculture 1*, Shariff M., Subasinghe R.P. & Arthur J.R., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 475–490.
- CATAP E.S. & MUNDAY B.L. (1998). Effects of variations of water temperature and dietary lipids on the expression of experimental epizootic ulcerative syndrome (EUS) in sand whiting, *Sillago ciliata*. *Fish Pathol.*, **33**, 327–335.
- CAVALIER-SMITH T. & CHAO E.E.Y. (2006). Phylogeny and Megasystematics of Phagotrophic Heterokonts (Kingdom Chromista). *J. Mol. Evol.*, **62**, 388–420.
- CHINABUT S. & ROBERTS R.J. (1999). Pathology and Histopathology of Epizootic Ulcerative Syndrome (EUS). Aquatic Animal Health Research Institute, Department of Fisheries, Royal Thai Government, Bangkok, Thailand, 33 pp. ISBN 974-7604-55-8.
- CHINABUT S., ROBERTS R.J., WILLOUGHBY G.R. & PEARSON M.D. (1995) Histopathology of snakehead, *Channa striatus* (Bloch), experimentally infected with the specific *Aphanomyces* fungus associated with epizootic ulcerative syndrome (EUS) at different temperatures. *J. Fish Dis.*, **18**, 41–47.
- CRUZ-LACIERDA E.R. & SHARIFF M. (1995). Experimental transmission of epizootic ulcerative syndrome (EUS) in snakehead, *Ophicephalus striatus*. *Dis. Asian Aquac.*, **II**, 327–336.
- DIEGUEZ-URIBEONDO J., GARCIA M.A., CERENIUS L., KOZUBÍKOVÁ E., BALLESTEROS I., WINDELS C., WEILAND J., KATOR H., SÖDERHÄLL K. & MARTÍN M.P. (2009). Phylogenetic relationships among plant and animal parasites, and saprotrophs in *Aphanomyces* (Oomycetes). *Fungal Genetics and Biology*, **46**, 365–376.
- EGUSA S. & MASUDA N. (1971). A new fungal disease of *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathol.*, **6**, 41–46.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY EFSA (2011a). Scientific Opinion on Epizootic Ulcerative Syndrome. *EFSA J.*, **9**, 2387.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2011b). Report of the technical hearing meeting on Epizootic Ulcerative Syndrome (EUS). *EFSA Support. Publ.*, **8**, 1–16.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) (1986). Report of the expert consultation on ulcerative fish diseases in the Asia-Pacific region (TCP/RAS/4508). Bangkok, August 1986. FAO, Regional Office for Asia and the Pacific, Bangkok, Thailand.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) (2009). Report of the international emergency disease investigation task force on a serious fish disease in Southern Africa, 18–26 May 2007, FAO, Rome, Italy, 70 pp.
- FRASER G.C., CALLINAN R.B. & CALDER L.M. (1992). *Aphanomyces* species associated with red spot disease: an ulcerative disease of estuarine fish from eastern Australia. *J. Fish Dis.*, **15**, 173–181.
- GOMO C., HANYIRE T., MAKAYA P. & SIBANDA S. (2016). Outbreak of epizootic ulcerative syndrome (EUS) in *Seranochromis robustus* fish species in Darwendale dam, Zimbabwe. *African J. Fish. Sci.*, **4**, 204–205.
- HANJAVANIT C. (1997). Mycotic granulomatosis found in two species of ornamental fishes imported from Singapore. *Mycoscience*, **38**, 433–436.
- HATAI K. & EGUSA S. (1979). Studies on pathogenic fungus of mycotic granulomatosis III. Development of the medium for MG-fungus. *Fish Pathol.*, **13**, 147–152.
- HATAI K., EGUSA S., TAKAHASHI S. & OOE K. (1977). Study on the pathogenic fungus of mycotic granulomatosis – I. Isolation and pathogenicity of the fungus from cultured-ayu infected with the disease. *Fish Pathol.*, **12**, 129–133.

- HATAI K., NAKAMURA K., AN RHA S., YUASA K. & WADA S. (1994). *Aphanomyces* infection in dwarf gourami (*Colisa lalia*). *Fish Pathol.*, **29**, 95–99.
- HAWKE J.P., GROOTERS A.M. & CAMUS A.C. (2003). Ulcerative Mycosis Caused by *Aphanomyces invadans* in Channel Catfish, Black Bullhead, and Bluegill from Southeastern Louisiana. *J. Aquat. Anim. Health.*, **15**, 120–127.
- HERBERT B., JONES J.B.B., MOHAN C.V. V. & PERERA R.P.P. (2019). Impacts of epizootic ulcerative syndrome on subsistence fisheries and wildlife. *Rev. Sci. Tech.*, **38**, 459–475.
- HUCHZERMAYER C.F., HUCHZERMAYER K.D.A., CHRISTISON K.W., MACEY B.M., COLLY P.A., HANG'OMBE B.M. & SONGE M.M. (2018). First record of epizootic ulcerative syndrome from the Upper Congo catchment: An outbreak in the Bangweulu swamps, Zambia. *J. Fish Dis.*, **41**, 87–94.
- HUCHZERMAYER K.D.A. & VAN DER WAAL B.C.W. (2012). Epizootic ulcerative syndrome: Exotic fish disease threatens Africa's aquatic ecosystems. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, **83**, 1–6.
- IBERAHIM N.A., TRUSCH F. & VAN WEST P. (2018). *Aphanomyces invadans*, the causal agent of Epizootic Ulcerative Syndrome, is a global threat to wild and farmed fish. *Fungal Biol. Rev.*, **44**, 1–13.
- KHAN M.H., MARSHALL L., THOMPSON K.D., CAMPBELL R.E. & LILLEY J.H. (1998). Susceptibility of five fish species (Nile tilapia, rosy barb, rainbow trout, stickleback and roach) to intramuscular injection with the *Oomycete* fish pathogen, *Aphanomyces invadans*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **18**, 192–197.
- KIRYU Y., SHIELDS J.D., VOGELBEIN W.K., KATOR H. & BLAZER V.S. (2003). Infectivity and pathogenicity of the oomycete *Aphanomyces invadans* in Atlantic menhaden *Brevoortia tyrannus*. *Dis. Aquat. Org.*, **54**, 135–146.
- KUMAR P., SARKAR P., STEFI RAJU V., MANIKANDAN V., GURU A., ARSHAD A., ELUMALAI P. & AROCKIARAJ J. (2020). Pathogenicity and Pathobiology of Epizootic Ulcerative Syndrome (EUS) Causing Fungus *Aphanomyces invadans* and Its Immunological Response in Fish. *Rev. Fish. Sci. Aquac.*, **28**, 358–375.
- LILLEY J.H., CALLINAN R.B., CHINABUT S., KANCHANAKHAN S., MACRAE I.H., PHILLIPS M.J., FALLIS A., LILLEY J.H., CALLINAN R.B., CHINABUT S., KANCHANAKHAN S., MACRAE I.H. & PHILLIPS M.J. (1998). Epizootic ulcerative syndrome (EUS) technical handbook. Bangkok: The Aquatic Animal Health Research Institute.
- LILLEY J.H., HART D., PANYAWACHIRA V., KANCHANAKHAN S., CHINABUT S., SÖDERHÄLL K. & CERENIUS L. (2003). Molecular characterization of the fish-pathogenic fungus *Aphanomyces invadans*. *J. Fish Dis.*, **26**, 263–275.
- LILLEY J.H., HART D., RICHARDS R.H., ROBERTS R.J., CERENIUS L. & SODERHALL K. (1997a). Pan-Asian spread of single fungal clone results in large scale fish kills. *Vet. Rec.*, **140**, 653–654.
- LILLEY J.H., PETCHINDA T. & PANYAWACHIRA V. (2001). *Aphanomyces invadans* zoospore physiology: 4. *In vitro* viability of cysts. *The AAHRI Newsletter*, **10**, 1–4.
- LILLEY J.H. & ROBERTS R.J. (1997). Pathogenicity and culture studies comparing the *Aphanomyces* involved in epizootic ulcerative syndrome (EUS) with other similar fungi. *J. Fish Dis.*, **20**, 135–144.
- LILLEY J.H., THOMPSON K.D. & ADAMS A. (1997b). Characterization of *Aphanomyces invadans* by electrophoretic and Western blot analysis. *Dis. Aquat. Org.*, **30**, 187–197.
- LUMANLAN-MAYO S.C., CALLINAN R.B., PACLIBARE J.O., CATAP E.S. & FRASER, G.C. (1997). Epizootic ulcerative syndrome (EUS) in rice-fish culture systems: an overview of field experiments 1993-1995. *In: Diseases in Asian Aquaculture III*, Flegel T.W. & MacRae I.H., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 129–138.
- MCHUGH K.J., CHRISTISON K.W., WEYL O.L.F. & SMIT N.J. (2014). Histological Confirmation of Epizootic Ulcerative Syndrome in Two Cyprinid Species from Lake Liambezi, Zambezi Region, Namibia. *African Zool.*, **49**, 311–316.
- MCKENZIE R.A. & HALL W.T.K. (1976). Dermal ulceration of mullet (*Mugil cephalus*). *Aust. Vet. J.*, **52**, 230–231.
- MILES D.J.V., POLCHANA J., LILLEY J.H., KANCHANAKHAN S., THOMPSON K.D. & ADAMS A. (2001). Immunostimulation of striped snakehead *Channa striata* against epizootic ulcerative syndrome. *Aquaculture*, **195**, 1–15.

- MILES D.J.C., THOMPSON K.D., LILLEY J.H. & ADAMS A. (2003). Immunofluorescence of the epizootic ulcerative syndrome pathogen, *Aphanomyces invadans*, using a monoclonal antibody. *Dis. Aquat. Org.*, **55**, 77–84.
- NOGA E.J. & DYKSTRA M.J. (1986). Oomycete fungi associated with ulcerative mycosis in menhaden, *Brevoortia tyrannus* (Latrobe). *J. Fish Dis.*, **9**, 47–53.
- OIDTMANN B. (2012). Review of biological factors relevant to import risk assessments for epizootic ulcerative syndrome (*Aphanomyces invadans*). *Transbound. Emerg. Dis.*, **59**, 26–39.
- OIDTMANN B., STEINBAUER GEIGER S. & HOFFMANN R.W. (2008). Experimental infection and detection of *Aphanomyces invadans* in European catfish, rainbow trout and European eel. *Dis. Aquat. Org.*, **82**, 185–207.
- PAGRUT N.K., GANGULY S., JAISWAL V. & SINGH C. (2017). An overview on epizootic ulcerative syndrome of fishes in India: A comprehensive report. *J. Entomol. Zool. Stud.*, **5**, 1941–1943.
- PHADEE P., KURATA O. & HATAI K. (2004a). A PCR method for the detection of *Aphanomyces piscicida*. *Fish Pathol.*, **39**, 25–31.
- PHADEE, P., KURATA, O., HATAI K., HIRONO I. & AOKI T. (2004b). Detection and identification of fish-pathogenic *Aphanomyces piscicida* using polymerase chain reaction (PCR) with species-specific primers. *J. Aquat. Anim. Health*, **16**, 220–230.
- PRADHAN P.K., MOHAN C.V., SHANKAR K.M., KUMAR B.M. & DEVARAJA G. (2007). Yearlings of Indian major carps resist infection against the epizootic ulcerative syndrome pathogen, *Aphanomyces invadans*. *Current Science*, **92**, 1430–1434.
- TONGUTHAI K. (1985). A preliminary account of ulcerative fish diseases in the Indo-Pacific region (a comprehensive study based on Thai experiences). National Inland Fisheries Institute, Bangkok, Thailand, 39 pp.
- TSUI C.K.M., MARSHALL W., YOKOYAMA R., HONDA D., LIPPMEIER J.C., CRAVEN K.D., PETERSON P.D. & BERBEE M.L. (2009). Labyrinthulomycetes phylogeny and its implications for the evolutionary loss of chloroplasts and gain of ectoplasmic gliding. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **50**, 129–140.
- VANDERSEA M.W., LITAKER R.W., YONNISH B., SOSA E., LANDSBERG J.H., PULLINGER C., MOON-BUTZIN P., GREEN J., MORRIS J.A., KATOR H., NOGA E.J. & TESTER P.A. (2006). Molecular assays for detecting *Aphanomyces invadans* in ulcerative mycotic fish lesions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 1551–1557.
- VISHWANATH T., MOHAN C. & SHANKAR K. (1998). Epizootic Ulcerative Syndrome (EUS), associated with a fungal pathogen, in Indian fishes: histopathology – ‘a cause for invasiveness’. *Aquaculture*, **165**, 1–9.
- WADA S., AN RHA S., KONDOH T., SUDA H., HATAI K. & ISHII H. (1996). Histopathological comparison between ayu and carp artificially infected with *Aphanomyces piscicida*. *Fish Pathol.*, **31**, 71–80.
- WILLOUGHBY L.G. & ROBERTS R.J. (1994). Improved methodology for isolation of the *Aphanomyces* fungal pathogen of epizootic ulcerative syndrome (EUS) in Asian fish. *J. Fish Dis.*, **17**, 541–543.

*
* *

NB: There is currently (2022) no OIE Reference Laboratories for infection with *Aphanomyces invadans* (see Table at the end of this *Aquatic Manual* or consult the OIE web site for the most up-to-date list: <https://www.oie.int/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>).

NB: FIRST ADOPTED IN 1995 AS EPIZOOTIC ULCERATIVE SYNDROME;
MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2013.

[Volver al orden del día](#)

CHAPTER 2.3.2.

INFECTION WITH EPIZOOTIC HAEMATOPOIETIC NECROSIS VIRUS

1. Scope

Infection with epizootic haematopoietic necrosis virus means infection with the pathogenic agent *epizootic haematopoietic necrosis virus* (EHNV) of the Genus *Ranavirus* of the Family *Iridoviridae*.

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent

EHNV is a species of the genus *Ranavirus* in the Family *Iridoviridae* (Chinchar *et al.*, 2005). In addition to fish, ranaviruses have been isolated from healthy or diseased frogs, salamanders and reptiles in America, Europe and Australia (Chinchar, 2002; Drury *et al.*, 2002; Fijan *et al.*, 1991; Hyatt *et al.*, 2002; Speare & Smith, 1992; Whittington *et al.*, 2010; Wolf *et al.*, 1968; Zupanovic *et al.*, 1998). Ranaviruses have large (150–180 nm), icosahedral virions, a double-stranded DNA genome 150–170 kb, and replicate in both the nucleus and cytoplasm with cytoplasmic assembly (Chinchar *et al.*, 2005).

Since the recognition of disease due to EHNV in Australia in 1986, similar systemic necrotising iridovirus syndromes have been reported in farmed fish. These include catfish (*Ictalurus melas*) in France (European catfish virus, ECV) (Pozet *et al.*, 1992), sheatfish (*Silurus glanis*) in Germany (European sheatfish virus, ESV) (Ahne *et al.*, 1989; 1990), turbot (*Scophthalmus maximus*) in Denmark (Bloch & Larsen, 1993), and cod (*Gadus morhua*) in Denmark (Cod iridovirus, CodV) (Ariel *et al.*, 2010). EHNV, ECV, ESV, and CodV share >98% nucleotide identity across concatenated sequences across the RNR- α , DNAPol, RNR- β , RNase II and MCP gene regions (Ariel *et al.*, 2010).

EHNV and ECV can be differentiated using genomic analysis (Ahne *et al.*, 1998; Holopainen *et al.*, 2009; Hyatt *et al.*, 2000; Mao *et al.*, 1996; 1997; Marsh *et al.*, 2002). This enables epidemiological separation of disease events in finfish in Australia (EHNV) and Europe (ECV), and differentiation of these from ranavirus occurrences in amphibians.

2.1.2. Survival and stability in processed or stored samples

EHNV can persist in frozen fish tissues for more than 2 years (Langdon, 1989) and frozen fish carcasses for at least a year (Whittington *et al.*, 1996).

2.1.3. Survival and stability outside the host

EHNV is resistant to drying and remained infective for 97 days at 15°C and 300 days at 4°C in water (Langdon, 1989). For these reasons, it is presumed that EHNV would persist for months to years on a fish farm in water and sediment, as well as on plants and equipment.

For inactivation methods, see Section 2.4.5.

2.2. Host factors

2.2.1. Susceptible host species

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with EHNV according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code)* are:

Family	Scientific name	Common name
Esocidae	<i>Esox lucius</i>	Northern pike
Galaxiidae	<i>Galaxias olidus</i>	Mountain galaxias
Ictaluridae	<i>Ameiurus melas</i>	Black bullhead
Melanotaeniidae	<i>Melanotaenia fluviatilis</i>	Crimson spotted rainbow fish
Percidae	<i>Perca fluviatilis</i>	European perch
	<i>Sander lucioperca</i>	Pike-perch
Percichthyidae	<i>Macquaria australasica</i>	Macquarie perch
Poeciliidae	<i>Gambusia holbrooki</i>	Eastern mosquito fish
	<i>Gambusia affinis</i>	Mosquito fish
Salmonidae	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Rainbow trout
Terapontidae	<i>Bidyanus bidyanus</i>	Silver perch

2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility

Species for which there is incomplete evidence to fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with EHNV according to Chapter 1.5 of the *Aquatic Code* are: none known.

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results have been reported in the following organisms, but an active infection has not been demonstrated: Atlantic salmon (*Salmo salar*), freshwater catfish (*Tandanus tandanus*), golden perch (*Macquaria ambigua*), Murray cod (*Maccullochella peelii*) and purple spotted gudgeon (*Mogurnda adspersa*).

2.2.3. Likelihood of infection by species, host life stage, population or sub-populations

Natural infections and disease have been limited to European perch (*Perca fluviatilis*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Australia. The disease is more severe in European perch and in juveniles compared with adult fish (Whittington *et al.*, 2010). There are no descriptions of infection of eggs or early life stages of any other fish species.

For the purposes of Table 4.1, larvae and fry up to approximately 5 g in weight may be considered to be early life stages, fingerlings and grower fish up to 500 g may be considered to be juveniles, and fish above 500 g may be considered to be adults.

2.2.4. Distribution of the pathogen in the host

Target organs and tissues infected with the virus are kidney, spleen and liver. It is not known if EHNV can be detected in gonadal tissues, ovarian fluid or milt or whether these tissues are suitable for surveillance of broodstock.

2.2.5. Aquatic animal reservoirs of infection

Rainbow trout: The high case fatality rate and low prevalence of infection with EHNV in natural infections in rainbow trout means that the recruitment rate of carriers is likely to be very low (<2%) (Whittington *et al.*, 1994). EHNV has been detected in growout fish but histopathological lesions consistent with infection with EHNV indicated an active infection rather than a carrier state (Whittington *et al.*, 1999). Anti-EHNV serum antibodies were not detected in fingerlings during or after an outbreak but were detected in a low proportion of growout fish, hence, it is uncertain whether these were survivors of the outbreak (Whittington *et al.*, 1994; 1999). There are data for European stocks of rainbow trout in experimental infections where potential carriers were identified (Ariel & Bang Jensen, 2009).

European perch: EHNV was isolated from 2 of 40 apparently healthy adult European perch during epizootics in juveniles in Victoria, Australia (Langdon & Humphrey, 1987), but as the incubation period extends for up to 28 days (Whittington & Reddacliff, 1995), these fish may have been in the preclinical phase.

