

## CAPÍTULO 2.3.2.

# INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA NECROSIS HEMATOPOYÉTICA EPIZOÓTICO

---

### 1. Ámbito de aplicación

La infección por el virus de la necrosis hematopoyética epizoótica se considera la infección causada por el agente patógeno denominado *virus de la necrosis hematopoyética epizoótica* (VNHE), que pertenece al género *Ranavirus*, de la familia *Iridoviridae*.

### 2. Información sobre la enfermedad

#### 2.1. Factores del agente

##### 2.1.1. El agente etiológico

El VNHE es una especie del género *Ranavirus*, en la familia *Iridoviridae* (Chinchar *et al.*, 2005). Además de haberse aislado en peces, se han aislado ranavirus en ranas, salamandras y reptiles sanos o enfermos en América, Europa y Australia (Chinchar, 2002; Drury *et al.*, 2002; Fijan *et al.*, 1991; Hyatt *et al.*, 2002; Speare y Smith, 1992; Whittington *et al.*, 2010; Wolf *et al.*, 1968; Zupanovic *et al.*, 1998). Los ranavirus tienen viriones grandes (150–180 nm), icosaédricos, un genoma de ADN de doble cadena (150–170 kb) y se replican tanto en el núcleo como en el citoplasma con ensamblaje citoplasmático (Chinchar *et al.*, 2005).

Desde el reconocimiento de la enfermedad causada por el VNHE en Australia en 1986, se han notificado síndromes sistémicos necrotizantes por iridovirus similares en peces de piscifactoría. Entre ellos se incluyen el bagre (*Ictalurus melas*) en Francia (virus del bagre europeo, VBE) (Pozet *et al.*, 1992), el pez cabra (*Silurus glanis*) en Alemania (virus pez cabra europeo, VPCE) (Ahne *et al.*, 1989; 1990), el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) en Dinamarca (Bloch y Larsen, 1993), y el bacalao (*Gadus morhua*) en Dinamarca (iridovirus del bacalao, IVB) (Ariel *et al.*, 2010). El VNHE, el VEB, el VEPC y el IVB comparten >98% de identidad nucleotídica en secuencias concatenadas de las regiones de los genes RNR- $\alpha$ , DNAPol, RNR- $\beta$ , RNase II y MCP (Ariel *et al.*, 2010).

El VNHE y el VEB pueden diferenciarse mediante análisis genómicos (Ahne *et al.*, 1998; Holopainen *et al.*, 2009; Hyatt *et al.*, 2000; Mao *et al.*, 1996; 1997; Marsh *et al.*, 2002). Esto permite diferenciar epidemiológicamente los casos de enfermedad en peces de aleta que ocurren en Australia (VNHE) y Europa (VBE), y diferenciarlos de los casos de ranavirus en anfibios.

##### 2.1.2. Supervivencia y estabilidad en muestras procesadas y conservadas

El VNHE puede persistir en tejidos de peces congelados durante más de 2 años (Langdon, 1989) y en canales de peces congelados durante al menos un año (Whittington *et al.*, 1996).

##### 2.1.3. Supervivencia y estabilidad fuera del hospedador

El VNHE es resistente a la desecación y permaneció infectivo durante 97 días a 15°C y 300 días a 4°C en el agua (Langdon, 1989). Por estas razones, se presume que el VNHE persistiría durante meses o años en una piscifactoría en el agua y en los sedimentos, así como en las plantas y en el equipo.

Para información sobre los métodos de inactivación, véase la Sección 2.4.5.