2.2.6. Vectors

Birds are potential vectors for EHNV, it being carried in the gut, on feathers, feet and the bill (Whittington *et al.*, 1996).

2.3. Disease pattern

2.3.1. Mortality, morbidity and prevalence

Rainbow trout: It appears that under natural farm conditions EHN_V is poorly infective but once infected, most fish succumb to the disease has a high case fatality rate. Infection with EHN_V may be present on a farm without causing suspicion because the mortality rate may not rise above the usual background rate. Infection with EHN_V has most often been reported in young fingerlings <125 mm fork length with daily mortality of less than 0.2% and total mortality of up to 4%. However, rainbow trout of all ages may be susceptible, although infection has not yet been seen in broodstock (Whittington *et al.*, 1994; 1999). There is a low direct economic impact because of the low mortality rate. Differences in susceptibility between European and Australian stocks of rainbow trout may exist (Ariel & Bang Jensen, 2009).

European perch: There is a very high rate of infection and mortality in natural outbreaks that, over time, leads to loss in wild fish populations (Langdon & Humphrey, 1987; Langdon *et al.*, 1986; Whittington *et al.*, 1996). Experimental bath inoculation with as few as 0.08 TCID₅₀ ml⁻¹ was lethal, and doses too low to be detected by virus isolation in BF-2 cells were fatal by intraperitoneal inoculation (Whittington & Reddacliff, 1995). Differences in susceptibility between European and Australian stocks of European perch may exist (Ariel & Bang Jensen, 2009).

2.3.2. Clinical signs, including behavioural changes

Moribund fish may have loss of equilibrium, flared opercula and may be dark in colour (Reddacliff & Whittington, 1996). Clinical signs are usually more obvious in fingerlings and juvenile fish than adults of both rainbow trout and European perch. There may be clinical evidence of poor husbandry practices, such as overcrowding and suboptimal water quality, manifesting as skin, fin and gill lesions (Reddacliff & Whittington, 1996).

2.3.3 Gross pathology

There may be no gross lesions in affected fish. A small proportion of fish may have enlargement of kidney, liver or spleen. There may be focal white to yellow lesions in the liver corresponding to areas of necrosis (Reddacliff & Whittington, 1996).

2.3.4. Modes of transmission and life cycle

Rainbow trout: EHN_V has spread between rainbow trout farms by transfer of infected fingerlings and probably transport water (Langdon *et al.*, 1988; Whittington *et al.*, 1994; 1999). The low prevalence of infection in rainbow trout means that active infection can easily go unrecognised in a population and be spread by trading fish. There are no data on possible vertical transmission of EHN_V on or within ova, and disinfection protocols for ova have not been evaluated. EHN_V has not yet been isolated from ovarian tissues or from broodstock. Annual recurrence in farmed rainbow trout may be due to reinfection of successive batches of fish or from wild European perch present in the same catchment.

European perch: The occurrence of infection with EHN_V in European perch in widely separated river systems and impoundments suggested that EHN_V was spread by translocation of live fish or bait by recreational fishers (Whittington *et al.*, 2010).

The route of infection is unknown. European perch and rainbow trout are susceptible to immersion exposure. The virus infects a range of cell types including hepatocytes, haematopoietic cells and endothelial cells in many organs (Reddacliff & Whittington, 1996). Virus is shed into water from infected tissues and carcasses as they disintegrate.

2.3.5. Environmental factors

Rainbow trout: Outbreaks appear to be related to poor husbandry, particularly overcrowding, inadequate water flow and fouling of tanks with feed. Damage to skin may provide a route of entry for EHN_V. Outbreaks have been seen on farms at water temperatures ranging from 11 to 20°C (Whittington *et al.*, 1994; 1999). The incubation period after intraperitoneal inoculation was 3–10 days at 19–21°C compared with 14–32 days at 8–10°C (Whittington & Reddacliff, 1995).

European perch: Natural epizootics of infection with EHN_V affecting juvenile and adult European perch occur mostly in summer (Langdon & Humphrey, 1987; Langdon *et al.*, 1986; Whittington *et al.*, 1994). It has been assumed that the disease in juvenile fish is related to the annual appearance of large numbers of non-immune young fish and their subsequent exposure to the virus while schooling in shallow waters; adults are uncommonly involved in these outbreaks. It is possible that environmental temperature is the trigger for outbreaks as juvenile fish feed in warm shallow waters on planktonic fauna, whereas adults

feed on benthic invertebrates and larger prey in deeper cooler water (Whittington & Reddacliff, 1995). Experimentally, the incubation period ranged from 10 to 28 days at 12–18°C compared with 10–11 days at 19–21°C, and adult perch were refractory to infection at temperatures below 12°C (Whittington & Reddacliff, 1995). European stocks of European perch also displayed temperature-dependent susceptibility (Ariel & Bang Jensen, 2009).

2.3.6. Geographical distribution

Infection with EHNV has been reported from rainbow trout farms within two river catchments in New South Wales, Australia (Whittington *et al.*, 2010). Infection with EHNV is endemic in south-eastern Australia, with a discontinuous distribution (Whittington *et al.*, 2010).

See WAHIS (<https://wahis.oie.int/#/home>) for recent information on distribution at the country level.

2.4. Biosecurity and disease control strategies

Not available.

2.4.1. Vaccination

None available.

2.4.2. Chemotherapy including blocking agents

None available.

2.4.3. Immunostimulation

None available.

2.4.4. Breeding resistant strains

There has been no formal breeding programme for resistant strains of susceptible species. However, experimental trials using a bath exposure have shown that European perch from water bodies in New South Wales, Australia with previous EHNV infections showed lower mortality compared with European perch from neighbouring and distant water bodies in Australia that have no previous history of EHNV (Becker *et al.*, 2016).

2.4.5. Inactivation methods

EHNV is susceptible to 70% ethanol, 200 mg litre⁻¹ sodium hypochlorite or heating to 60°C for 15 minutes (Langdon, 1989). Data for the inactivation of amphibian ranavirus may also be relevant: 150 mg/litre chlorhexidine and 200 mg/litre potassium peroxydisulphate were effective after 1 minute contact time (Bryan *et al.*, 2009). If it is first dried, EHNV in cell culture supernatant is resistant to heating to 60°C for 15 minutes (Whittington *et al.*, 2010).

2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

Not tested.

2.4.7. General husbandry

Disease control in rainbow trout at the farm level relies on reducing the impact of infection by maintaining low stocking rates and adequate water quality. Investigations on one rainbow trout farm indicated that ponds with high stocking rates and low water flow, and thus poorer water quality, may result in higher levels of clinical disease compared with ponds on the same farm with lower stocking rates and higher water flow (Whittington *et al.*, 1994). The mechanism of protection may be through maintenance of healthy integument (Whittington *et al.*, 1994).

3. Specimen selection, sample collection, transportation and handling

This section draws on information in Sections 2.2, 2.3 and 2.4 to identify populations, individuals and samples which are most likely to be infected.

3.1. Selection of populations and individual specimens

Clinical inspections should be carried out during a period when water temperature is conducive to development of clinical disease (see Section 2.3.5). All production units (ponds, tanks, etc.) should be inspected for the presence of dead, weak or abnormally behaving fish. For the purposes of disease surveillance, fish to be sampled are selected as follows:

- i) The most susceptible species (e.g. rainbow trout and European perch) should be sampled preferentially. Other susceptible species listed in Section 2.2.1 should be sampled proportionally.
- ii) Risk-based criteria should be employed to preferentially sample lots or populations with a history of abnormal mortality, potential exposure events or where there is evidence of poor water quality or husbandry. If more than one water source is used for fish production, fish from all water sources should be included in the sample.
- iii) If weak, abnormally behaving or freshly dead fish are present, such fish should be selected. If such fish are not present, the fish selected should include normal appearing, healthy fish collected in such a way that all parts of the farm as well as all year classes are proportionally represented in the sample.

For disease outbreak investigations, moribund fish or fish exhibiting clinical signs of infection with EHNV should be collected. Ideally fish should be collected while alive, however recently dead fish can also be selected for diagnostic testing. It should be noted however, that there will be a significant risk of contamination with environmental bacteria if the animals have been dead for some time.

3.2. Selection of organs or tissues

Liver, anterior kidney and spleen from individual fish are pooled (Jaramillo *et al.*, 2012).

3.3. Samples or tissues not suitable for pathogen detection

Inappropriate tissues include gonads, gonadal fluids, milt and ova, ~~since~~ because there is no evidence of reproductive tract infection.

3.4. Non-lethal sampling

~~Non-lethal~~ samples (blood, fin, gill, integument or mucous) are unsuitable for testing ~~EHNV~~.

3.5. Preservation of samples for submission

For guidance on sample preservation methods for the intended test methods, see Chapter 2.3.0.

3.5.1. Samples for pathogen isolation

For recommendations on transporting samples for virus isolation to the laboratory, see Section B.2.4 of Chapter 2.3.0 *General information (diseases of fish)*.

3.5.2. Preservation of samples for molecular detection

~~Tissue samples for PCR testing should be preserved in 70-90% (v/v) analytical/reagent-grade (undenatured) ethanol. The recommended ratio of ethanol to tissue is 10:1 based on studies in terrestrial animal and human health. The use of lower grade (laboratory or industrial grade) ethanol is not recommended. If material cannot be fixed it may be frozen. Standard sample collection, preservation and processing methods for molecular techniques can be found in Section B.2.5 of Chapter 2.3.0. General information (diseases of fish).~~

3.5.3. Samples for histopathology, immunohistochemistry or *in-situ* hybridisation

~~Tissue samples for histopathology should be fixed immediately after collection in 10% neutral buffered formalin. The recommended ratio of fixative to tissue is 10:1. Standard sample collection, preservation and processing methods for histological techniques can be found in Section 2.2 of Chapter 2.3.0. General information (diseases of fish).~~

3.5.4. Samples for other tests

Not recommended for routine diagnostic testing.

3.6. Pooling of samples

Pooling of samples from more than one individual animal for a given purpose should only be recommended where robust supporting data on diagnostic sensitivity and diagnostic specificity have been evaluated and found to be suitable. If the effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been thoroughly evaluated, larger fish should be processed and tested individually. Small life stages such as fry or specimens can be pooled to provide the minimum amount of material needed for testing. If pooling is used, it is recommended to pool organ pieces from a maximum of five fish.

4. Diagnostic methods

The methods currently available for identifying infection pathogen detection that can be used in i) surveillance of apparently healthy populations animals, ii) presumptive diagnosis in clinically affected animals and iii) confirmatory diagnostic purposes are listed in Table 4.1. by animal life stage.

~~The designations used in the Table indicate:~~

~~**Ratings against for purposes of use.** For each recommended assay a qualitative rating against for the purpose of use is provided. The ratings are determined based on multiple performance and operational factors relevant to application of an assay for a defined purpose. These factors include appropriate diagnostic performance characteristics, level of assay validation, successful application by diagnostic laboratories, availability, cost, timeliness, and sample throughput and operability. For a specific purpose of use, assays are rated as:~~

~~Key:~~

- ~~+++ = Most suitable Methods —are most suitable with~~ desirable performance and operational characteristics.
- ~~++ = Suitable Method(s) are suitable with~~ acceptable performance and operational characteristics under most circumstances.
- ~~+ = Less suitable Methods —are suitable, but~~ performance or operational characteristics may significantly limit application under some circumstances.
- ~~Shaded boxes =~~ Not appropriate for this purpose.

~~The selection of a test for a given purpose depends on the analytical and diagnostic sensitivities and specificities repeatability and reproducibility. OIE Reference Laboratories welcome feedback on diagnostic performance for assays, in particular PCR methods, for factors affecting assay analytical sensitivity or analytical specificity, such as tissue components inhibiting amplification, presence of nonspecific or uncertain bands, etc., and any assays that are in the +++ category.~~

~~**Validation stage.** The validation stage corresponds to the assay development and validation pathway in chapter 1.1.2. The validation stage is specific to each purpose of use. Where available, information on the diagnostic performance of recommended assays is provided in Section 6.3.~~

~~OIE Reference Laboratories welcome feedback on diagnostic performance of recommended assays, in particular PCR methods. Of particular interest are any factors affecting expected assay sensitivity (e.g. tissue components inhibiting amplification) or expected specificity (e.g. failure to detect particular genotypes, detection of homologous sequences within the host genome). These issues should be communicated to the OIE Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.~~

Table 4.1. OIE recommended diagnostic methods and their level of validation for surveillance of apparently healthy animals and investigation of clinically affected animals

Method	A. Surveillance of apparently healthy animals				B. Presumptive diagnosis of clinically affected animals				C. Confirmatory diagnosis ¹ of a suspect result from surveillance or presumptive diagnosis			
	Early life stages ²	Juveniles ²	Adults	LV	Early life stages ²	Juveniles ²	Adults	LV	Early life stages ²	Juveniles ²	Adults	LV
Wet mounts												
Histopathology					++	++	++	1				
Cytopathology												
Cell culture	+++	+++	+++	2	+++	+++	+++	2	<u>++</u>	<u>++</u>	<u>++</u>	<u>2</u>
Immunohistochemistry					+	+	+	1				
Real-time PCR	+++	+++	+++	2	+++	+++	+++	2	<u>++</u>	<u>++</u>	<u>++</u>	<u>2</u>
Conventional PCR	+	+	+	1	++	++	++	1	<u>++</u>	<u>++</u>	<u>++</u>	<u>1</u>
Amplicon sequencing									+++	+++	+++	<u>3-1</u>
<i>In-situ</i> hybridisation												
Bioassay												
LAMP												
Ab-ELISA			+	1								
Ag-ELISA	+	+	+	1	+	+	+	1				
Other antigen detection methods ³												
Other method ³												

LV = level of validation, refers to the stage of validation in the OIE Pathway (chapter 1.1.2); PCR = polymerase chain reaction; LAMP = loop-mediated isothermal amplification;

Ab- or Ag-ELISA = antibody or antigen enzyme-linked immunosorbent assay, respectively.

¹For confirmatory diagnoses, methods need to be carried out in combination (see Section 6). ²Susceptibility of early and juvenile life stages is described in Section 2.2.3.

³Specify the test used. Shading indicates the test is inappropriate or should not be used for this purpose.

4.1. Wet mounts

Not applicable.

4.2. Histopathology and cytopathology

Light microscopy: routine methods can be used for tissue fixation, such as in 10% buffered neutral formalin, paraffin embedding, preparation of 4–10 µm sections and staining with H&E to demonstrate tissue necrosis and basophilic intracytoplasmic inclusion bodies. These inclusion bodies are indicative but not confirmatory for infection with EHN. Formalin-fixed paraffin-embedded sections can also be stained using an immunoperoxidase method (see below) to identify EHN antigen associated with necrotic lesions.

Acute focal, multifocal or locally extensive coagulative or liquefactive necrosis of liver, haematopoietic kidney and spleen are commonly seen in routine haematoxylin and eosin (H&E)-stained sections of formalin-fixed material. A small number of basophilic intracytoplasmic inclusion bodies may be seen, particularly in areas immediately surrounding necrotic areas in the liver and kidney. Necrotic lesions may also be seen in heart, pancreas, gastrointestinal tract, gill and pseudobranch (Reddacliff & Whittington, 1996).

Affected tissues (e.g. kidney, liver and spleen) contain cells exhibiting necrosis. Cells contain conspicuous cytoplasmic inclusions that are rarefied areas of the cytoplasm in which the viruses are assembled. ~~Within the cytoplasm, aggregates (paracrystalline arrays) of large (175 nm ± 6 nm) nonenveloped icosahedral viruses are apparent; single viruses are also present. Complete viruses (containing electron dense cores) bud/egress from the infected cells through the plasma membrane.~~ The nuclei of infected cells are frequently located peripherally and are distorted in shape.

4.3. Cell culture for isolation

4.3.1. Preparation of fish tissues for virus isolation

A simple method for preparation of fish tissues for cell culture and ELISA has been validated (Whittington & Steiner, 1993) (see sampling Section 3).

- i) Freeze tubes containing tissues at –80°C until needed.
- ii) Add 0.5 ml of homogenising medium (minimal essential medium Eagle, with Earle's salts with glutamine] [MEM] with 200 International Units [IU] ml⁻¹ penicillin, 200 µg ml⁻¹ streptomycin and 4 µg ml⁻¹ amphotericin B) to each tube. Grind tissue to a fine mulch with a sterile fitted pestle.
- iii) Add another 0.5 ml of homogenising medium to each tube and mix with a pestle.
- iv) Add three sterile glass beads to each tube (3 mm diameter) and close the lid of the tube.
- v) Vortex the suspension vigorously for 20–30 seconds and place at 4°C for 2 hours.
- vi) Vortex the suspension again as above and centrifuge for 10 minutes at 2500 **g** in a benchtop microcentrifuge.
- vii) Transfer the supernatant, now called clarified tissue homogenate, to a fresh sterile tube. Homogenates may be frozen at –80°C until required for virus isolation and ELISA.

4.3.2. Cell culture/~~artificial media~~

EHN ~~grows replicates~~ well in many fish cell lines including BF-2 (bluegill fry ATCC CCL 91), FHM (fathead minnow; ATCC CCL 42), EPC (*epithelioma papulosum cyprini* [Cinkova *et al.*, 2010]), and CHSE-214 (Chinook salmon embryo cell line; ATCC CRL 1681) at temperatures ranging from 15 to 22°C (Crane *et al.*, 2005). Incubation temperatures of 20°C or 24°C result in higher titres than 15°C; 22°C and BF-2 EPC or CHSE-214 cells are recommended to maximise titres, which might be important for the detection of low numbers of viruses in fish tissues (Ariel *et al.*, 2009). BF-2 cells are preferred by the OIE Reference Laboratory with an incubation temperature of 22°C. The procedure for BF-2 cells is provided below. A procedure for CHSE-214 cells is provided under immunoperoxidase staining below (Section 4.7). The identity of viruses in cell culture is determined by immunostaining, ELISA, immuno-electron microscopy, PCR or other methods.

4.3.3. Cell culture technical procedure

Samples: tissue homogenates.

Cells are cultured (in flasks, tubes or multi-well plates) with growth medium (MEM + 10% fetal calf bovine serum [FCBS] with 100 IU ml⁻¹ penicillin, 100 µg ml⁻¹ streptomycin and 2 µg ml⁻¹ amphotericin B). The cells are incubated until almost confluent at 22°C, which can take up to 4 days depending on the seeding rate. Medium is changed to a maintenance medium (MEM with 2% FCBS and 100 IU ml⁻¹ penicillin, 100 µg ml⁻¹ streptomycin and 2 µg ml⁻¹ amphotericin B) on the day of inoculation. A 1/10 dilution using homogenising medium is made of single or pooled homogenates. Each culture is inoculated with 100 µl of sample per ml of culture medium. This represents a final 1/100 dilution of a 0.1 mg ml⁻¹ tissue homogenate. A further 1/10 dilution is made representing a final 1/1000 dilution, and two cultures are inoculated. No adsorption step is used. As an alternative, two to three cultures can be inoculated directly with 10 µl undiluted homogenate per ml of culture medium. Note that a high rate of cell toxicity or contamination often accompanies the use of a large undiluted inoculum. The cultures are incubated at 22°C in an incubator for 6 days. Cultures are read at days 3 and day 6. Cultures are passed at least once to detect samples with low levels of virus. On day 6, the primary cultures (P1) are frozen overnight at –20°C, thawed, gently mixed and then the culture supernatant is inoculated onto fresh cells as before (P2), i.e. 100 µl P1 supernatant per ml culture medium. Remaining P1 supernatants are transferred to sterile 5 ml tubes and placed at 4°C for testing by ELISA or PCR or another means to confirm the cause of cytopathic effect (CPE) as EHN. P2 is incubated as above, and a third pass is conducted if necessary.

4.3.4. Interpretation of results

CPE is well developed and consists of focal lysis surrounded by rounded granular cells. This change extends rapidly to involve the entire monolayer, which detaches and disintegrates. Cell cultures can be tested for EHN DNA using real-time PCR and conventional PCR with sequence analysis as described in Section 4.4. Antigen can be detected using immunocytochemistry in cell cultures with polyclonal antibodies and protocol available from the reference laboratory.

Cell lines should be monitored to ensure that susceptibility to targeted pathogens has not changed.

4.4. Nucleic acid amplification

Although several conventional PCR or quantitative real-time PCR methods have been described (Jaramillo *et al.*, 2012; Pallister *et al.*, 2007; Stilwell *et al.*, 2018) none has been validated according to OIE guidelines for primary detection of EHN. However, identification of ranavirus at genus and species level is possible using several published PCR strategies. Samples can be screened by real-time PCR, but as the assays described are not specific for EHN, identification of EHN by conventional PCR and amplicon sequencing must be undertaken on any samples screening positive by real-time PCR. For testing by conventional PCR, two PCR assays using MCP primers are used with amplicon sequencing required to differentiate EHN from ECV, FV3 and BIV (Marsh *et al.*, 2002). Alternatively, PCR of the DNA polymerase gene and neurofilament triplet H1-like protein genes can be used (Holopainen *et al.*, 2011) (this method is not described in this chapter).

Samples: virus from cell culture or direct analysis of tissue homogenate.

4.4.1. Real-time PCR

Tissue samples can be homogenised by manual pestle grinding or by bead beating (Rimmer *et al.*, 2012). Commercially available nucleic acid extraction kits (e.g. spin columns, magnetic beads) may be used to extract DNA directly from tissues and from tissue homogenates and cell culture supernatants. Depending on the number of samples to be tested, in the OIE Reference Laboratory, nucleic acids are extracted with either the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) or MagMAX-96 Viral RNA Isolation Kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. A negative extraction control, consisting of extraction reagents only, is included when test samples are extracted.

The ranavirus real-time screening protocol in use at the OIE Reference Laboratory, based on Pallister *et al.*, 2007 is as follows; Template (2 µl) is added to 23 µl reaction mixture containing 12.5 µl TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 900 nM for each primer, 250 nM for probe, and molecular grade water. After 1 cycle of 50°C for 2 minutes and 95 °C for 10 minutes, PCR amplification consists of 45 cycles of 95°C for 15 seconds, 60°C for 60 seconds.

Alternative real-time PCR assays can be used according to published protocols for detection of the major capsid protein gene sequence of EHN and other ranaviruses. The assay described by Jaramillo *et al.*

(2012) uses SYBR Green detection chemistry and the assay described by Stilwell *et al.* (2018) was designed to detect multiple ranavirus species using hydrolysis probe detection chemistry.

The following controls should be run with each assay: negative extraction control; positive control; no template control; internal PCR control.

Table 4.4.1.1. *Ranavirus primer and probe sequences*

Primer	Sequence (5'–3')	Reference
RANA CON F	5'-CTC-ATC-GTT-CTG-GCC-ATC-A-3'	Pallister <i>et al.</i> , 2007
RANA CON R	5'-TCC-CAT-CGA-GCC-GTT-CA-3'	
Probe RANA CON Pr	5'-6FAM-CAC-AAC-ATT-ATC-CGC-ATC-MGB-3'	
Primer C1096	GAC-TGA-CCA-ACG-CCA-GCC-TTA-ACG	Jaramillo <i>et al.</i> , 2012
C1097	GCG-GTG-GTG-TAC-CCA-GAG-TTG-TCG	
Primer RanaF1	CCA-GCC-TGG-TGT-ACG-AAA-ACA	Stilwell <i>et al.</i> , 2018
RanaR1	ACT-GGG-ATG-GAG-GTG-GCA-TA	
Probe RanaP1	6FAM-TGG-GAG-TCG-AGT-ACT-AC-MGB	

4.4.2. Conventional PCR

PCR and restriction endonuclease analysis (REA): technical procedure

Amplified product from PCR assay MCP-1 digested with Pflm I enables differentiation of EHNv and BIV from FV3 and ECV. Amplified product from PCR assay MCP-2 digested with Hinc II, Acc I and Fnu4H I (individually) enables differentiation of EHNv and BIV from each other and from FV3 and ECV.

Preparation of reagents

EHNv-purified DNA and BIV-purified DNA PCR control reagents are supplied by the reference laboratory in freeze-dried form. Reconstitute using 0.5 ml of Tris-EDTA (TE) buffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) and allow the vial to stand at RT for 2 minutes. Mix the vial very gently. For routine use, as a PCR control, it is recommended that working stocks be prepared as a 1/10 dilution in TE buffer (pH 8.0). Aliquots of 250 µl should be stored at –20°C. Each aliquot is sufficient for at least 50 reactions (1 to 5 µl added to cocktail) and has a minimum shelf life of 6 months from date of diluting.

Primers M151 and M152 (MCP-1, 321 bp), M153 and M154 (MCP-2, 625 bp) are supplied in working strength (100 ng µl⁻¹) and should be stored at –20°C. Primers can also be ordered from commercial suppliers. For primer sequences, refer to Table 4.4.2.1.

Table 4.4.2.1. *MCP-1 and MCP-2 primer sequences*

PCR assay	Primer	Sequence (5'–3')	Product size	Gene location
MCP-1	M151	AAC-CCG-GCT-TTC-GGG-CAG-CA	321 bp	266–586
	M152	CGG-GGC-GGG-GTT-GAT-GAG-AT		
MCP-2	M153	ATG-ACC-GTC-GCC-CTC-ATC-AC	625 bp	842–1466
	M154	CCA-TCG-AGC-CGT-TCA-TGA-TG		

PCR cocktail

Amplification reactions in a final volume of 50 µl (including 5 µl DNA sample) contain 2.5 µl (250 ng) of each working primer, 200 µM of each of the nucleotides dATP, dTTP, dGTP and dCTP, 5 µl of 10 × PCR buffer (66.6 mM Tris/HCl, 16.6 mM (NH₄)₂SO₄, 2.5 mM MgCl₂, 1.65 mg ml⁻¹ BSA, 10 mM beta-mercaptoethanol) and 2 U Taq polymerase. Instructions on preparation of 10 × PCR buffer are included in Table 4.4.2.2.

Table 4.4.2.2. 10 × PCR buffer preparation

Ingredients	Amount	Final concentration in 50 µl PCR mix
Tris	4.050 g	66.6 mM
Ammonium sulphate	1.100 g	16.6 mM
BSA (albumin bovine fraction V fatty acid free)	0.825 g	1.65 mg ml ⁻¹
Magnesium chloride	1.25 ml	2.5 mM
TE buffer (sterile)	50 ml	

NOTE: alternative commercial buffers may also be used.

Two negative controls are included, one comprising PCR cocktail only and the second containing 5 µl TE buffer.

The MCP-1 and MCP-2 reactions have the following profile: 1 cycle of denaturation at 94°C for 3 minutes, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 50°C for 30 seconds and extension at 72°C for 1 minute; a final extension of 72°C for 5 minutes, and cooling to 4°C.

NOTE: the annealing temperature may be increased to 60 or 62°C to reduce nonspecific amplification when the assay is used to test fish tissues.

PCR results are assessed by electrophoresis in 2% agarose gels stained with ~~ethidium bromide~~ containing SYBRTM Safe (Thermo Fisher Scientific) or equivalent. EHNV PCR control DNA (1/10 working stock) should give a result similar in intensity to the 10⁻³ band in both cases.

The following controls should be run with each assay: negative extraction control; positive control; no template control; internal PCR control.

4.4.3. Other nucleic acid amplification methods

Not applicable.

4.5. Amplicon sequencing

Amplicons generated using the MCP-1 and/or MCP-2 primers sets can be sequenced. Amplicons should be gel-purified and sequenced using both the forward and reverse primer. Consensus sequence, generated after analysis of the quality of the sequence chromatograms, can then be compared to reference sequences, for example by BlastN search of the NCBI database.

4.6. *In-situ* hybridisation

Not applicable

4.7. Immunohistochemistry

Immunohistochemistry (immunoperoxidase stain)

Samples: formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections.

Technical procedure

The following protocol is intended for the qualitative demonstration of EHNV antigens in formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections (Reddacliff & Whittington, 1996). It assumes that antigens may have become cross linked and therefore includes a protease digestion step that may be omitted if unfixed

samples are examined. A commercial kit (DAKO® LSAB K0679) with peroxidase-labelled streptavidin and a mixture of biotinylated anti-rabbit/anti-mouse/anti-goat immunoglobulins as link antibodies is used for staining. Other commercially supplied reagents are also used. For convenience these are also supplied by DAKO⁷. The primary affinity purified rabbit anti-EHNV antibody (Lot No. M708) is supplied freeze-dried by the OIE Reference Laboratory.

- i) Cut 5 µm sections and mount on SuperFrost® Plus G/Edge slides (Menzel-Glaser, HD Scientific Cat. No. HD 041300 72P3). Mark around the section with a diamond pencil to limit the spread of reagents.
- ii) Deparaffinise the section:
Preheat slides in a 60°C incubator for 30 minutes.
Place slides in a xylene bath and incubate for 5 minutes. Repeat once. Note that xylene replacements can be used without deleterious effects.
Tap off excess liquid and place slides in absolute ethanol for 3 minutes. Repeat once.
Tap off excess liquid and place slides in 95% ethanol for 3 minutes. Repeat once.
Tap off excess liquid and place slides in distilled or deionised water for 30 seconds.
- iii) Expose antigens using a protease treatment. Flood slide with proteinase K (5–7 µg ml⁻¹) and incubate for 20 minutes (ready-to-use solution, DakoCytomation Cat. No. S3020). Rinse slide by immersing three times in water. Place in a PBST bath for 5 minutes (PBS pH 7.2, 0.05% [v/v] Tween 20). Tap off the excess wash solution and carefully wipe around the section.
- iv) Perform the immunostaining reaction using the Universal DAKO LSAB®+ Kit, Peroxidase (DakoCytomation Cat No. K0679). Ensuring the tissue section is completely covered, add the following reagents to the slide. Avoid drying out.
- v) 3% hydrogen peroxide: cover the section and incubate for 5 minutes. Rinse gently with PBST and place in a fresh wash bath.
- vi) Primary antibody (affinity purified rabbit anti-EHNV 1:/1500 Lot No. M708) and negative control reagent (non-immune rabbit serum at a dilution of 1/1500) on a second slide. Cover the section and incubate for 15 minutes. Rinse slides.
- vii) Biotin-labelled secondary link antibody: ~~Link~~ cover the section and incubate for 15 minutes. Rinse slides.
- viii) Streptavidin peroxidase: cover the section and incubate for 15 minutes. Rinse slides.
- ix) Substrate–chromogen solution: cover the section and incubate for 5 minutes. Rinse slides gently with distilled water.
- x) Counterstain by placing slides in a bath of DAKO® Mayer's Haematoxylin for 1 minute (Lillie's Modification, Cat. No. S3309). Rinse gently with distilled water. Immerse 10 times into a water bath. Place in distilled or deionised water for 2 minutes.
- xi) Mount and cover-slip samples with an aqueous-based mounting medium (DAKO® Faramount Aqueous Mounting Medium Cat. No. S3025).

Interpretation of results

EHNV antigen appears as a brown stain in the areas surrounding degenerate and necrotic areas in parenchymal areas. There should be no staining with negative control rabbit serum on the same section.

Availability of test and reagents: antibody reagents and test protocols are available from the OIE Reference Laboratory.

4.8. Bioassay

Not applicable.

4.9. Antibody- or antigen-based detection methods

7 Dako Cytomation California Inc., 6392 via Real, Carpinteria, CA 93013, USA, Tel.: (+1-805) 566 6655, Fax: (+1-805) 566 6688; Dako Cytomation Pty Ltd, Unit 4, 13 Lord Street, Botany, NSW 2019, Australia, Fax: (+61-2) 9316 4773; Visit www.dakocytomation.com for links to other countries.

An antigen ELISA for detection of EHNV and an EHNV antibody detection ELISA have been described (Whittington & Steiner, 1993). The same antibodies are suitable for immunohistochemistry on fixed tissues and for detection of ranavirus antigen in cell culture. Reagents and protocols are available from the reference laboratory. It should be noted that polyclonal antibodies used in all related methods (immunoperoxidase, antigen-capture ELISA and immunoelectron microscopy) cross-react with all known ranaviruses except Santee Cooper ranaviruses (Ahne *et al.*, 1998; Cinkova *et al.*, 2010; Hedrick *et al.*, 1992; Hyatt *et al.*, 2000).

4.10. Other methods

Neutralising antibodies have not been detected in fish or mammals exposed to EHNV. Indirect ELISA for detection of antibodies induced following exposure to EHNV has been described for rainbow trout and European perch (Whittington *et al.*, 1994; 1999; Whittington & Reddacliff, 1995). The sensitivity and specificity of these assays in relation to a standard test are not known and interpretation of results is difficult. Protocols and specific anti-immunoglobulin reagents required to conduct these tests are available from the reference laboratory.

5. Test(s) recommended for surveillance to demonstrate freedom in apparently healthy populations

Real-time PCR is the most appropriate method of screening healthy fish populations for EHNV; however, the available methods are not specific for EHNV. Any real-time PCR positive samples should be tested by conventional PCR and sequence analysis to distinguish ranaviruses.

6. Corroborative diagnostic criteria

This section only addresses the diagnostic test results for detection of infection in the absence (Section 6.1.) or in the presence of clinical signs (Section 6.2.) but does not evaluate whether the infectious agent is the cause of the clinical event.

The case definitions for a suspect and confirmed case have been developed to support decision making related to trade and confirmation of disease status at the country, zone or compartment level. Case definitions for disease confirmation in endemically affected areas may be less stringent. It is recommended that all samples that yield suspect positive test results in an otherwise pathogen-free country or zone or compartment should be referred immediately to the OIE Reference Laboratory for confirmation, whether or not clinical signs are associated with the case. If a laboratory does not have the capacity to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate OIE Reference Laboratory.

6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status⁸

Apparently healthy populations may fall under suspicion, and therefore be sampled, if there is an epidemiological link to an infected population. Geographic proximity to, or movement of animals or animal products or equipment, etc., from a known infected population equate to an epidemiological link. Alternatively, healthy populations are sampled in surveys to demonstrate disease freedom.

6.1.1. Definition of suspect case in apparently healthy animals

The presence of infection with EHNV shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Positive result for EHNV based on virus isolation in cell cultures;
- ii) Positive real-time or conventional PCR result;
- iii) Positive EHNV antigen ELISA.

6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy animals

The presence of infection with EHNV is considered to be confirmed if at least one of the following criteria is met:

- i) EHNV-typical CPE in cell culture followed by identification of EHNV by conventional PCR and sequence analysis of the amplicon;
- ii) A positive result in tissue samples by real-time PCR and identification of EHNV by conventional PCR and sequence analysis of the amplicon.

⁸ For example transboundary commodities.

Reference Laboratories should be contacted for specimen referral when testing laboratories cannot undertake any of the recommended test methods and testing is being undertaken that will result in notification to the OIE.

6.2 Clinically affected animals

Clinical signs are not pathognomonic for a single disease; however, they may narrow the range of possible diagnoses.

6.2.1. Definition of suspect case in clinically affected animals

The presence of infection with EHNV shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Histopathology consistent with EHNV;
- ii) EHNV-typical CPE in cell cultures;
- iii) Positive real-time or conventional PCR result.

6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

The presence of infection with EHNV is considered to be confirmed if, in addition to the criteria in Section 6.2.1, at least one of the following criteria is met:

- i) EHNV-typical CPE in cell culture followed by identification of EHNV by conventional PCR and sequence analysis of the amplicon;
- ii) A positive result in tissue samples by real-time PCR and identification of EHNV by conventional PCR and sequence analysis of the amplicon.

Reference Laboratories should be contacted for specimen referral when testing laboratories cannot undertake any of the recommended test methods and testing is being undertaken that will result in notification to the OIE.

6.3. Diagnostic sensitivity and specificity for diagnostic tests

The diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis of infection with EHNV are provided in Tables 6.3.1. and 6.3.2. This information can be used for the design of surveys for infection with EHNV, however, it should be noted that diagnostic performance is specific to the circumstances of each diagnostic accuracy study (including the test purpose, source population, tissue sample types and host species) and diagnostic performance may vary under different conditions. Data are only presented where tests are validated to at least level 2 of the validation pathway described in Chapter 1.1.2. and the information is available within published diagnostic accuracy studies.

6.3.1. For presumptive diagnosis of clinically affected animals

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation
Real-time PCR	Diagnosis	Clinically diseased fish (multiple species) from disease outbreaks and experimental infections	Pool of kidney, liver and spleen from individual fish	European perch (<i>Perca fluviatilis</i>), river blackfish (<i>Gadopsis marmoratus</i>), golden perch (<i>Macquaria ambigua</i>), trout cod (<i>Maccullochella macquariensis</i>), freshwater catfish (<i>Tandanus tandanus</i>), Macquarie perch (<i>Macquaria australasica</i>) rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	94.3%* (n= 105)	100% (n= 441)	Virus isolation in BF-2 cell culture	Jaramillo <i>et al.</i> , (2012)
Real-time PCR	Diagnosis	Clinically diseased fish (multiple species) from disease outbreaks and	Pool of kidney, liver and spleen from individual fish	European perch (<i>Perca fluviatilis</i>), river blackfish (<i>Gadopsis marmoratus</i>), golden perch (<i>Macquaria ambigua</i>), trout cod (<i>Maccullochella macquariensis</i>), freshwater catfish (<i>Tandanus tandanus</i>),	95%* (n=106)	100% (n=80)	Virus isolation in BF-2 cell culture	Stilwell <i>et al.</i> , 2018

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation
		experimental infections		Macquarie perch (<i>Macquaria australasica</i>) rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)				

DSe: = diagnostic sensitivity, DSp = diagnostic specificity, n = number of samples used in the study;
 PCR: = polymerase chain reaction. Note: these assays detect multiple ranaviruses in addition to EHNV that infect amphibian hosts. *A positive result requires characterisation using sequencing to confirm that the result indicates the presence of EHNV.

6.3.2. For surveillance of apparently healthy animals: not available

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation

DSe: = diagnostic sensitivity, DSp = diagnostic specificity, qPCR: = real-time polymerase chain reaction.