## 2.2. Factores del hospedador

### 2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Las especies que cumplen los criterios para su inclusión en la lista de especies susceptibles a la infección por el VNHE según el Capítulo 1.5. del *Código Sanitario para los Animales Acuáticos* son las siguientes:

Familia	Nombre científico	Nombre común
Esocidae	<i>Esox lucius</i>	Lucio
Galaxiidae	<i>Galaxias olidus</i>	Montaña galaxias
Ictaluridae	<i>Ameiurus melas</i>	Pez gato
Melanotaeniidae	<i>Melanotaenia fluviatilis</i>	Pez arco iris de orejas rosas
Percidae	<i>Perca fluviatilis</i>	Perca europea
	<i>Sander lucioperca</i>	Lucioperca
Percichthyidae	<i>Macquaria australasica</i>	Perca Macquarie
Poeciliidae	<i>Gambusia holbrooki</i>	Gambusia
	<i>Gambusia affinis</i>	Pez mosquito
Salmonidae	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Trucha arco iris
Terapontidae	<i>Bidyanus bidyanus</i>	Perca plateada

### 2.2.2. Especies con pruebas insuficientes de susceptibilidad

Las especies en las que no se dispone de pruebas suficientes para cumplir los criterios de inclusión en la lista de especies susceptibles a la infección por el virus de la necrosis hematopoyética epizoótica de conformidad con el Capítulo 1.5 del *Código Acuático* son: ninguna conocida.

Además, se han notificado resultados positivos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específica del agente patógeno en los siguientes organismos, pero no se ha demostrado una infección activa: salmón atlántico (*Salmo salar*), siluro de agua dulce (*Tandanus tandanus*), perca dorada (*Macquaria ambigua*), bacalao de Murray (*Maccullochella peelii*) y gobio pintado de púrpura (*Mogurnda adspersa*).

### 2.2.3. Probabilidad de infección por especie, estadio de vida del hospedador, población o subpoblaciones

Las infecciones naturales y la enfermedad se han limitado a la perca europea (*Perca fluviatilis*) y a la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), esta última en Australia. La enfermedad es más grave en la perca europea y en los juveniles que en los peces adultos (Whittington *et al.*, 2010). No hay informes de infección de huevos o estadios tempranos de vida de ninguna especie de peces.

A los efectos de la Tabla 4.1, las larvas y los alevines de hasta aproximadamente 5 g de peso pueden considerarse estadios tempranos de vida, los alevines y los peces en crecimiento de hasta 500 g pueden considerarse juveniles, y los peces de más de 500 g pueden considerarse adultos.

### 2.2.4. Distribución del agente patógeno en el hospedador

Los órganos y tejidos diana infectados por el virus son el riñón, el bazo y el hígado. Se desconoce si el virus de la necrosis hematopoyética epizoótica puede detectarse en los tejidos gonadales, el líquido ovárico o el esperma, o si estos tejidos son adecuados para la vigilancia de los reproductores.

### 2.2.5. Animales acuáticos reservorios de la infección

Ninguno conocido.

### 2.2.6. Vectores

Ninguno demostrado.

## 2.3. Patrón de la enfermedad

### 2.3.1. Mortalidad, morbilidad y prevalencia

*Trucha arco iris*: Parece que, en condiciones naturales de explotación, el VNHE es poco infeccioso, pero una vez infectados, la mayoría de los peces sucumben a la enfermedad. La infección por el VNHE puede estar presente en una piscifactoría sin suscitar sospechas, ya que la tasa de mortalidad puede no superar la tasa de fondo habitual. La infección por el virus de la necrosis hematopoyética epizoótica se ha notificado con mayor frecuencia en alevines <125 mm de longitud de horquilla, con una mortalidad diaria inferior al 0,2% y una mortalidad total de hasta el 4%. Sin embargo, truchas arco iris de todas las edades pueden ser susceptibles, aunque todavía no se ha observado infección en reproductores (Whittington *et al.*, 1994; 1999). El impacto económico directo es escaso debido a la baja tasa de mortalidad. Pueden existir diferencias de susceptibilidad entre las poblaciones europeas y australianas de trucha arco iris (Ariel y Bang Jensen, 2009).