7. References

- AHNE W., BEARZOTTI M., BREMONT M. & ESSBAUER S. (1998). Comparison of European systemic piscine and amphibian iridoviruses with epizootic haematopoietic necrosis virus and frog virus 3. *J. Vet. Med. [B]*, **45**, 373–383.
- AHNE W., OGAWA M. & SCHLOTFELDT H.J. (1990). Fish viruses: transmission and pathogenicity of an icosahedral cytoplasmic deoxyribovirus isolated from sheatfish *Silurus glanis*. *J. Vet. Med. [B]*, **37**, 187–190.
- AHNE W., SCHLOTFELDT H.J. & THOMSEN I. (1989). Fish viruses: isolation of an icosahedral cytoplasmic deoxyribovirus from sheatfish (*Silurus glanis*). *J. Vet. Med. [B]*, **36**, 333–336.
- ARIEL E. & BANG JENSEN B. (2009). Challenge studies of European stocks of redfin perch, *Perca fluviatilis* L., and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with epizootic haematopoietic necrosis virus. *J. Fish Dis.*, **32**, 1017–1025.
- Ariel E, Holopainen R, Olenen NJ & Tapiovaara H (2010). Comparative study of ranavirus isolates from cod (*Gadus morhua*) and turbot (*Psetta maxima*) with reference to other ranaviruses. *Archives of Virology* **155**, 1261-1271
- ARIEL E., NICOLAISEN N., CHRISTOPHERSEN M.-B., HOLOPAINEN R., TAPIOVAARA H. & BANG JENSEN B. (2009). Propagation and isolation of ranaviruses in cell culture. *Aquaculture*, **294**, 159–164.
- BECKER J.A., TWEEDIE A., GILLIGAN D., ASMUS M. & WHITTINGTON R. J. (2016). Susceptibility of Australian Redfin Perch *Perca fluviatilis* Experimentally Challenged with Epizootic Hematopoietic Necrosis Virus (EHNV). *J. Aquat. Anim. Health*, **28**, 122–130.
- BLOCH B. & LARSEN J.L. (1993). An iridovirus-like agent associated with systemic infection in cultured turbot *Scophthalmus maximus* fry in Denmark. *Dis. Aquat. Org.*, **15**, 235–240.
- BRYAN L.K., BALDWIN C.A., GRAY M.J. & MILLER D.L. (2009). Efficacy of select disinfectants at inactivating Ranavirus. *Dis. Aquat. Org.*, **84**, 89–94.
- CHINCHAR V.G. (2002). Ranaviruses (family Iridoviridae): emerging cold-blooded killers – brief review. *Arch. Virol.*, **147**, 447–470.
- CHINCHAR G., ESSBAUER S., HE J.G., HYATT A., MIYAZAKI T., SELIGY V. & WILLIAMS T. (2005). Family Iridoviridae. In: *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Eight Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*, Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U. & Ball L.A., eds. Academic Press, San Diego, California, USA, 145–161.
- CINKOVA K., RESCHOVA S., KULICH P. & VESELY T. (2010). Evaluation of a polyclonal antibody for the detection and identification of ranaviruses from freshwater fish and amphibians. *Dis. Aquat. Org.*, **89**, 191–198.
- CRANE M.S.J., YOUNG J. & WILLIAMS L. (2005). Epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV): growth in fish cell lines at different temperatures. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **25**, 228–231.

- DRURY S.E.N., GOUGH R.E. & CALVERT I. (2002). Detection and isolation of an iridovirus from chameleons (*Chamaeleo quadricornis* and *Chamaeleo hoehnelli*) in the United Kingdom. *Vet. Rec.*, **150**, 451–452.
- FIJAN N., MATASIN Z., PETRINEC Z., VALPOTIC I. & ZWILLENBERG L.O. (1991). Isolation of an iridovirus-like agent from the green frog (*Rana esculenta* L.). *Veterinarski Arhiv*, **61**, 151–158.
- HEDRICK R.P., MCDOWELL T.S., AHNE W., TORHY C. & DE KINKELIN P. (1992). Properties of three iridovirus-like agents associated with systemic infections of fish. *Dis. Aquat. Org.*, **13**, 203–209.
- HOLOPAINEN R., HONKANEN J., JENSEN B.B., ARIEL E. & TAPIOVAARA H. (2011). Quantitation of ranaviruses in cell culture and tissue samples. *J. Virol. Methods*, **171**, 225–233.
- HOLOPAINEN R., OHLEMEYER S., SCHÜTZE H., BERGMANN S.M. & TAPIOVAARA H. (2009). Ranavirus phylogeny and differentiation based on major capsid protein, DNA polymerase and neurofilament triplet H1-like protein genes. *Dis. Aquat. Org.*, **85**, 81–91.
- HYATT A.D., GOULD A.R., ZUPANOVIC Z., CUNNINGHAM A.A., HENGSTBERGER S., WHITTINGTON R.J., KATTENBELT J. & COUPAR B.E.H. (2000). Comparative studies of piscine and amphibian iridoviruses. *Arch. Virol.*, **145**, 301–331.
- HYATT A.D., WILLIAMSON M., COUPAR B.E.H., MIDDLETON D., HENGSTBERGER S.G., GOULD A.R., SELLECK P., WISE T.G., KATTENBELT J., CUNNINGHAM A.A. & LEE J. (2002). First identification of a ranavirus from green pythons (*Chondropython viridis*). *J. Wildl. Dis.*, **38**, 239–252.
- JARAMILLO D., TWEEDIE A., BECKER J.A., HYATT A., CRAMERI S. & WHITTINGTON R.J. (2012). A validated quantitative polymerase chain reaction assay for the detection of ranaviruses (Family Iridoviridae) in fish tissue and cell cultures, using EHNV as a model. *Aquaculture*, **356–357**, 186–192.
- LANGDON J.S. (1989). Experimental transmission and pathogenicity of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) in redfin perch, *Perca fluviatilis* L., and 11 other teleosts. *J. Fish Dis.*, **12**, 295–310.
- LANGDON J.S. & HUMPHREY J.D. (1987). Epizootic Hematopoietic Necrosis a New Viral Disease in Redfin Perch *Perca fluviatilis* L. in Australia. *J. Fish Dis.*, **10**, 289–298.
- LANGDON J.S., HUMPHREY J.D. & WILLIAMS L.M. (1988). Outbreaks of an EHNV-like iridovirus in cultured rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in Australia. *J. Fish Dis.*, **11**, 93–96.
- LANGDON J.S., HUMPHREY J.D., WILLIAMS L.M., HYATT A.D. & WESTBURY H.A. (1986). First virus isolation from Australian fish: an iridovirus-like pathogen from redfin perch, *Perca fluviatilis* L. *J. Fish Dis.*, **9**, 263–268.
- MAO J., THAM T.N., GENTRY G.A., AUBERTIN A. & CHINCHAR V.G. (1996). Cloning, sequence analysis, and expression of the major capsid protein of the iridovirus frog virus 3. *Virology*, **216**, 431–436.
- MAO J.H., HEDRICK R.P. & CHINCHAR V.G. (1997). Molecular characterisation, sequence analysis and taxonomic position of newly isolated fish iridoviruses. *Virology*, **229**, 212–220.
- MARSH I.B., WHITTINGTON R.J., O'ROURKE B., HYATT A.D. & CHISHOLM O. (2002). Rapid differentiation of Australian, European and American ranaviruses based on variation in major capsid protein gene sequence. *Molec. Cell. Probes*, **16**, 137–151.
- PALLISTER J., GOULD A., HARRISON D., HYATT A., JANCOVICH J. & HEINE H. (2007). Development of real-time PCR assays for the detection and differentiation of Australian and European ranaviruses. *J. Fish Dis.*, **30**, 427–438.
- POZET F., MORAND M., MOUSSA A., TORHY C. & DE KINKELIN P. (1992). Isolation and preliminary characterization of a pathogenic icosahedral deoxyribovirus from the catfish (*Ictalurus melas*). *Dis. Aquat. Org.*, **14**, 35–42.
- REDDACLIFF L.A. & WHITTINGTON R.J. (1996). Pathology of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) and redfin perch (*Perca fluviatilis* L.). *J. Comp. Pathol.*, **115**, 103–115.
- RIMMER A.E., BECKER J.A., TWEEDIE A. & WHITTINGTON R.J. (2012). Validation of high throughput methods for tissue disruption and nucleic acid extraction for ranaviruses (family Iridoviridae). *Aquaculture*, **338–341**, 23–28.
- SPEARE R. & SMITH J.R. (1992). An iridovirus-like agent isolated from the ornate burrowing frog *Limnodynastes ornatus* in northern Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **14**, 51–57.

STILWELL N.K., WHITTINGTON R.J., HICK P.M., BECKER J.A., ARIEL E., VAN BEURDEN S., VENDRAMIN N., OLESEN N.J. & WALTZEK T.B. (2018). Partial validation of a TaqMan real-time quantitative PCR for the detection of ranaviruses. *Dis. Aquat. Org.*, **128**, 105–116.

WHITTINGTON R.J., BECKER J.A. & DENNIS M.M. (2010). Iridovirus infections in finfish – critical review with emphasis on ranaviruses. *J. Fish Dis.*, **33**, 95–122.

WHITTINGTON R.J., KEARNS C., HYATT A.D., HENGSTBERGER S. & RUTZOU T. (1996). Spread of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHN) in redfin perch (*Perca fluviatilis*) in southern Australia. *Aust. Vet. J.*, **73**, 112–114.

WHITTINGTON R.J., PHILBEY A., REDDACLIFF G.L. & MACGOWN A.R. (1994). Epidemiology of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHN) infection in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): findings based on virus isolation, antigen capture ELISA and serology. *J. Fish Dis.*, **17**, 205–218.

WHITTINGTON R.J. & REDDACLIFF G.L. (1995). Influence of environmental temperature on experimental infection of redfin perch (*Perca fluviatilis*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with epizootic haematopoietic necrosis virus, an Australian iridovirus. *Aust. Vet. J.*, **72**, 421–424.

WHITTINGTON R.J., REDDACLIFF L.A., MARSH I., KEARNS C., ZUPANOVIC Z. & CALLINAN R.B. (1999). Further observations on the epidemiology and spread of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHN) in farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in southeastern Australia and a recommended sampling strategy for surveillance. *Dis. Aquat. Org.*, **35**, 125–130.

WHITTINGTON R.J. & STEINER K.A. (1993). Epizootic haematopoietic necrosis virus (EHN): improved ELISA for detection in fish tissues and cell cultures and an efficient method for release of antigen from tissues. *J. Virol. Methods*, **43**, 205–220.

WOLF K., BULLOCK G.L., DUNBAR C.E. & QUIMBY M.C. (1968). Tadpole edema virus: a viscerotropic pathogen for anuran amphibians. *J. Infect. Dis.*, **118**, 253–262.

ZUPANOVIC Z., MUSSO C., LOPEZ G., LOURIERO C.L., HYATT A.D., HENGSTBERGER S. & ROBINSON A.J. (1998). Isolation and characterisation of iridoviruses from the giant toad *Bufo marinus* in Venezuela. *Dis. Aquat. Org.*, **33**, 1–9.

*
* *

NB: There is an OIE Reference Laboratory for infection with epizootic haematopoietic necrosis virus (EHN) (see Table at the end of this *Aquatic Manual* or consult the OIE web site for the most up-to-date list: <https://www.oie.int/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>). Please contact the OIE Reference Laboratories for any further information on infection with EHN. The OIE Reference Laboratory can supply purified EHN DNA, heat killed EHN antigen and polyclonal antibodies against EHN together with technical methods. A fee is charged for the reagents to cover the costs of operating the laboratory.

NB: FIRST ADOPTED IN 1995 AS EPIZOOTIC HAEMATOPOIETIC NECROSIS; MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2018.

[Volver al orden del día](#)

CHAPTER 2.3.7.

INFECTION WITH RED SEA BREAM IRIDOVIRUS

1. Scope

Infection with red sea bream iridovirus is considered to be infection with the pathogenic agent red sea bream iridovirus (RSIV) of the genus *Megalocyttivirus*, Family *Iridoviridae*.

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent

The pathogen is an icosahedral virion 140–200 nm in diameter consisting of a central electron-dense core (120 nm) and an electron translucent zone (Inouye *et al.*, 1992) with a double-stranded DNA genome of approximately 110 kbp in length (Kawato *et al.*, 2017a). The viral genome has a G+C content of 53–55%, containing about 120 potential open reading frames (ORFs).

Phylogenetic analyses using major capsid protein (MCP) and ATPase genes shows that the viruses causing the similar clinical signs can be divided into three different genotypes: RSIV, infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) (He *et al.*, 2000; 2001), and turbot reddish body iridovirus (TRBIV) genotype (Shi *et al.*, 2004; 2010).

The aetiological agent of infection with RSIV is RSIV (Inouye *et al.*, 1992; Jeong *et al.*, 2003) and other strains belonging in the RSIV genotype (Go *et al.*, 2016; Koda *et al.*, 2018; Kurita & Nakajima, 2012). Similar diseases with the characteristic, enlarged basophilic cells within infected organs, typical of infections with megalocyttiviruses, classified into the ISKNV genotype and TRBIV genotypes are excluded from this chapter. Scale drop disease virus is another virus in the genus *Megalocyttivirus* causing different clinical signs in Asian seabass, *Lates calcarifer* (Groof *et al.*, 2015). RSIV genotypes are differentiated from ISKNV and TRBIV genotypes based on nucleotide sequence analysis which is required for confirmatory diagnosis. Scale drop disease virus is another virus in the genus *Megalocyttivirus* causing different clinical signs in Asian seabass, *Lates calcarifer* (Groof *et al.*, 2015).

RSIV was first found in red sea bream, *Pagrus major*, from which the virus name (RSIV) is derived (Inouye *et al.*, 1992). As RSIV has a broad host range as shown in Section 2.2.1. Susceptible host species, many viruses that can be classified into the RSIV genotype are synonyms of RSIV and defined to be the aetiological agents in this chapter, e.g. rock bream iridovirus (RBIV) (Do *et al.*, 2004; Jung & Oh 2000), Taiwan grouper iridovirus (TGIV) (Chou *et al.*, 1998), large yellow croaker iridovirus (LYCIV) (Chen *et al.*, 2003), orange-spotted grouper iridovirus (OSGIV) (Lu *et al.*, 2005), spotted knifejaw iridovirus (SKIV) (Dong *et al.*, 2010), and giant seaperch iridovirus (GSIV) (Wen & Hong, 2016) and pompano iridovirus (PIV) (Lopez-Porras *et al.*, 2018).

2.1.2. Survival and stability inside the host tissues

Unknown

2.1.3. Survival and stability outside the host

Unknown

For inactivation methods, see Section 2.4.5.

2.2. Host factors

2.2.1. Susceptible host species

In the case of infection RSIV: Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with RSIV according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code)* are:

Family	Scientific name	Common name
Carangidae	<i>Pseudocaranx dentex</i>	striped jack
	<i>Seriola dumerili</i>	greater amberjack
	<i>Seriola lalandi</i>	yellowtail amberjack
	<i>Seriola lalandi</i> × <i>Seriola quinqueradiata</i>	hybrid of yellowtail amberjack and Japanese amberjack
	<i>Seriola quinqueradiata</i>	Japanese amberjack
	<i>Trachinotus blochii</i>	snubnose pompano
	<i>Trachurus japonicus</i>	<u>Japanese jack mackerel</u>
Centrarchidae	<i>Micropterus salmoides</i>	largemouth bass
Centropomidae	<i>Lates calcarifer</i>	barramundi or sea bass
Haemulidae	<i>Parapristipoma trilineatum</i>	chicken grunt
	<i>Plectorhinchus cinctus</i>	crescent sweetlips
	<i>Trachurus japonicus</i>	Japanese jack mackerel
Kyphosidae	<i>Girella punctata</i>	largescale blackfish
Lateolabracidae	<i>Lateolabrax japonicus japonicus</i>	Japanese sea perch
	<i>Lateolabrax</i> sp.	
Lethrinidae	<i>Lethrinus haematopterus</i>	Chinese emperor
	<i>Lethrinus nebulosus</i>	spangled emperor
Moronidae	<i>Morone saxatilis</i> × <i>M. chrysops</i>	hybrid of striped sea bass and white bass
Oplegnathidae	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	Japanese parrotfish
Paralichthyidae	<i>Paralichthys olivaceus</i>	bastard halibut
Pleuronectidae	<i>Verasper variegatus</i>	spotted halibut
Rachycentridae	<i>Rachycentron canadum</i>	cobia
Sciaenidae	<i>Pseudosciaena crocea</i>	croceine croaker
Scombridae	<i>Scomber japonicus</i>	chub mackerel
	<i>Scomberomorus niphonius</i>	Japanese Spanish mackerel
	<i>Thunnus thynnus</i>	northern bluefin tuna
Sebastidae	<i>Sebastes schlegeli</i>	rockfish
Serranidae	<i>Epinephelus akaara</i>	Hong Kong grouper
	<i>Epinephelus awoara</i>	yellow grouper
	<i>Epinephelus bruneus</i>	longtooth grouper
	<i>Epinephelus coioides</i>	orange-spotted grouper
	<i>Epinephelus fuscoguttatus</i>	brown-marbled grouper
	<i>Epinephelus lanceolatus</i>	giant grouper
	<i>Epinephelus malabaricus</i>	Malabar grouper
	<i>Epinephelus septemfasciatus</i>	convict grouper
	<i>Epinephelus tauvina</i>	greasy grouper
	<i>Oplegnathus punctatus</i>	spotted knifejaw
Sparidae	<i>Acanthopagrus latus</i>	yellowfin sea bream
	<i>Acanthopagrus schlegeli</i>	black porgy
	<i>Evynnis japonica</i>	crimson sea bream
	<i>Pagrus major</i>	red sea bream
Tetraodontidae	<i>Takifugu rubripes</i>	torafugu

2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility

Species for which there is incomplete evidence to fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with (RSIV) according to Chapter 1.5 of the *Aquatic Code* are: Under study.

2.2.3. Likelihood of infection by species, host life stage, population or sub-populations

Juvenile through to adult stages are susceptible; however, the susceptibility of juveniles is generally higher than adults. Fish belonging to the genus *Oplegnathus* may be more susceptible than others.

2.2.4. Distribution of the pathogen in the host

Infected cells are observed in the spleen, kidney, heart, liver, intestine ~~and gill~~ and other organs.

2.2.5. Aquatic animal reservoirs of infection

Unknown

2.2.6. Vectors

Unknown

2.3. Disease pattern

2.3.1. Mortality, morbidity and prevalence

Depending on host fish species, fish size, fish age, water temperature, and other culture conditions, mortality rates range between 0% and 100%. Morbidity is unknown.

2.3.2. Clinical signs, including behavioural changes

Affected fish become lethargic and show abnormal and conspicuous respiratory movements.

2.3.3. Gross pathology

Fish exhibit severe anaemia, petechiae in the gills, and enlargement of the spleen and kidney.

2.3.4. Modes of transmission and life cycle

The principal mode of transmission of RSIV is horizontal via the water. Vertical transmission of RSIV has not yet been investigated.

2.3.5. Environmental factors

Outbreaks have been seen mostly in the summer season at water temperatures of 25°C and above.

2.3.6. Geographical distribution

The first outbreak was recorded in marine cultured red sea bream in ~~Japan-Asia~~ in 1990. From then on, further outbreaks and infections have been reported in many marine fish and freshwater fish in many countries. ~~The international trade of ornamental fish has contributed significantly to the spread of megalocytiviruses (Johan & Zainathan, 2020).~~

See OIE WAHIS (<https://wahis.oie.int/#/home>) for recent information on distribution at the country level.

2.4. Biosecurity and disease control strategies

2.4.1. Vaccination

Effectiveness of a vaccine consisting of formalin-inactivated supernatant from RSIV-infected GF cell culture has been confirmed experimentally and in field trials (Nakajima *et al.*, 1997; 1999). Currently, the formalin-inactivated vaccine for infection with RSIV is commercially available for red sea bream (*Pagrus major*), striped jack (*Pseudocaranx dentex*), Malabar grouper (*Epinephelus malabaricus*), orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) and other fish species belonging to the genus *Seriola* in Japan. Protection of fish belonging to the genus *Oplegnathus* by vaccination is difficult.

2.4.2. Chemotherapy including blocking agents

Not available.

2.4.3. Immunostimulation

Not applicable.

2.4.4. Breeding resistant strains

An RSIV-resistant strain of red sea bream (*Pagrus major*) has been developed using marker-assisted selection combined with DNA-based family selection (Sawayama *et al.*, 2019).

2.4.5. Inactivation methods

RSIV is inactivated at 56°C for 30 minutes and by treatment with either ether, chloroform or formalin (0.1%), and by exposure to pH 3.0. The virus is stable in tissue at –80°C and at pH 7.0 and pH 11.0 (Nakajima & Sorimachi, 1994).

2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

Unknown

2.4.7. General husbandry

Not available.

3. Specimen selection, sample collection, transportation and handling

This section draws on information in 2.2, 2.3 and 2.4 to identify populations, individuals and samples which are most likely to be infected.

3.1. Selection of populations and individual specimens

Clinical inspections should be carried out during a period when water temperature is conducive to development of clinical disease (see Section 2.3.5). All production units (ponds, tanks, etc.) should be inspected for the presence of dead, weak or abnormally behaving fish. For the purposes of disease surveillance, fish to be sampled are selected as follows:

- i) The most susceptible species should be sampled preferentially (see Section 2.2.3). Other susceptible species listed in Section 2.2.1 should be sampled proportionally.
- ii) Risk-based criteria should be employed to preferentially sample lots or populations with a history of abnormal mortality, potential exposure events or where there is evidence of poor water quality or husbandry. If more than one water source is used for fish production, fish from all water sources should be included in the sample.
- iii) If weak, abnormally behaving or freshly dead fish are present, such fish should be selected. If such fish are not present (e.g. during surveillance of apparently healthy populations), the fish selected should include normal appearing, healthy fish collected in such a way that all parts of the farm as well as all year classes are proportionally represented in the sample. Smaller fish may be more appropriate because infection with RSIV can cause higher mortality in juvenile or yearling fish. However, adult fish are also susceptible to RSIV infection as the viral genome has been detected from apparently healthy broodstock. Infection with RSIV has not been reported in hatchery fish.

For disease outbreak investigations, moribund fish or fish exhibiting clinical signs of infection with RSIV should be collected. Ideally fish should be collected while alive, however recently dead fish can also be selected for diagnostic testing. It should be noted, however, that there will be a significant risk of contamination with environmental bacteria if the animals have been dead for some time.

3.2. Selection of organs or tissues

Although gill and visceral organs such as spleen, heart, kidney, liver and intestine can be used, it is recommended to sample spleen or kidney tissues; spleen is the most appropriate organ for the preparation of imprints for use in the IFAT. For surveillance of apparently healthy populations, spleen or kidney should be sampled.

3.3. Samples or tissues not suitable for pathogen detection

Fish carcasses showing advanced signs of tissue decomposition are not suitable for testing by any method.

Use of inappropriate fixatives (where required), poor sample quality, inappropriate tissues and lack of information provided with the submission may render samples unsuitable for testing.

3.4. Non-lethal sampling

Not available.

3.5. Preservation of samples for submission

Store fish samples at 4°C for use within 24 hours (or at –80°C for longer periods [up to a few years] for the purposes of molecular detection methods).

For guidance on sample preservation methods for the intended test methods, see Chapter 2.3.0.

3.5.1. Samples for pathogen isolation

The success of pathogen isolation depends strongly on the quality of samples (which will be affected by time since collection and time in storage). Fresh specimens should be kept on ice and preferably sent to the laboratory within 24 hours of collection. To avoid degradation of samples, use alternate storage methods only after consultation with the receiving laboratory.

3.5.2. Preservation of samples for molecular detection

~~Tissue samples for PCR testing should be preserved in 70–90% (v/v) analytical/reagent-grade (undenatured) ethanol. The recommended ratio of ethanol to tissue is 10:1 based on studies in terrestrial animal and human health. The use of lower grade (laboratory or industrial grade) ethanol is not recommended. If material cannot be fixed it may be frozen. Standard sample collection, preservation and processing methods for molecular techniques can be found in Section B.2.5 of Chapter 2.3.0. General information (diseases of fish)~~

3.5.3. Fixed samples for histopathology, immunohistochemistry or *in-situ* hybridisation

~~Tissue samples for histopathology should be fixed immediately after collection. The recommended ratio of fixative to tissue is 10:1. Standard sample collection, preservation and processing methods for histological techniques can be found in Section 2.2 of Chapter 2.3.0. General information (diseases of fish).~~

3.5.4. Samples for other tests

Not applicable.

3.6. Pooling of samples

Pooling of samples from more than one individual animal for a given purpose should only be recommended where robust supporting data on diagnostic sensitivity and diagnostic specificity have been evaluated and found to be suitable. If the effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been thoroughly evaluated, larger fish should be processed and tested individually. Small life stages such as fry or specimens can be pooled to provide the minimum amount of material needed for testing. If pooling is used, it is recommended to pool organ pieces from a maximum of five fish.

4. Diagnostic methods

The methods currently available for ~~identifying infection~~ pathogen detection that can be used in i) surveillance of apparently healthy ~~populations~~ animals, ii) presumptive diagnosis in clinically affected animals and iii) confirmatory diagnostic purposes are listed in Table 4.1. by animal life stage.

~~The designations used in the Table indicate:~~

Ratings against for purposes of use. For each recommended assay a qualitative rating against for the purpose of use is provided. The ratings are determined based on multiple performance and operational factors relevant to

application of an assay for a defined purpose. These factors include appropriate diagnostic performance characteristics, level of assay validation, successful application by diagnostic laboratories, availability cost, timeliness, and sample throughput and operability. For a specific purpose of use, assays are rated as:

Key:

- +++ = ~~Most suitable~~ Methods —are most suitable with desirable performance and operational characteristics.
- ++ = ~~Suitable~~ Method(s) are suitable with acceptable performance and operational characteristics under most circumstances.
- + = ~~Less suitable~~ Methods —are suitable, but performance or operational characteristics may significantly limit application under some circumstances.
- Shaded boxes = Not appropriate for this purpose.

~~The selection of a test for a given purpose depends on the analytical and diagnostic sensitivities and specificities, repeatability and reproducibility. OIE Reference Laboratories welcome feedback on diagnostic performance for assays, in particular PCR methods, for factors affecting assay analytical sensitivity or analytical specificity, such as tissue components inhibiting amplification, presence of nonspecific or uncertain bands, etc., and any assays that are in the +++ category.~~

Validation stage. The validation stage corresponds to the assay development and validation pathway in chapter 1.1.2. The validation stage is specific to each purpose of use. Where available, information on the diagnostic performance of recommended assays is provided in Section 6.3.

OIE Reference Laboratories welcome feedback on diagnostic performance of recommended assays, in particular PCR methods. Of particular interest are any factors affecting expected assay sensitivity (e.g. tissue components inhibiting amplification) or expected specificity (e.g. failure to detect particular genotypes, detection of homologous sequences within the host genome). These issues should be communicated to the OIE Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

Table 4.1. OIE recommended diagnostic methods and their level of validation for surveillance of apparently healthy animals and investigation of clinically affected animals

Method	A. Surveillance of apparently healthy animals				B. Presumptive diagnosis of clinically affected animals				C. Confirmatory diagnosis ¹ of a suspect result from surveillance or presumptive diagnosis			
	Early life stages ²	Juveniles ²	Adults	LV	Early life stages ²	Juveniles ²	Adults	LV	Early life stages ²	Juveniles ²	Adults	LV
Tissue imprints	+	+	+	1	+	+	+	1				
Histopathology	+	+	+	1	++	++	++	1	++	++	++	<u>1</u>
IFAT or ICC	+	+	+	1	++	++	++	1	++	++	++	<u>1</u>
Cytopathology												
Cell culture	+	+	+	1	++	++	++	1	++	++	++	<u>1</u>
Real-time PCR	++	++	++	2	++	++	++	2	++	++	++	<u>2</u>
Conventional PCR ³	++	++	++	2	++	++	++	2	+++	+++	+++	<u>2</u>
Amplicon sequencing									+++	+++	+++	<u>NA</u>
<i>In-situ</i> hybridisation												
Bioassay												
LAMP												
Ab-ELISA												
Ag-ELISA												
Other antigen detection methods ⁴												
Other serological method ⁴												

LV = level of validation, refers to the stage of validation in the OIE Pathway (chapter 1.1.2), NA = not available; IFAT = Indirect fluorescent antibody test. ICC = Immunocytochemistry PCR = polymerase chain reaction; LAMP = loop-mediated isothermal amplification; Ab- or Ag-ELISA = antibody or antigen enzyme-linked immunosorbent assay, respectively;

¹For confirmatory diagnoses, methods need to be carried out in combination (see Section 6). ²Susceptibility of early and juvenile life stages is described in Section 2.2.3.

³Conventional PCR alone does not meet the case definition of a confirmed case but must be followed by amplicon sequencing. ⁴Specify the test used. Shading indicates the test is inappropriate or should not be used for this purpose.

4.1. Tissue imprints

Samples to be tested include tissue imprints of spleen from affected fish. Use a tissue imprint of spleen from known uninfected fish as a negative control and if possible, use a tissue imprint of spleen from confirmed RSIV-infected fish as a positive control.

- i) Bleed the fish thoroughly.
- ii) Make spleen imprints on cleaned glass microscope slides.
- iii) Store the spleen pieces at 4°C together with the other organs that may be required for virus isolation or PCR tests later.
- iv) Allow the imprints to air-dry for 20 minutes.
- v) Fix the imprints with cold acetone.
- vi) Stain with Giemsa or Diff-Quik.
- vii) Mount the microscope slides with cover-slips using a drop of mounting fluid.
- viii) Examine under light microscopy using ×40–100 magnification.

A presumptive positive result is indicated by the presence of abnormally enlarged cells. Negative control slides should not exhibit any abnormally enlarged cells. If enlarged cells are observed in the test samples, identification procedures PCR followed by amplicon sequencing must be undertaken immediately.

4.2. Histopathology and cytopathology

Examination of histological sections from diseased fish may reveal abnormally enlarged cells from the spleen, heart, kidney, liver, intestine or gill. These enlarged cells react to anti-RSIV MAb M10 (4.9.1.) using an immunohistochemistry test (Bermudez *et al.*, 2018). However, this method is not yet fully validated.

4.3. Cell culture for isolation

Cell lines should be monitored to ensure that susceptibility to targeted pathogens has not changed.

Isolation of RSIV (and ISKNV) is undertaken using the Grunt fin (GF) cell line⁹ or SKF-9 cell line (Kawato *et al.*, 2017b); ~~isolation of the viruses from freshwater fish such as gourami is difficult.~~ Spleen and/or kidney tissues from diseased fish are suitable samples. Cells should be grown in Eagle's basal medium (BME) for GF cell line and Hank's minimum essential medium (HMEM) for SKF-9 cell line, supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) at 25°C in a temperature-controlled incubator. A virus isolate to be used as positive control can be obtained from the OIE Reference Laboratory for RSIV. Use uninfected cells as negative control. Following development of viral cytopathic effect (CPE), virus identification would be undertaken using conventional PCR and sequencing. SKF-9 cell line can be obtained from the OIE Reference Laboratory for RSIV.

4.3.1. Virus isolation in cell cultures

4.3.1.1. Inoculation of cell monolayers

- i) Cell cultures (GF or SKF-9) maintained at 25°C and passaged at 7–14 day intervals should be used for virus isolation to ensure virus susceptibility. Prepare cell monolayers in 25 cm² flask, 6-well, 24-well, or 96-well plates according to the purpose and sample size on the day before sample inoculation.
- ii) Following the virus isolation procedure described in Chapter 2.3.0 *General information* (on diseases of fish), Section A.2.3.2, make an additional tenfold dilution of the 1/10 spleen homogenate supernatants and transfer an appropriate volume of each of the two dilutions onto the cell monolayers. To avoid cytotoxic effect (CTE), final concentration of the organ in the cultured medium should be less than 1% w/v.

⁹ European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) Catalogue No. 88010601; www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=88010601&collection=ecacc_gc

iii) Without withdrawing the inoculum, incubate at 25°C.

4.3.1.2. Monitoring incubation

- i) Follow the course of infection in positive controls and other inoculated cell cultures by daily microscopic examination at ×40–100 magnification for 10 days. The use of a phase-contrast microscope is recommended.
- ii) If CPE appears in those cell cultures inoculated with dilutions of the test homogenates, identification procedures by PCR followed by amplicon sequence analysis must be undertaken immediately.
- iii) If no CPE develops in the inoculated cultures (despite normal progression of CPE in the positive controls cultures) after 10 days incubation, the inoculated cultures should be subcultured and incubated for a further 7 days. Should the virus control fail to develop CPE, the process should be repeated with fresh susceptible cells and new batches of samples.

4.3.1.3. Subcultivation procedure

- i) Collect aliquots of cell culture medium from all monolayers inoculated with dilutions of each supernatant of the test homogenates.
- ii) Inoculate cell monolayers as described above (Section 4.3.1.1 Inoculation of cell monolayers, steps i and ii).
- iii) Incubate and monitor as described above (Section 4.3.1.1 Inoculation of cell monolayers, steps ii and iii and Section 4.3.1.2 Monitoring incubation steps i and ii).

If no CPE occurs, the test may be declared negative.

4.4. Nucleic acid amplification

See Chapter 2.3.0 *General information* (on diseases of fish), Section B.2.5 for information on the use of molecular techniques for virus identification. Both real-time PCR and conventional PCR tests are available for RSIV identification. Samples to be tested include spleen from affected fish or supernatants from cell cultures that have developed CPE. The following controls should be run with each assay: negative extraction control; positive control; no template control; internal PCR control. Use extracted DNA from the spleen and kidney of uninfected fish or extracted DNA from the supernatant of an uninfected cell culture as the negative control. Use extracted DNA from the spleen of confirmed RSIV-infected fish or extracted DNA from the supernatant of an infected cell culture or Viral DNA or plasmid in which target sequence is inserted as the positive control. Select controls depending on the kinds of samples to be tested.

Tissue samples can be homogenised by manual pestle grinding or by bead-beating. Commercially available nucleic acid extraction kits may be used to extract DNA directly from tissues, from tissue homogenates and cell culture supernatants according to the manufacturer's instructions. A negative extraction control, consisting of extraction reagents only, is included when test samples are extracted. Use a pre-confirmed RSIV-affected organ or supernatant from RSIV-infected cell cultures as positive controls. Use organs from healthy fish or supernatants from non-infected cell cultures as negative controls

N.B. Viral DNA or a plasmid in which the PCR target sequence is inserted that can be used as the positive control can be obtained from the OIE Reference Laboratory for RSIV.

4.4.1. Real-time PCR

Several real-time PCR assays available for detection of RSIV have been evaluated (Kawato *et al.*, 2021). Two probe-based real-time PCR assays, designated as the Mohr *et al.* assay (Mohr *et al.*, 2015) and the Cummins assay, were deemed equivalent to each other and superior to the other tests evaluated in this study. The primer sets and probes of each of these two assays are designed to detect a major capsid protein (MCP) gene sequence and are as follows:

- i) Mohr real-time PCR

RSIV RT F: 5'-TGA-CCA-GCG-AGT-TCC-TTG-ACT-T-3'

RSIV RT R: 5'-CAT-AGT-CTG-ACC-GTT-GGT-GAT-ACC-3'

RSIV Probe: 5'-FAM-AAC-GCC-TGC-ATG-ATG-CCT-GGC-TAMRA-3'

ii) Cummins real-time PCR

AFDL Megalo F: 5'-GGC-GAC-TAC-CTC-ATT-AAT-GTG-3'

AFDL Megalo R: 5'-CAC-CAG-GTC-GTT-AAA-TGA-CA-3'

AFDL Megalo Pr: 5'-FAM-CTG-CGT-GTT-AAG-ATC-CCC-TCC-A-TAMRA-3'

The protocol in use at the OIE Reference Laboratory for RSIV is as follows: Template (2 µl) is added to 23 µl reaction mixture containing 12.5 µl TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 900 nM for each primer, 250 nM for probe, and molecular grade water. After 1 cycle of 50°C for 2 minutes and 95°C for 10 minutes, amplification consists of 45 cycles of 95°C for 15 seconds, 60°C for 60 seconds.

The detection sensitivity limits of both real-time PCRs are approximately 1-10 copies/µl template DNA which is higher than that of conventional PCR. However, since the real-time PCRs have cross-reactivity to the ISKNV and TRBIV genotypes, conventional PCR followed by amplicon sequence analysis (see Section 4.5.) is required for confirmatory diagnosis.

4.4.2. Conventional PCR

The conventional PCR primer set consisting of the forward primer 1-F (5'-CTC-AAA-CAC-TCT-GGC-TCA-TC-3') and reverse primer 1-R (5'-GCA-CCA-ACA-CAT-CTC-CTA-TC-3') is used for amplification of a 570 base region of the genome sequence across two ORFs (Kurita *et al.*, 1998). Primer set 4-F (5'-CGG-GGG-CAA-TGA-CGA-CTA-CA-3') and 4-R (5'-CCG-CCT-GTG-CCT-TTT-CTG-GA-3') also has adequate sensitivity for RSIV, and generates an amplicon of 568 bases, but it cannot be used to amplify ISKNV DNA (Kurita *et al.*, 1998). The reactivity of these primer sets against TRBIV has not yet been confirmed

The protocol in use at the OIE Reference Laboratory for RSIV, based on Kurita *et al.*, (1998), is as follows: Template (1 µl) is added to 19 µl reaction mixture containing 2 µl 10× reaction buffer, 1.6 µl dNTP mixture (2.5 mM each), 0.2 µl *TaKaRa ExTaq* HS (5 U/µl) (TaKaRa), 1 µM each primer, and molecular grade water. After 1 cycle of 94°C for 2 minutes, PCR amplification consists of 40 cycles of 94°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds, followed by final extension at 72°C for 2 minutes. Amplified DNA (567 or 570 bp) is analysed by agarose gel electrophoresis using a 1.5% agarose/TAE (Tris-acetate-EDTA) gel containing SYBR™ Safe (Thermo Fisher Scientific) or equivalent.

The detection sensitivity limit of the 1-F/1-R PCR is approximately 10-100 copies/µl template DNA. However, the primer set 1-F and 1-R is confirmed to amplify both RSIV and ISKNV DNA, and hence, amplicon sequencing is required for confirmatory diagnosis. The cross reactivity of these primer sets against TRBIV has not yet been validated.

4.4.3. Other nucleic acid amplification methods

Not applicable

4.5. Amplicon sequencing of the amplicon

The primer set 1-F and 1-R can amplify both RSIV and ISKNV DNA and sequencing of the amplicon is required for virus identification. Amplicons should be ~~gel~~-purified and sequenced using both the forward and reverse primer. Consensus sequence, generated after analysis of the quality of the sequence chromatograms, can then be compared to reference sequences, for example by BlastN search of the NCBI database.