*Perca europea*: Existe una tasa muy alta de infección y mortalidad en los brotes naturales que, con el tiempo, conduce a la pérdida de poblaciones de peces silvestres (Langdon & Humphrey, 1987; Langdon *et al.*, 1986; Whittington *et al.*, 1996). La inoculación experimental en baño con una TCID<sub>50</sub> ml<sup>-1</sup> de 0,08 resultó letal, y dosis demasiado bajas para ser detectadas por aislamiento del virus en células BF-2 resultaron mortales por inoculación intraperitoneal (Whittington y Reddacliff, 1995). Percas europeas de distintas zonas geográficas con y sin antecedentes de VNHE han sido sometidas a pruebas en condiciones experimentales y han demostrado susceptibilidad a la NHE (Becker *et al.*, 2016). Pueden existir diferencias de susceptibilidad entre las poblaciones europeas y australianas de perca europea (Ariel y Bang Jensen, 2009).

### 2.3.2. Signos clínicos, incluidas alteraciones conductuales

Los peces moribundos pueden presentar pérdida de equilibrio, opérculos ensanchados y color oscuro (Reddacliff y Whittington, 1996). Los signos clínicos suelen ser más evidentes en alevines y juveniles que en adultos, tanto de trucha arco iris como de perca europea. Puede haber evidencias clínicas de malas prácticas de cría, como el hacinamiento y una calidad del agua subóptima, que se manifiestan con lesiones en la piel, aletas y branquias (Reddacliff y Whittington, 1996).

### 2.3.3. Lesiones macroscópicas

Los peces afectados pueden no presentar lesiones macroscópicas. Una pequeña proporción de peces puede presentar agrandamiento del riñón, el hígado o el bazo. Puede haber lesiones focales de color blanco a amarillo en el hígado, que corresponderán a zonas de necrosis (Reddacliff y Whittington, 1996).

### 2.3.4. Formas de transmisión y ciclo de vida

*Trucha arco iris*: El VNHE se ha propagado entre piscifactorías de trucha arco iris por transferencia de alevines infectados y probablemente agua de transporte (Langdon *et al.*, 1988; Whittington *et al.*, 1994; 1999). La baja prevalencia de la infección en la trucha arco iris significa que la infección activa puede pasar fácilmente desapercibida en una población y propagarse mediante el comercio de peces. No hay datos sobre la posible transmisión vertical del VNHE en los óvulos o dentro de ellos, y no se han evaluado los protocolos de desinfección de los óvulos. El VNHE aún no se ha aislado de tejidos ováricos ni de reproductores. La recurrencia anual en truchas arco iris de piscifactoría puede deberse a la reinfección de lotes sucesivos de peces o a la presencia de percas europeas salvajes en la misma cuenca.

*Perca europea*: La aparición de la infección por el VNHE en la perca europea en sistemas fluviales y embalses muy separados sugirió que el VNHE se propaga por translocación de peces vivos o cebo por parte de pescadores aficionados (Becker *et al.*, 2019; Whittington *et al.*, 2010).

Se desconoce la vía de infección. La perca europea y la trucha arco iris son susceptibles a la exposición por inmersión. El virus infecta una serie de tipos celulares, incluidos hepatocitos, células hematopoyéticas y células endoteliales de muchos órganos (Reddacliff y Whittington, 1996). Los tejidos infectados y los cadáveres se desprenden del virus en el agua a medida que se desintegran.

### 2.3.5. Factores ambientales

*Trucha arco iris*: Los brotes parecen estar relacionados con unas malas prácticas de manejo, en concreto el hacinamiento, insuficiente flujo de agua y la contaminación de tanques con alimento. Las lesiones cutáneas pueden facilitar una vía de entrada al VNHE. Se han observado brotes en piscifactorías a temperaturas del agua de entre 11 y 20°C (Whittington *et al.*, 1994; 1999). El periodo de incubación tras la inoculación por vía intraperitoneal fue de 3–10 días a 19–21°C en comparación con los 14–32 días a 8–10°C (Whittington y Reddacliff, 1995).

*Perca europea*: Las epizootias naturales de infección por el VNHE que afectan a juveniles y adultos de perca europea se producen sobre todo en verano (Langdon y Humphrey, 1987; Langdon *et al.*, 1986; Whittington *et al.*, 1994). Se ha supuesto que la enfermedad en los peces juveniles está relacionada con la aparición anual de un gran número de peces jóvenes no inmunes y su posterior exposición al virus mientras se alimentan en aguas poco profundas; los adultos no suelen estar implicados en estos brotes. Es posible que la temperatura ambiental sea el desencadenante de los brotes, ya que los juveniles se alimentan de fauna planctónica en aguas cálidas y poco profundas, mientras que los adultos se alimentan de invertebrados bentónicos y presas más grandes en aguas más profundas y frías (Whittington y Reddacliff, 1995). Experimentalmente, el periodo de incubación oscilaba entre 10 y 28 días a 12–18°C, frente a 10–11 días a 19–21°C, y las percas adultas eran refractarias a la infección a temperaturas inferiores a 12°C (Whittington y Reddacliff, 1995). Las poblaciones europeas de perca europea también mostraron una susceptibilidad dependiente de la temperatura (Ariel y Bang Jensen, 2009).

### 2.3.6. Distribución geográfica

Se han notificado casos de infección por el VNHE en piscifactorías de trucha arco iris de dos cuencas fluviales de Nueva Gales del Sur (Australia) (Whittington *et al.*, 2010). La infección por el VNHE es endémica en el sudeste de Australia, con una distribución discontinua y brotes esporádicos que afectan a un pequeño número de percas europeas (Becker *et al.*, 2019; Whittington *et al.*, 2010).

Puede consultarse la Plataforma WAHIS de la OMSA (<https://wahis.woah.org/#/home>) para conocer los datos más recientes acerca de la distribución a nivel países.

## 2.4. Estrategias de bioseguridad y de control de la enfermedad

Ninguna disponible.

### 2.4.1. Vacunación

Ninguna disponible.

### 2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas, incluidos agentes bloqueantes

Ninguno disponible.

### 2.4.3. Inmunoestimulación

No se ha utilizado.

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

No se ha llevado a cabo ningún programa formal de selección genética a favor de las cepas resistentes de las especies susceptibles. No obstante, en estudios experimentales llevados a cabo con una exposición mediante baño se observó que las percas de las masas acuáticas de Nueva Gales del Sur, Australia, con infecciones previas por el VNHE, presentaban una menor mortalidad que las percas de masas acuáticas australianas, cercanas o lejanas, que no tuvieran antecedentes de infección por el VNHE (Becker *et al.*, 2016).

### 2.4.5. Métodos de inactivación

El VNHE es sensible al etanol al 70%, a 200 mg litro<sup>-1</sup> de hipoclorito de sodio o al calentamiento a 60°C durante 15 minutos (Langdon, 1989). Los datos relativos a la inactivación del ranavirus de los anfibios también pueden ser pertinentes: 150 mg/litro de clorhexidina y 200 mg/litro de peroximonosulfato de

potasio fueron eficaces tras 1 minuto de tiempo de contacto (Bryan *et al.*, 2009). Si se seca primero, el VNHE en sobrenadante de cultivo celular es resistente al calentamiento a 60°C durante 15 minutos (Whittington *et al.*, 2010).

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

No se ha utilizado.

#### **2.4.7. Prácticas generales de manejo**

El control de la enfermedad en la trucha arco iris a nivel de la piscifactoría se basa en reducir el impacto de la infección manteniendo bajos porcentajes de repoblación y una suficiente calidad del agua. Los estudios realizados en una piscifactoría de trucha arco iris indicaron que los estanques con densidades de población altas y flujos de agua bajos, y por lo tanto menor calidad del agua, podían dar lugar a niveles más altos de enfermedad clínica que los estanques de la misma piscifactoría con densidades de población menores y flujos de agua mayores (Whittington *et al.*, 1994). El mecanismo de protección podría consistir en el mantenimiento de la salud del integumento (Whittington *et al.*, 1994).