4.6. *In-situ* hybridisation

Not applicable

4.7. Immunohistochemistry

Not applicable

4.8. Bioassay

Not applicable

4.9. Antibody-based or antigen detection methods

4.9.1. Antibody-based antigen detection methods: indirect fluorescent antibody test (IFAT) or immunocytochemistry (ICC)

Reagent and protocols for detecting RSIV proteins with a monoclonal antibody (MAb) M10 have been published (Kawato *et al.*, 2017b; 2020; Nakajima & Sorimachi, 1995). The MAb M10-reactive epitope has been demonstrated to be a 7 amino acid sequence (EYDCPEY) of a non-structural protein encoded by the laminin-type epidermal growth factor-like domain gene in RSIV and ISKNV (Takano *et al.*, 2019). MAb M10 detects both RSIV- and ISKNV-infected cells (Kawato *et al.*, 2020) but it does not detect ranaviruses (Nakajima & Sorimachi, 1995). The reactivity of MAb against TRBIV has not yet been confirmed. MAb M10 can be obtained from the OIE Reference Laboratory for RSIV.

Samples to be tested include tissue imprints of spleen from affected fish. Use a tissue imprint of spleen from uninfected fish as a negative control and if possible, use a tissue imprint of spleen from confirmed RSIV-infected fish as a positive control. Similarly, IFAT can be conducted directly after virus isolation in cell culture. Samples to be taken for testing include acetone-fixed infected cell monolayers that have developed CPE. Use an uninfected cell monolayer as a negative control and if possible, use a confirmed RSIV-infected cell monolayer as a positive control. The protocol for tissue imprints is as follows and can be adapted for IFAT on cell cultures.

- i) Bleed the fish thoroughly.
- ii) Make spleen imprints on cleaned glass microscope slides.
- iii) Store the spleen pieces at 4°C together with the other organs that may be required for virus isolation.
- iv) Allow the imprints to air-dry for 20 minutes.
- v) Fix the imprints with cold acetone.
- vi) Prepare a diluted solution of MAb M10 in PBS (1/100)
- vii) Treat the imprints with the MAb M10 solution for 30 minutes at 37°C in a humid chamber.
- viii) Rinse three times with PBS.
- ix) Incubate the imprints for 30 minutes at 37°C in a humid chamber with a solution of a specific anti-mouse FITC-conjugated antibody prepared according to the supplier's instructions.
- x) Rinse three times with PBS.
- xi) Mount the microscope slides with cover-slips using glycerol saline prior to microscopic observation.
- xii) Examine using a fluorescence microscope. Positive and negative controls must be found to give the expected results prior to any other observation.

A positive result is indicated by the presence of abnormally enlarged cells with strong fluorescence. Negative control slides should not exhibit any strong fluorescence.

If the test is positive, the fish from which the samples were obtained is considered infected with RSIV or ISKNV.

Alternatively, a peroxide-conjugated second antibody could be used rather than fluorescence conjugate.

4.10. Other methods

RSIV cannot be identified by neutralisation tests as the antisera generated by the immunisation of rabbits have few neutralising antibodies.

5. Test(s) recommended for surveillance to demonstrate freedom in apparently healthy populations

As indicated in Table 4.1, real-time PCR is the most appropriate method of screening healthy fish populations for RSIV; however, the available methods are not specific for RSIV. Any real-time positive samples should be tested by conventional PCR followed by amplicon sequence analysis to distinguish megalocytiviruses.

6. Corroborative diagnostic criteria

This section only addresses the diagnostic test results for detection of infection in the absence (Section 6.1.) or in the presence of clinical signs (Section 6.2.) but does not evaluate whether the infectious agent is the cause of the clinical event.

The case definitions for a suspect and confirmed case have been developed to support decision making related to trade and confirmation of disease status at the country, zone or compartment level. Case definitions for disease confirmation in endemically affected areas may be less stringent. It is recommended that all samples that yield suspect positive test results in an otherwise pathogen-free country or zone or compartment should be referred immediately to the OIE Reference Laboratory for confirmation, whether or not clinical signs are associated with the case. If a laboratory does not have the capacity to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate OIE reference laboratory.

6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status¹⁰

Apparently healthy populations may fall under suspicion, and therefore be sampled, if there is an epidemiological link(s) to an infected population. Geographic proximity to, or movement of animals or animal products or equipment, etc., from a known infected population equate to an epidemiological link. Alternatively, healthy populations are sampled in surveys to demonstrate disease freedom.

6.1.1. Definition of suspect case in apparently healthy animals

The presence of infection with RSIV shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Positive result by real-time or conventional PCR
- ii) ~~Cyto-~~or Histopathological changes consistent with infection with RSIV ~~infection or disease~~
- iii) Cytopathic effect in cell culture
- iv) Positive result from IFAT-~~or~~ ICC

6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy animals

The presence of infection with RSIV is considered to be confirmed if at least one of the following criteria is met:

- i) Positive result by a recommended molecular or antigen detection test with confirmation by conventional PCR and sequence analysis, with sequence consistent with RSIV
- ii) ~~Cyto-~~or Histopathological changes consistent with the presence of infection with RSIV ~~the pathogen or the disease with confirmation by~~ and conventional PCR and sequence analysis, with sequence consistent with RSIV
- iii) Cytopathic effect in cell culture with confirmation-identification of RSIV by conventional PCR and sequence analysis, ~~with sequence consistent with RSIV~~

Reference Laboratories should be contacted for specimen referral when testing laboratories cannot undertake any of the recommended test methods. Positive test results will result in notification to the OIE.

6.2 Clinically affected animals

¹⁰ For example transboundary commodities.

Clinical signs (see Section 2.3.2) are not pathognomonic for a single disease; however they may narrow the range of possible diagnoses.

6.2.1. Definition of suspect case in clinically affected animals

The presence of infection with RSIV shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Presence of gross pathology or clinical signs associated with infection with RSIV disease as described in this chapter, with or without elevated mortality
- ii) ~~Cyto- or~~ Histopathological changes consistent with the presence of ~~the pathogen or the disease~~ infection with RSIV
- iii) Positive result from IFAT ~~or ICC~~
- iv) Cytopathic effect typical for RSIV infection in cell culture
- v) Positive result by real-time PCR or conventional PCR

6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

The presence of infection with RSIV is considered to be confirmed if at least one of the following criteria is met:

- i) Positive result by a recommended antigen detection test ~~with confirmation by~~ and a positive result by conventional PCR and sequence analysis, with sequence consistent with RSIV
- ii) ~~Cyto- or histopathological changes consistent with the presence of the pathogen or the disease~~ with infection with RSIV and confirmation a positive result by conventional PCR and sequence analysis, with sequence consistent with RSIV
- iii) Cytopathic effect in cell culture with ~~confirmation~~ identification of RSIV by conventional PCR ~~and sequence analysis~~, with sequence consistent with RSIV
- iv) Positive result by real-time PCR ~~test and positive result by~~ with confirmation by conventional PCR ~~and sequence analysis~~, with sequence consistent with RSIV

Reference Laboratories should be contacted for specimen referral when testing laboratories cannot undertake any of the recommended test methods. Positive test results will result in notification to the OIE.

6.3. Diagnostic sensitivity and specificity for diagnostic tests [under study]

The diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis of infection with RSIV are provided in Tables 6.3.1. and 6.3.2. This information can be used for the design of surveys for infection with RSIV, however, it should be noted that diagnostic performance is specific to the circumstances of each diagnostic accuracy study (including the test purpose, source population, tissue sample types and host species) and diagnostic performance may vary under different conditions. Data are only presented where tests are validated to at least level 2 of the validation pathway described in Chapter 1.1.2. and the information is available within published diagnostic accuracy studies.

6.3.1. For presumptive diagnosis of clinically affected animals

Test type		Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation

DSe: = diagnostic sensitivity, DSp = diagnostic specificity.

6.3.2. For surveillance of apparently healthy animals

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation

--	--	--	--	--	--	--	--	--

DSe: = diagnostic sensitivity, DSp = diagnostic specificity.

7. References

- BERMÚDEZ R., LOSADA A.P., AZEVEDO A.M., GUERRA-VARELA J., PÉREZ-FERNÁNDEZ D., SÁNCHEZ L., PADRÓS F., NOWAK B. & QUIROGA M.I. (2018). First description of a natural infection with spleen and kidney necrosis virus in zebrafish. *J. Fish Dis.*, **41**, 1283–1294.
- CHEN X.H., LIN K.B. & WANG X.W. (2003). Outbreaks of an iridovirus disease in maricultured large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Richardson), in China. *J. Fish Dis.*, **26**, 615–619.
- 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.
- de GROOF A, GUELEN L, DEIJS M, VAN DER WAL Y, MIYATA M, NG KS, VAN GRINSVEN L, SIMMELINK B, BIERMANN Y, GRISEZ L, VAN LENT J, DE RONDE A, CHANG SF, SCHRIER C, VAN DER HOEK L. (2015). A Novel Virus Causes Scale Drop Disease in Lates calcarifer. *PLoS Pathog.*, **11**(8):e1005074.
- 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., CHAS 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.
- DONG C., WENG S., LUO Y., HUANG M., AI H., YIN Z. & HE J. (2010). A new megalocytivirus from spotted knifejaw, *Oplegnathus punctatus*, and its pathogenicity to freshwater mandarin fish, *Siniperca chuatsi*. *Virus Res.*, **147**, 98–106.
- GO J., WALTZEK T.B., SUBRAMANIAM K., YUN S.C., GROFF J.M., ANDERSON I.G., CHONG R., SHIRLEY I., SCHUH J.C.L., HANDLINGER J.H., TWEEDIE A. & WHITTINGTON R.J. (2016). Detection of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) and turbot reddish body iridovirus (TRBIV) from archival ornamental fish samples. *Dis. Aquat. Org.*, **122**, 105–123.
- 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.
- HE J.G., ZENG K., WENG S.P. & CHAN S.M. (2000). Systemic disease caused by an iridovirus-like agent in cultured mandarin fish *Siniperca chuatsi* (Basiliewsky), in China. *J. Fish Dis.*, **23**, 219–222.
- 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.
- JOHAN C.A.C. & ZAINATHAN S.C. (2020). Megalocytiviruses in ornamental fish: A review. *Vet. World*, **13**, 2565–2577.
- 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.
- KAWATO Y., CUMMINS D.M., VALDETER S., MOHR P.G., ITO T., MIZUNO K., KAWAKAMI H., WILLIAMS L.M., CRANE M.S.J., & MOODY N.J.G. (2021). Development of new real-time PCR assays for detecting *Megalocytivirus* across multiple genotypes. *Fish Pathol.*, **56**, 177–186 (in press).

KAWATO Y., MOHR P.G., CRANE M.S.J., WILLIAMS L.M., NEAVE M.J., CUMMINS D.M., DEARNLEY M., CRAMERI S., HOLMES C., HOAD J. & MOODY N.J.G. (2020). Isolation and characterisation of an ISKNV-genotype megalocytivirus from imported angelfish *Pterophyllum scalare*. *Dis. Aquat. Org.*, **140**, 129–141.

KAWATO Y., SUBRAMANIAM K., NAKAJIMA K., WALTZEK T. & WHITTINGTON R. (2017a). Iridoviral diseases: red sea bream iridovirus and white sturgeon iridovirus. *In: Fish Viruses and Bacteria: Pathobiology and Protection*, Woo P.T.K., Cipriano, R.C., eds. CABI Publishing, Wallingford, 147–159.

KAWATO Y., YAMASHITA H., YUASA K., MIWA S. & NAKAJIMA K. (2017b). Development of a highly permissive cell line from spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*) for red sea bream iridovirus. *Aquaculture*, **473**, 291–298.

KODA S.A., SUBRAMANIAM K., FRANCIS-FLOYD R., YANONG R.P., FRASCA S. JR, GROFF J.M., POPOV V.L., FRASER W.A., YAN A., MOHAN S. & WALTZEK T.B. (2018). Phylogenomic characterization of two novel members of the genus *Megalocytivirus* from archived ornamental fish samples. *Dis. Aquat. Org.*, **130**, 11–24.

KURITA J. & NAKAJIMA K. (2012). Megalocytiviruses. *Viruses*, **4**, 521–538.

KURITA J., NAKAJIMA K., HIRONO I. & AOKI T. (1998). Polymerase chain reaction (PCR) amplification of DNA of red sea bream iridovirus (RSIV). *Fish Pathol.*, **33**, 17–23.

LOPEZ-PORRAS A., MORALES J.A., ALVARADO G., KODA S.A., CAMUS A., SUBRAMANIAM K., WALTZEK T.B. & SOTO E. (2018). Red seabream iridovirus associated with cultured Florida pompano *Trachinotus carolinus* mortality in Central America. *Dis. Aquat. Org.*, **130**, 109–115.

LU L., ZHOU S.Y., CHEN C., WENG S.P., CHAN S.-M. & HE J.G. (2005). Complete genome sequence analysis of an iridovirus isolated from the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Virology*, **339**, 81–100.

MOHR P.G., MOODY N.J.G., WILLIAMS L.M., HOAD J., CUMMINS D.M., DAVIES K.R. & CRANE M.S.J. (2015). Molecular confirmation of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) in farmed and imported ornamental fish in Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **116**, 103–110.

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. & 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.

SAWAYAMA E., KITAMURA S.-I., NAKAYAMA K., OHTA K., OKAMOTO H., OZAKI A. & TAKAGI M. (2019). Development of a novel RSIVD-resistant strain of red sea bream (*Pagrus major*) by marker-assisted selection combined with DNA-based family selection. *Aquaculture*, **506**, 188–192.

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. *Virology*, **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.

TAKANO T., MATSUYAMA T., KAWATO Y., SAKAI T., KURITA J., MATSUURA Y., TERASHIMA S., NAKAJIMA K. & NAKAYASU C. (2019). Identification of the epitope recognized by the anti-red sea bream iridovirus (RSIV) monoclonal antibody M10 using a phage display RSIV peptide library *Fish Pathol.*, **54**, 83–92.

WEN C.M. & HONG J.R. (2016). Complete genome sequence of a giant sea perch iridovirus in Kaohsiung, Taiwan. *Genome Announc.*, **4**, e01759–e15.

*
* *

NB: There is an OIE Reference Laboratory for red sea bream iridoviral disease (see Table at the end of this *Aquatic Manual* or consult the OIE web site for the most up-to-date list: <https://www.oie.int/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>).

Please contact the OIE Reference Laboratories for any further information on infection red sea bream iridoviral disease.

NB: FIRST ADOPTED IN 2000); MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 20XX.

[Volver al orden del día](#)

**USO DE LOS MÉTODOS DE ADN AMBIENTAL (ADNa)
PARA LA DETECCIÓN DE LAS ENFERMEDADES DE LOS ANIMALES ACUÁTICOS
DE LA LISTA DE LA OIE**

Documento de debate elaborado por la Comisión de Normas Sanitarias para los Animales Acuáticos de la OIE para comentario de los Miembros.

Versión: 28 de septiembre de 2021

1. Resumen

El seguimiento de los sistemas acuáticos mediante el ADN ambiental (ADNa) constituye un campo de investigación que progresa con rapidez y que permitirá poner a disposición métodos rentables y no invasivos para detectar los agentes patógenos, en particular los que afectan las poblaciones acuáticas silvestres, donde es difícil o no se recomienda la obtención de muestras.

La Comisión para los Animales Acuáticos es consciente de que se están aplicando métodos de ADNa para detectar los agentes responsables de varias enfermedades de la lista de la OIE. Dado que estos métodos están disponibles y se utilizan en la actualidad, la Comisión consideró conveniente brindar orientaciones relativas a su correcta aplicación y sus posibles límites.

La Comisión señala que, dado que no existen estimaciones precisas de los resultados del diagnóstico para diseñar programas de vigilancia que utilicen pruebas de ADNa, los datos obtenidos con métodos de ADNa no son adecuados para fundamentar las declaraciones de ausencia de las enfermedades de la lista. La confirmación de la infección por las enfermedades de la lista tampoco podría hacerse utilizando métodos de ADNa porque un resultado positivo no demuestra la infección de uno o varios animales hospedadores susceptibles.

Sin embargo, los resultados positivos de ADNa podrían aportar pruebas introductorias de una sospecha de infección tales como la presencia del patógeno ADN/ARN en la muestra. La utilización de métodos de ADNa podría resultar particularmente útil para el seguimiento de animales de gran valor o raros, como alternativa a la colecta de muestras de tejido. Igualmente, puede desempeñar un papel en la detección temprana de la incursión de enfermedad en las poblaciones silvestres o en circunstancias en las que no es probable que la infección dé lugar a signos clínicos observables. Cabe destacar que, tras la sospecha basada en un resultado positivo obtenido por un método de ADNa, las muestras obtenidas directamente de los animales acuáticos deben ser analizadas para confirmar o excluir el caso como se describe en los capítulos específicos de enfermedad correspondientes del *Manual Acuático*.

Deberá considerarse cuidadosamente la aplicación de los métodos de ADNa para una finalidad concreta. Los métodos han de elegirse teniendo en cuenta todos los factores relevantes incluyendo el objetivo de la vigilancia, el patógeno diana y el entorno que se someterá a prueba. Es importante anticipar las implicaciones de resultados positivos de la aplicación de un método de ADNa, ya que cualquier resultado positivo puede requerir llevar a cabo investigaciones que impliquen muestreo y pruebas de animales susceptibles para confirmar o excluir un caso sospechoso. Los métodos ADNa no resultarán una elección apropiada para muchas de los propósitos de vigilancia de las enfermedades de los animales acuáticos.

Este documento tiene como objetivo estudiar el posible uso de los métodos de ADNa en el contexto de las normas del *Código Sanitario para los Animales Acuáticos (Código Acuático)* y del *Manual Acuático* de la OIE, además de destacar sus ventajas y limitaciones.

Se incluyó el uso de un método de ADNa para la detección de *Gyrodactylus salaris* en el Capítulo 2.3.3. del *Manual Acuático* relativo a la infección por *Gyrodactylus salaris*¹¹. La inclusión de este método se ajusta a las conclusiones del presente documento de debate.

2. Definiciones del ADNa

Existen numerosas definiciones del ADNa (por ejemplo, Bass et al., 2015; Díaz-Ferguson y Moyer, 2014; Thomsen y Willerslev, 2015). La mayoría consideran el ADNa como fragmentos cortos de ADN/ARN detectables de un organismo vivo derivados de componentes celulares o fluidos secretados en los componentes abióticos del medio ambiente circundante (es decir, agua, aire, sedimentos).

¹¹ [Acceso en línea al Manual Acuático - OIE - Organización Mundial de Sanidad Animal](#)

A efectos del presente documento, definimos el ADN_a como "ácidos nucleicos extraídos de muestras ambientales 'verdaderas' (como agua, suelo, sedimento y biofilm)". Queda excluido de esta definición el material derivado directamente del hospedador (como las heces, las células desprendidas y las mucosas). Una vez extraídos de la muestra ambiental, pueden detectarse los fragmentos de ADN_a buscado empleando una variedad de métodos moleculares (Díaz-Ferguson & Moyer, 2014). Además, el ADN_a puede secuenciarse directamente como bibliotecas metagenéticas o tras la amplificación por PCR de regiones genéticas específicas de la diana (Bass et al., 2015).

El rendimiento real de la detección basada en el ADN_a depende de la metodología de obtención y procesamiento de la muestra (por ejemplo, el volumen filtrado, la presencia y la eliminación de inhibidores de la PCR), de procesos biológicos (por ejemplo, tasas de diseminación, variación temporal) y de factores abióticos (degradación del analito, factores hidrodinámicos). Es importante evaluar estos factores empíricamente, con el fin de poder interpretar los resultados correctamente. Sólo con una clara comprensión de cómo influyen estos factores en la probabilidad de detección de agentes patógenos se podrá utilizar la detección basada en el ADN_a de forma fiable en diversos entornos (Brunner, 2020).

3. Objetivos

En este documento se examinan i) las ventajas y ii) las limitaciones de los métodos de detección de agentes patógenos por ADN_a, iii) la validación de los métodos de ADN_a, iv) las condiciones para la inclusión de un método de ADN_a en un capítulo específico de enfermedades del *Manual Acuático* y v) el uso de las pruebas de ADN_a como criterio de diagnóstico.

4. Revisión de los métodos de ADN_a publicados para la detección de agentes patógenos en animales acuáticos

Se realizó una revisión de la literatura para evaluar la aplicación de los métodos de ADN_a con fines de detección y estudio de patógenos y parásitos de los animales acuáticos. Se identificaron 33 publicaciones que informaban del uso del ADN_a para detectar 13 agentes patógenos de la lista de la OIE (para más detalles, véase el Cuadro 1 del Anexo 1). Se han desarrollado métodos para la detección de los agentes causantes de los agentes patógenos de la lista de la OIE de anfibios, crustáceos, peces y moluscos. La mayoría de las publicaciones se refieren a la detección de los agentes patógenos de la lista en poblaciones de animales acuáticos silvestres, en particular la infección por *Aphanomyces astaci*, la infección por *Batrachochytrium dendrobatidis*, la infección por *B. salamandrivorans*, la infección por especies de Ranavirus y la infección por *G. salaris*.

Se consultaron otras 13 publicaciones que tenían como objetivo otros agentes patógenos específicos (por ejemplo, *Microcytos mackini*), grupos de agentes patógenos (por ejemplo, de peces ornamentales) o que aplicaban los métodos de ADN_a a áreas de estudio más amplias (por ejemplo, la transmisión de virus a través del agua) (véase el Apéndice 1, Tabla 2 para más detalles).

5. Beneficios de los métodos de ADN_a para la detección de agentes patógenos de animales acuáticos

La detección de ADN_a es una herramienta prometedora que puede utilizarse para complementar el muestreo directo de los animales acuáticos con fines de vigilancia. Los métodos de ADN_a ofrecen algunas ventajas en comparación con el muestreo y las pruebas directas de los animales acuáticos, entre las que se incluyen las siguientes

1. Los métodos de ADN_a no requieren un muestreo intrusivo o letal de los animales acuáticos huéspedes. Pueden ser especialmente útiles para animales acuáticos raros o valiosos, o para animales silvestres difíciles de coleccionar (por ejemplo, Rusch et al., 2018).
2. Los métodos de ADN_a no requieren la manipulación de los animales, lo que evita el estrés asociado a la obtención de muestras de tejido no invasivas (Brunner, 2020).
3. El tiempo de obtención y procesamiento de las muestras y los costes asociados pueden reducirse sustancialmente en comparación con la toma y el procesamiento de muestras individuales de animales (Rusch et al., 2018)
4. Dado que las muestras ambientales pueden contener analitos de toda la población cautiva, o de un gran porcentaje de ella, se necesitarían muchas menos muestras para detectar un agente patógeno (en comparación con las muestras individuales de animales), incluso cuando la sensibilidad diagnóstica del método de ADN_a sea baja (Brunner, 2020).
5. La misma muestra ambiental puede analizarse para detectar la presencia de especies hospedadoras (por ejemplo, véase Rusch et al., 2018) y de múltiples patógenos.
6. Los métodos de ADN_a pueden emplearse para la evaluación de las posibles vías de introducción en las que no sea posible el muestreo de los huéspedes (por ejemplo, agua de lastre).

6. Límites de los métodos de ADN

Las limitaciones de la aplicación de la detección de agentes patógenos basada en el ADN son, entre otras, las siguientes:

1. Puede existir muy poco ADN del patógeno diana disponible en la muestra ambiental debido a la dilución en el medio ambiente y a la degradación de los ácidos nucleicos, lo que puede afectar negativamente la sensibilidad del método (Brunner, 2020).
2. La concentración de ADN diana en una muestra ambiental varía dependiendo de una serie de factores como la densidad de huéspedes, la prevalencia y la intensidad de la infección, el método de muestreo (por ejemplo, el volumen de agua muestreado, el tamaño de los poros del filtro, las condiciones de almacenamiento) y las condiciones ambientales (por ejemplo, la cantidad de materia orgánica). Por lo tanto, la sensibilidad de los métodos de ADN puede variar más en función de los puntos de muestreo, del momento de realización de los estudios y de los taxones objetivo si se compara con el muestreo directo y el análisis de los tejidos animales (Brunner, 2020).
3. Si bien existen marcos formales para evaluar el rendimiento diagnóstico de las pruebas que utilizan muestras derivadas de animales, éstos todavía no se han desarrollado para los métodos de ADN. Esto significa que el diseño de encuestas para demostrar la ausencia de infección utilizando métodos de ADN es problemático.
4. Es más factible que una detección positiva de ADN del patógeno diana en una muestra ambiental se derive de una fuente de contaminación no representativa del patógeno viable (por ejemplo, patógeno inactivado de productos que han recibido un tratamiento térmico) en comparación con las muestras derivadas de animales. Del mismo modo, puede no indicar la infección de un animal huésped con el agente patógeno diana.

7. Validación de los métodos ADN

Cada vez es más probable que las decisiones de gestión de la enfermedad se tomen basándose en los resultados de los estudios de ADN. Por lo tanto, es imperativo que los datos generados por los estudios de ADN sean fiables, defendibles y ejecutados con altos estándares de garantía de calidad (Klymus et al., 2019). La validación empírica de la detección de patógenos basada en el ADN deberá centrarse en comprender las causas y las consecuencias de la variación de las características de la prueba a través de las condiciones de muestreo y necesita tomar en consideración una clara comprensión de lo que se ha muestreado/analizado para el caso de cada patógeno de interés.

En el Capítulo 1.1.2. del *Manual Acuático*, se describen los principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas. Las recomendaciones de este capítulo están destinadas a las pruebas de diagnóstico de muestras derivadas de animales; sin embargo, los principios y muchos de los métodos son aplicables a los métodos de ADN. Se recomienda aplicar los principios y métodos del Capítulo 1.1.2. a la validación de los métodos de detección de ADN para las enfermedades de la lista de la OIE en algunos casos. Conviene observar que deberá hacerse hincapié y validarse el proceso de colecta de muestras, la concentración del ADN diana, la extracción del ADN, la sensibilidad y otros resultados (indicadores).

Se disponen de normas de diseño y notificación para los estudios de precisión diagnóstica de los métodos que utilizan muestras derivadas de animales acuáticos (por ejemplo, Laurin et al., 2018). Muchas de las consideraciones sobre el diseño y la presentación de informes también son aplicables a los métodos de ADN y se recomienda emplear estas normas para los estudios de precisión diagnóstica del ADN.

Además de las orientaciones descritas anteriormente, se han publicado consideraciones sobre el diseño y la presentación de informes específicamente para los métodos de ADN (por ejemplo, Doyle & Uthicke, 2020; Goldberg et al., 2016; Klymus et al., 2019). Muchos de estos estudios informan sobre consideraciones que se encaminan más a la detección de macroorganismos que a los agentes patógenos; sin embargo, las consideraciones son generalmente relevantes para los métodos de detección de ADN para agentes patógenos. Estas orientaciones serán de especial utilidad para la obtención, el procesamiento y la conservación de muestras de ADN en el terreno.

8. Requisitos mínimos para la inclusión de un método de ADN en el *Manual Acuático*

Se reconoce que muchos métodos de diagnóstico incluidos actualmente en el *Manual Acuático* no cumplen las etapas de validación descritas en el Capítulo 1.1.2. del *Manual Acuático* y con las normas de diseño y notificación descritas por Laurin et al., 2018 (véase más arriba). De hecho, varias de las pruebas que figuran en el *Manual Acuático* sólo alcanzan a validarse hasta la etapa 1 o 2 descrita en el Capítulo 1.1.2. del *Manual Acuático*.

Por esta razón, la Comisión propone que se cumplan los siguientes requisitos mínimos de notificación para que un método de ADN sea considerado para su inclusión en el *Manual Acuático* [Adaptado de Goldberg et al., (2016)]:

1. Definición clara de la finalidad o de la aplicación prevista de la prueba o del protocolo (téngase en cuenta que las finalidades de uso apropiadas para los métodos de ADN en el contexto de las normas de la OIE se examinan más a fondo en la sección 9).
 2. Descripción de los métodos de obtención de muestras y de las precauciones adoptadas para eliminar la contaminación, incluidos el volumen de recogida, el material de los recipientes, los controles negativos, el número de réplicas y los lugares y la profundidad de muestreo
 3. Descripción de los métodos utilizados para concentrar el ADN/ARN objetivo (precipitación / filtro), tipo de filtro (si procede) y lugar del filtrado (por ejemplo, en el campo).
 4. Descripción de la conservación y el almacenamiento de la muestra (método, temperatura, duración).
 5. Descripción del proceso de extracción de ADN/ARN, incluidos los ajustes del protocolo, las precauciones de contaminación, los controles negativos y los controles positivos internos
 6. Descripción del método de detección molecular y optimización de acuerdo con (Bustin et al., 2009). Además, las pruebas de PCR en tiempo real deben ser validados (Nivel 1) en una matriz ambiental de acuerdo con su finalidad.
9. **Posible aplicación de los métodos de detección de ADN en los capítulos específicos de enfermedad del *Manual Acuático***

En los capítulos del *Manual Acuático* dedicados a las enfermedades se recomiendan pruebas para identificar los casos sospechosos y para confirmar la sospecha en los animales aparentemente sanos (o de estado de salud desconocido) y clínicamente afectados. Las poblaciones aparentemente sanas pueden caer bajo sospecha, y por lo tanto ser muestreadas, si existe(n) un vínculo epidemiológico con una población infectada. La proximidad geográfica o el movimiento de animales acuáticos o productos o equipos de animales acuáticos, etc., de una población infectada conocida equivalen a un vínculo epidemiológico. Alternativamente, en las encuestas se toman muestras de poblaciones sanas para demostrar que están libres de enfermedad.

Los siguientes puntos describen la idoneidad de las pruebas de los métodos de detección de ADN para su inclusión como criterios de definición de casos en la sección 6 de los capítulos específicos de enfermedades del *Manual Acuático*.

a) Animales aparentemente sanos

i) Definición de caso sospechoso en una población de animales aparentemente sanos

Adecuado como criterio. Se considera que un resultado positivo obtenido con un método de ADN recomendado en el *Manual Acuático* proporciona pruebas adecuadas para ser incluido como criterio para un caso sospechoso cuando existen especies susceptibles conocidas en el entorno en el que se ha tomado la muestra.

ii) Definición de caso confirmado en animales aparentemente sanos

No es adecuado como criterio. Se considera que un resultado positivo obtenido a partir de un método de ADN recomendado en el *Manual Acuático* no proporciona pruebas adecuadas para confirmar un caso en animales aparentemente sanos. Los métodos que utilizan muestras derivadas de animales se consideran más apropiados como criterio para confirmar un caso. Las pruebas para confirmar un caso en animales aparentemente sanos deben cumplir con los requisitos de la Sección 6.1.2. del capítulo específico de la enfermedad correspondiente del *Manual Acuático*.

b) Animales clínicamente afectados

i) Definición de caso sospechoso en animales afectados clínicamente

Adecuado como criterio. En general, no se recomienda tomar una muestra ambiental para investigar la causa de la enfermedad en una población de animales clínicamente afectados, ya que es más probable que las muestras de animales clínicamente afectados conduzcan a la detección de un agente patógeno y sean más adecuadas para la investigación de la enfermedad. Sin embargo, en algunas circunstancias, un método de ADN puede detectar un agente patógeno y conducir al reconocimiento de signos clínicos de enfermedad no observados previamente o no asociados con la misma. En estas circunstancias, se considera que un resultado positivo obtenido con un método de ADN recomendado en el *Manual Acuático* ofrece pruebas adecuadas para ser incluido como criterio de un caso sospechoso.

ii) Definición de caso confirmado

No es adecuado como criterio. Un resultado positivo de un método de ADN recomendado en el *Manual Acuático* no se incluiría como criterio para la confirmación de un agente patógeno en animales clínicamente afectados (o aparentemente sanos, véase el punto 9.a.ii. anterior). Cualquier prueba positiva de ADN requeriría una investigación adicional que incluya la obtención y el análisis de tejidos animales, tal y como se estipula en el capítulo específico de la enfermedad correspondiente del *Manual Acuático*. Las pruebas para confirmar un caso en animales clínicamente afectados deberán cumplir los requisitos del apartado 6.2.2. del capítulo correspondiente del *Manual Acuático* dedicado a la enfermedad.

10. Discusión

Un país o una zona que se declare libre de uno o varios agentes patógenos específicos deberá disponer de un sistema de detección precoz de la incursión de la enfermedad. La notificación de la morbilidad y la mortalidad por parte de los criaderos es un componente clave de un sistema de detección precoz. Las poblaciones cultivadas pueden actuar como centinelas de las poblaciones silvestres sólo si están conectadas epidemiológicamente (por ejemplo, a través de aguas compartidas). De lo contrario, se requiere una vigilancia activa de las poblaciones silvestres, ya que es poco probable que se notifique la morbilidad o la mortalidad (sobre todo porque es posible que los animales muertos o moribundos se les devore rápidamente o sen objeto de depredadores). El muestreo de animales de poblaciones silvestres puede presentar considerables desafíos logísticos, especialmente si las poblaciones son remotas, escasas o si el bajo número hace que el muestreo invasivo no sea deseable. Los métodos de detección de agentes patógenos basados en el ADN superan muchos de los desafíos del muestreo de animales acuáticos silvestres (Kamoroff & Goldberg, 2017; Trebitz et al., 2017).

La infección por algunos agentes patógenos de la lista, en determinadas condiciones o en algunas especies hospedadoras, no causará invariablemente signos clínicos detectables. Los sistemas de detección precoz que se basan en las observaciones de mortalidad o morbilidad por parte de los criaderos (o de otras personas) son ineficaces en estas circunstancias y se requeriría una vigilancia activa. El muestreo frecuente de animales de cría, y a un nivel que permita detectar una baja prevalencia, presenta considerables desafíos logísticos y es probable que el coste sea inaceptable. Los métodos de ADN pueden ofrecer una alternativa viable (Trujillo-González et al., 2019a) para la vigilancia activa de patógenos que pueden no causar de forma fiable signos clínicos observables. Tienen la ventaja adicional de que la muestra contendrá analitos de un gran porcentaje, sino de toda la población cautiva. Por lo tanto, se necesitan relativamente pocas muestras ambientales, en comparación con las muestras de animales (siempre que se pueda extraer suficiente ADN/ARN).

Las principales limitaciones del ADN son la falta de datos de validación y de rendimiento del diagnóstico, lo que significa que los resultados negativos no pueden utilizarse para demostrar la ausencia de la enfermedad y que los resultados positivos siempre requieren la confirmación con muestras de animales (Brunner, 2020). Sin embargo, hay circunstancias en las que las ventajas del muestreo ambiental, en lugar del animal, permiten que los enfoques de ADN puedan integrarse de forma útil en un programa de vigilancia.

11. Conclusiones

1. Los métodos de ADN pueden ser útiles para mejorar los sistemas de vigilancia pasiva en términos de detección precoz; en particular, en los casos en que las condiciones no son propicias para la expresión clínica de la enfermedad, o las poblaciones no están bajo suficiente observación para detectar la enfermedad clínica si se produce.
2. Los métodos de ADN pueden ser útiles para animales acuáticos silvestres raros, valiosos o difíciles de coleccionar, en los que el muestreo directo de los animales no es deseable o tiene un coste prohibitivo. También pueden ofrecer ventajas a nivel de precios para los programas de seguimiento de enfermedades en entornos de producción.
3. Actualmente no existen marcos que permitan evaluar el rendimiento diagnóstico de los métodos de ADN de forma similar a las muestras derivadas de animales. Por esta razón, las pruebas de los métodos de detección de ADN no pueden utilizarse como prueba para la autodeclaración de ausencia de enfermedad.
4. Los métodos de ADN se considerarán para su inclusión en los capítulos específicos de enfermedades del *Manual Acuático*, si se cumplen las normas mínimas de enfermedad y notificación descritas en este documento.
5. Los resultados positivos de los métodos de ADN que se han incluido en el *Manual Acuático* se considerarán como un criterio apropiado para un caso sospechoso de una enfermedad.
6. La aplicación de los métodos de ADN para una finalidad concreta han de considerarse cuidadosamente con respecto al patógeno detectado y al entorno objeto de prueba, la fiabilidad del método y las implicaciones de los

resultados positivos que pueden requerir estudios de las poblaciones susceptibles para confirmar o excluir un caso sospechoso.

7. Los resultados positivos de un método de ADN incluido en el *Manual Acuático* no se considerarán un criterio apropiado para un caso confirmado de una enfermedad en animales aparentemente sanos o clínicamente afectados.

Referencias

- ALZAYLAEE H., COLLINS R.A., RINALDI G., SHECHONGE A., NGATUNGA B., MORGAN E.R. & GENNER M.J. (2020). Schistosoma species detection by environmental DNA assays in African freshwaters. *PLOS Neglect. Trop. Dis.*, 14:e0008129.
- AUDEMARD C., REECE K.S. & BURRESON E.M. (2004). Real-Time PCR for Detection and Quantification of the Protistan Parasite *Perkinsus marinus* in Environmental Waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 6611–6618.
- BASS D., STENTIFORD G.D., LITTLEWOOD D.T.J. & HARTIKAINEN H. (2015). Diverse Applications of Environmental DNA Methods in Parasitology. *Trends Parasitol.*, 31, 499–513.
- BASTOS GOMES G., HUTSON K.S., DOMINGOS J.A., CHUNG C., HAYWARD S., MILLER T.L. & JERRY D.R. (2017). Use of environmental DNA (eDNA) and water quality data to predict protozoan parasites outbreaks in fish farms. *Aquaculture*, 479, 467–473.
- BASTOS GOMES G., HUTSON K.S., DOMINGOS J.A., INFANTE VILLAMIL S., HUERLIMANN R., MILLER T.L. & JERRY D.R. (2019). Parasitic protozoan interactions with bacterial microbiome in a tropical fish farm. *Aquaculture*, 502, 196–201.
- BERNHARDT L., MYRMEL M., LILLEHAUG A., QVILLER L. & WELI S. (2020). Filtration, concentration and detection of salmonid alphavirus in seawater during a post-smolt salmon (*Salmo salar*) cohabitant challenge. *Dis. Aquatic. Org.*, 144, 61–73.
- BRANNELLY L.A., WETZEL D.P., OHMER M.E.B., ZIMMERMAN L., SAENZ V. & RICHARDS-ZAWACKI C.L. (2020). Evaluating environmental DNA as a tool for detecting an amphibian pathogen using an optimized extraction method. *Oecologia*, 194, 267–281.
- BRUNNER J.L. (2020). Pooled samples and eDNA-based detection can facilitate the “clean trade” of aquatic animals. *Sci. Rep.*, 10, 10280.
- BUSTIN S.A., BENES V., GARSON J.A., HELLEMANS J., HUGGETT J., KUBISTA M., MUELLER R., NOLAN T., PFAFFL M.W., SHIPLEY G.L., VANDESOMPELE J. & WITTWER C.T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.*, 55, 611–622.
- DIAZ-FERGUSON E.E. & MOYER G.R. (2014). History, applications, methodological issues and perspectives for the use environmental DNA (eDNA) in marine and freshwater environments. *Rev. Biol. Trop.*, 62, 1273–1284.
- DOYLE J. & UTHICKE S. (2020). Sensitive environmental DNA detection via lateral flow assay (dipstick) – A case study on corallivorous crown-of-thorns sea star (*Acanthaster cf. solaris*) detection. *Environ. DNA*, 1–20.
- FOSSOY F., BRANDSEGG H., SIVERTSGÅRD R., PETTERSEN O., SANDERCOCK B.K., SOLEM Ø., HINDAR K. & MO T.A. (2020). Monitoring presence and abundance of two gyrodactylid ectoparasites and their salmonid hosts using environmental DNA. *Environ. DNA*, 2, 53–62.
- GOLDBERG C.S., TURNER C.R., DEINER K., KLYMUS K.E., THOMSEN P.F., MURPHY M.A., SPEAR S.F., MCKEE A., OYLER-MCCANCE S.J., CORNMAN R.S., LARAMIE M.B., MAHON A.R., LANCE R.F., PILLIOD D.S., STRICKLER K.M., WAITS L.P., FREMIER A.K., TAKAHARA T., HERDER J.E. & TABERLET P. (2016). Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods Ecol. Evol.*, 7, 1299–1307.
- GREGORY A., MUNRO L.A., SNOW M., URQUHART K.L., MURRAY A.G. & RAYNARD R.S. (2009). An experimental investigation on aspects of infectious salmon anaemia virus (ISAV) infection dynamics in seawater Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.*, 32, 481–489.
- HALL E.M., CRESPI E.J., GOLDBERG C.S. & BRUNNER J.L. (2016). Evaluating environmental DNA-based quantification of

ranavirus infection in wood frog populations. *Molec. Ecol. Resour.*, **16**, 423–433.

HARAMOTO E., KITAJIMA M., KATAYAMA H. & OHGAKI S. (2007). Detection of koi herpesvirus DNA in river water in Japan. *J. Fish Dis.*, **30**, 59–61.

HOLT C., FOSTER R., DANIELS C.L., VAN DER GIEZEN M., FEIST S.W., STENTIFORD G.D. & BASS D. (2018). *Halioticida noduliformans* infection in eggs of lobster (*Homarus gammarus*) reveals its generalist parasitic strategy in marine invertebrates. *J. Invertebr. Pathol.*, **154**, 109–116.

HONJO M.N., MINAMOTO T. & KAWABATA Z. (2012). Reservoirs of Cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3) DNA in sediments of natural lakes and ponds. *Vet. Microbiol.*, **155**, 183–190.

HONJO M.N., MINAMOTO T., MATSUI K., UCHII K., YAMANAKA H., SUZUKI A.A., KOHMATSU Y., IIDA T. & KAWABATA Z. (2010). Quantification of cyprinid herpesvirus 3 in environmental water by using an external standard virus. *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 161–168.

HUVER J.R., KOPRIVNIKAR J., JOHNSON P.T.J. & WHYARD S. (2015). Development and application of an eDNA method to detect and quantify a pathogenic parasite in aquatic ecosystems. *Ecol. Appl.*, **25**, 991–1002.

JORGENSEN L., VON G., NIELSEN J.W., VILLADSEN M.K., VISMANN B., DALVIN S., MATHIESSEN H., MADSEN L., KANIA P.W. & BUCHMANN K. (2020). A non-lethal method for detection of *Bonamia ostreae* in flat oyster (*Ostrea edulis*) using environmental DNA. *Sci. Rep.*, **10**, 1–9.

JULIAN J.T., GLENNEY G.W. & REES C. (2019). Evaluating observer bias and seasonal detection rates in amphibian pathogen eDNA collections by citizen scientists. *Dis. Aquat. Org.*, **134**, 15–24.

KAMOROFF C. & GOLDBERG C.S. (2017). Using environmental DNA for early detection of amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* prior to a rapid die-off. *Dis. Aquat. Org.*, **127**, 75–79.

KLYMUS K.E., MERKES C.M., ALLISON M.J., GOLDBERG C.S., HELBING C.C., HUNTER M.E., JACKSON C.A., LANCE R.F., MANGAN A.M., MONROE E.M., PIAGGIO A.J., STOKDYK J.P., WILSON C.C. & RICHTER C.A. (2019). Reporting the limits of detection and quantification for environmental DNA assays. *Environ. DNA*, 1–12.

KONGRUENG J., YINGKAJORN M., BUNPA S., SERMWITTAYAWONG N., SINGKHAMANAN K. & VUDDHAKUL V. (2015). Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease in southern Thailand. *J. Fish Dis.* **38**, 957–966.

LAFFERTY K.D. & BEN-HORIN T. (2013). Abalone farm discharges the withering syndrome pathogen into the wild. *Front. Microbiol.*, **4**, 1–5.

LAURIN, E., THAKUR, K.K., GARDNER, I.A., HICK, P., MOODY, N.J., CRANE, M. & ERNST, I. (2018). Design standards for experimental and field studies to evaluate diagnostic accuracy of tests for infectious diseases in aquatic animals. *J. Fish Dis.*, **41**, 729–749.

MAHON A.R., HORTON D.J., LEARMAN D.R., NATHAN L.R. & JERDE C.L. (2018). Investigating diversity of pathogenic microbes in commercial bait trade water. *PeerJ.*, 6:e5468.

MIAUD C., ARNAL V., POULAIN M., VALENTINI A. & DEJEAN T. (2019). eDNA increases the detectability of ranavirus infection in an alpine amphibian population. *Viruses*, **11**, 1–15.

MOSHER B.A., HUYVAERT K.P., CHESTNUT T., KERBY J.L., MADISON J.D. & BAILEY L.L. (2017). Design- and model-based recommendations for detecting and quantifying an amphibian pathogen in environmental samples. *Ecol. Evol.*, **7**, 10952–10962.

NATIVIDAD K.D.T., NOMURA N. & MATSUMURA M. (2008). Detection of White spot syndrome virus DNA in pond soil using a 2-step nested PCR. *J. Virol. Methods*, **149**, 28–34.

OIDTMANN B., DIXON P., WAY K., JOINER C. & BAYLEY A.E. (2018). Risk of waterborne virus spread – review of survival of

relevant fish and crustacean viruses in the aquatic environment and implications for control measures. *Rev. Aquacult.*, **10**, 641–669.

PIERSON T.W. & HORNER A.A. (2016). Environmental DNA (eDNA) sampling for amphibian pathogens. Southeastern Partners in Amphibian and Reptile Conservation (SEPARC), Disease, Pathogens and Parasites Task Team: Information Sheet #19.

POLINSKI M.P., MEYER G.R., LOWE G.J. & ABBOTT C.L. (2017). Seawater detection and biological assessments regarding transmission of the oyster parasite *Mikrocytos mackini* using qPCR. *Dis. Aquat. Org.*, **126**, 143–153.

QUANG N.D., HOA P.T.P., DA T.T. & ANH P.H. (2009). Persistence of white spot syndrome virus in shrimp ponds and surrounding areas after an outbreak. *Environ. Monit. Assess.*, **156**, 69–72.

ROBINSON C.V., UREN WEBSTER T.M., CABLE J., JAMES J. & CONSUEGRA S. (2018). Simultaneous detection of invasive signal crayfish, endangered white-clawed crayfish and the crayfish plague pathogen using environmental DNA. *Biol. Conserv.*, **222**, 241–252.

RUSCH J.C., HANSEN H., STRAND D.A., MARKUSSEN T., HYTTERØD S. & VRÅLSTAD T. (2018). Catching the fish with the worm: a case study on eDNA detection of the monogenean parasite *Gyrodactylus salaris* and two of its hosts, Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Parasite. Vector.*, **11**, 333.

RUSCH J. C., MOJŽIŠOVÁ M., STRAND D.A., SVOBODOVÁ J., VRÅLSTAD T. & PETRUSEK A. (2020). Simultaneous detection of native and invasive crayfish and *Aphanomyces astaci* from environmental DNA samples in a wide range of habitats in Central Europe. *NeoBiota*, **58**, 1–32.

SALAMA N. & RABE B. (2013). Developing models for investigating the environmental transmission of disease-causing agents within open-cage salmon aquaculture. *Aquacult. Env. Interac.*, **4**, 91–115.

SANA S., WILLIAMS C., HARDOUIN E.A., BLAKE A., DAVISON P., PEGG J., PALEY R., ZHANG T. & ANDREOU D. (2018). Phylogenetic and environmental DNA insights into emerging aquatic parasites: implications for risk management. *Int. J. Parasitol.*, **48**, 473–481.

SPITZEN-VAN DER SLUIJS A., STARK T., DEJEAN T., VERBRUGGHE E., HERDER J., GILBERT M., JANSE J., MARTEL A., PASMANS F. & VALENTINI A. (2020). Using environmental DNA for detection of *Batrachochytrium salamandrivorans* in natural water. *Environ. DNA*, **2**, 565–571.

STRAND D.A., HOLST-JENSEN A., VILJUGREIN H., EDVARDSEN B., KLAVENESS D., JUSSILA J. & VRÅLSTAD T. (2011). Detection and quantification of the crayfish plague agent in natural waters: Direct monitoring approach for aquatic environments. *Dis. Aquat. Org.*, **95**, 9–17.

STRAND D.A., JUSSILA J., JOHNSEN S.I., VILJAMAA-DIRKS S., EDSMAN L., WIIK-NIELSEN J., VILJUGREIN H., ENGDAHL F. & VRÅLSTAD T. (2014). Detection of crayfish plague spores in large freshwater systems. *J. Appl. Ecol.*, **51**, 544–553.

THOMSEN P.F. & WILLERSLEV E. (2015). Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biol. Conserv.*, **183**, 4–18.

TREBITZ A.S., HOFFMAN J.C., DARLING J.A., PILGRIM E.M., KELLY J.R., BROWN E.A., CHADDERTON W.L., EGAN S.P., GREY E.K., HASHSHAM S.A., KLYMUS K.E., MAHON A.R., RAM J.L., SCHULTZ M.T., STEPIEN C.A. & SCHARDT J.C. (2017). Early detection monitoring for aquatic non-indigenous species: Optimizing surveillance, incorporating advanced technologies, and identifying research needs. *J. Environ. Manage.*, **202**, 299–310.

TRUJILLO-GONZALEZ A., BECKER J.A., HUERLIMANN R., SAUNDERS R.J. & HUTSON K.S. (2019a). Can environmental DNA be used for aquatic biosecurity in the aquarium fish trade? *Biol. Invasions*, **22**, 1011–1025.

TRUJILLO-GONZALEZ A., EDMUNDS R. C., BECKER J.A. & HUTSON K.S. (2019b). Parasite detection in the ornamental fish trade using environmental DNA. *Sci. Rep.*, **9**, 1–9.

VILACA S.T., GRANT S.A., BEATY L., BRUNETTI C.R., CONGRAM M., MURRAY D.L., WILSON C.C. & KYLE C.J. (2020).

Detection of spatiotemporal variation in ranavirus distribution using eDNA. *Environ. DNA*, **2**, 210–220.

VRALSTAD T., STRAND D., RUSCH J., TOVERUD O., JOHNSEN S.I., TARPAL A., RASK-MOLLER P. & GJERVE A.-G. (2016). The surveillance programme for *Aphanomyces astaci* in Norway 2016. Norwegian Veterinary Institute.

WALKER S.F., SALAS M.B., JENKINS D., GARNER T.W.J., CUNNINGHAM A.A., HYATT A.D., BOSCH J. & FISHER M.C. (2007). Environmental detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in a temperate climate. *Dis. Aquat. Org.*, **77**, 105–112.

WELI S.C., BERNHARDT L.-V., QVILLER L., MYRMEL M. & LILLEHAUG A. (2021). Development and evaluation of a method for concentration and detection of salmonid alphavirus from seawater. *J. Virol. Methods*, **287**, 113990.

WITTWER C., NOWAK C., STRAND D.A., VRÅLSTAD T., THINES M. & STOLL S. (2018a). Comparison of two water sampling approaches for eDNA-based crayfish plague detection. *Limnologica*, **70**, 1–9.

WITTWER C., STOLL S., STRAND D., VRÅLSTAD T., NOWAK C. & THINES M. (2018b). eDNA-based crayfish plague monitoring is superior to conventional trap-based assessments in year-round detection probability. *Hydrobiologia*, **807**, 87–97.

Appendix 1. Publications describing eDNA methods for aquatic animal pathogenic agents

Table 1. Published applications of eDNA methods for the detection of OIE listed pathogenic agents of aquatic animals

OIE LISTED DISEASE	PUBLICATION
Amphibian diseases	
Infection with <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	Brannelly <i>et al.</i> , 2020; Julian <i>et al.</i> , 2019; Kamoroff & Goldberg, 2017; Mosher <i>et al.</i> , 2017; Pierson & Horner, 2016; Walker <i>et al.</i> , 2007
Infection with <i>Batrachochytrium salamandrivorans</i>	Brunner, 2020; Spitzen-van der Sluijs <i>et al.</i> , 2020
Infection with Ranavirus species	Hall <i>et al.</i> , 2016; Julian <i>et al.</i> , 2019; Miaud <i>et al.</i> , 2019; Pierson & Horner, 2016; Vilaca <i>et al.</i> , 2020
Fish diseases	
Infection with <i>Gyrodactylus salaris</i>	Fossoy <i>et al.</i> , 2020; Rusch <i>et al.</i> , 2018;
Infection with HPR-deleted or HPRO infectious salmon anaemia virus	Gregory <i>et al.</i> , 2009
Infection with koi herpesvirus	Haramoto <i>et al.</i> , 2007; Honjo <i>et al.</i> , 2010; 2012
Infection with salmonid alphavirus	Bernhardt <i>et al.</i> , 2020; Weli <i>et al.</i> , 2021
Crustacean diseases	
Acute hepatopancreatic necrosis disease	Kongrueng <i>et al.</i> , 2015
Infection with <i>Aphanomyces astaci</i> (crayfish plague)	Robinson <i>et al.</i> , 2018; Rusch <i>et al.</i> , 2020; Strand <i>et al.</i> , 2011; 2014; Vralstad <i>et al.</i> , 2016; Wittwer <i>et al.</i> , 2018a; 2018b
Infection with white spot syndrome virus	Natividad <i>et al.</i> , 2008; Quang <i>et al.</i> , 2009
Mollusc diseases	
Infection with <i>Bonamia ostreae</i>	Jorgensen <i>et al.</i> , 2020
Infection with <i>Perkinsus marinus</i>	Audemard <i>et al.</i> , 2004
Infection with <i>Xenohaliotis californiensis</i>	Lafferty & Ben-Horin, 2013

Table 2. Published eDNA studies of pathogenic agents of aquatic animals not listed by the OIE

SUBJECT	PUBLICATION
Ornamental fish parasite detection	Trujillo-Gonzalez <i>et al.</i> , 2019b; 2019a
Parasitology	Bass <i>et al.</i> , 2015
Protozoan parasite outbreaks in fish farms	Bastos Gomes <i>et al.</i> 2017; 2019
Disease transmission in open water Salmon cages	Salama & Rabe, 2013
Emerging aquatic parasites	Sana <i>et al.</i> , 2018
Pathogenic microbes in bait	Mahon <i>et al.</i> , 2018
Waterborne virus detection	Oidtman <i>et al.</i> , 2018
<i>Haliotidica noduliformans</i> in lobsters	Holt <i>et al.</i> , 2018
<i>Microcytos mackini</i>	Polinski <i>et al.</i> , 2017
Trematode parasite <i>Ribierioia ondatrae</i>	Huver <i>et al.</i> , 2015
<i>Schistosoma</i> species	Alzaylce <i>et al.</i> , 2020

[Volver al orden del día](#)

Aquatic Manual disease chapters Table 4.1. OIE recommended diagnostic methods and their level of validation for surveillance of apparently healthy animals and investigation of clinically affected animals: current Key for Table 4.1 with suggested edits tracked)

4. Diagnostic methods

The methods currently available for identifying infection-pathogen detection that can be used in i) surveillance of apparently healthy ~~populations~~ animals, ii) presumptive diagnosis in clinically affected animals and iii) confirmatory diagnostic purposes are listed in Table 4.1. by animal life stage.

The designations used in the Table indicate:

Ratings against for purposes of use. For each recommended assay a qualitative rating against for the purpose of use is provided. The ratings are determined based on multiple performance and operational factors relevant to application of an assay for a defined purpose. These factors include appropriate diagnostic performance characteristics, level of assay validation, successful application by diagnostic laboratories, availability cost, timeliness, and sample throughput and operability. For a specific purpose of use, assays are rated as:

Key:

+++ = Most suitable Methods are most suitable with desirable performance and operational characteristics.

++ = Suitable Method(s) are suitable with acceptable performance and operational characteristics under most circumstances.

+ = Less suitable Methods are suitable but performance or operational characteristics may significantly limit application under some circumstances.

Shaded boxes = Not appropriate for this purpose.

~~The selection of a test for a given purpose depends on the analytical and diagnostic sensitivities and specificities repeatability and reproducibility. OIE Reference Laboratories welcome feedback on diagnostic performance for assays, in particular PCR methods, for factors affecting assay analytical sensitivity or analytical specificity, such as tissue components inhibiting amplification, presence of nonspecific or uncertain bands, etc., and any assays that are in the +++ category.~~

Validation stage. The validation stage corresponds to the assay development and validation pathway in chapter 1.1.2. The validation stage is specific to each purpose of use. Where available, information on the diagnostic performance of recommended assays is provided in Section 6.3.

OIE Reference Laboratories welcome feedback on diagnostic performance of recommended assays, in particular PCR methods. Of particular interest are any factors affecting expected assay sensitivity (e.g. tissue components inhibiting amplification) or expected specificity (e.g. failure to detect particular genotypes, detection of homologous sequences within the host genome). These issues should be communicated to the OIE Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

[...]

[Volver al orden del día](#)

© **Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), 2022**

El presente documento fue preparado por especialistas a solicitud de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Excepto en el caso de su adopción por la Asamblea Mundial de Delegados, lo expresado refleja únicamente las opiniones de dichos especialistas.

Todas las publicaciones de la OIE están protegidas por un Copyright internacional. Se pueden copiar, reproducir, traducir, adaptar o publicar extractos en publicaciones periódicas, documentos, libros o medios electrónicos y en cualquier otro medio destinado al público, con intención informativa, didáctica o comercial, siempre y cuando se obtenga previamente una autorización escrita por parte de la OIE.

Las designaciones y nombres utilizados y la presentación de los datos que figuran en esta publicación no constituyen de ningún modo el reflejo de cualquier opinión por parte de la OIE sobre el estatuto legal de los países, territorios, ciudades o zonas ni de sus autoridades, fronteras o límites territoriales.

La responsabilidad de las opiniones profesadas en los artículos firmados incumbe exclusivamente a sus autores. La mención de empresas particulares o de productos manufacturados, sean o no patentados, no implica de ningún modo que estos se beneficien del apoyo o de la recomendación de la OIE, en comparación con otros similares que no hayan sido mencionados.