### **3. Elección, obtención, transporte y manejo de las muestras**

Esta sección se basa en la información de las secciones 2.2, 2.3 y 2.4 sobre la identificación de las poblaciones, los individuos y las muestras que tienen más probabilidades de estar infectados.

#### **3.1. Elección de poblaciones y muestras individuales**

Las inspecciones clínicas deberán llevarse a cabo durante un período en el que la temperatura del agua sea propicia para el desarrollo de los signos clínicos (véase la sección 2.3.5). Todas las unidades de producción (estanques, tanques, etc.) deberán inspeccionarse para detectar la posible presencia de peces muertos, débiles o con comportamiento anormal. A los efectos de la vigilancia de la enfermedad, los peces de los que se tomarán muestras se elegirán del siguiente modo:

- i) Se muestrearán preferiblemente las especies más susceptibles, es decir, la perca europea cuando esté disponible; de lo contrario, se muestrearán proporcionalmente la trucha arco iris o las demás especies susceptibles enumeradas en el punto 2.2.1.
- ii) Se emplearán criterios basados en el riesgo para muestrear preferiblemente unidades epidemiológicas con un historial de mortalidad anormal, episodios de posible exposición o cuando haya pruebas de mala calidad del agua o de la cría. Si se utiliza más de un origen de agua para la producción piscícola, deberán incluirse en la muestra peces de todos ellos.
- iii) Si hay peces débiles, de comportamiento anormal o recién muertos, se elegirán dichos peces. Si no los hay, se elegirán peces aparentemente sanos recogidos de modo que todas las partes de la piscifactoría o la masa de agua afectada, así como todas las clases anuales, estén proporcionalmente representadas en la muestra.

Para las investigaciones de brotes de enfermedades, deberán recogerse peces moribundos o que presenten signos clínicos de infección por el VNHE. Lo ideal es recoger peces vivos, pero para realizar pruebas de diagnóstico también pueden elegirse peces muertos recientemente. Cabe señalar, sin embargo, que habrá un riesgo significativo de contaminación por bacterias ambientales si los animales llevan un tiempo muertos.

#### **3.2. Elección de órganos o tejidos**

Se combinan muestras de hígado, riñón anterior y bazo de varios peces (Jaramillo *et al.*, 2012).

#### **3.3. Muestras o tejidos no adecuados para la detección del agente patógeno**

Los tejidos no adecuados son las gónadas, los líquidos gonadales, el esperma y las huevas, puesto que no hay evidencias de infección del tracto reproductivo.

#### **3.4. Muestreo no letal**

No es aplicable.

### 3.5. Conservación de muestras para el envío

Para obtener información sobre los métodos de conservación de las muestras destinadas a las pruebas previstas, consúltese el Capítulo 2.3.0.

#### 3.5.1. Muestras para el aislamiento del agente patógeno

Para recomendaciones sobre el transporte de muestras para el aislamiento de virus al laboratorio, véase la Sección B.2.4 del Capítulo 2.3.0 *Información general (enfermedades de los peces)*.

#### 3.5.2. Conservación de muestras para la detección molecular

Para recomendaciones sobre la obtención, conservación y procesado de las muestras para técnicas moleculares, consúltese la Sección B.2.5 del Capítulo 2.3.0 *Información general (enfermedades de los peces)*.

#### 3.5.3. Muestras para histopatología, inmunohistoquímica o hibridación *in-situ*

Para recomendaciones sobre la obtención, conservación y procesado de las muestras para técnicas histológicas, consúltese la Sección 2.2 del Capítulo 2.3.0 *Información general (enfermedades de los peces)*.

#### 3.5.4. Muestras para otras pruebas

No recomendadas como pruebas de diagnóstico habituales.

### 3.6. Combinación de varias muestras

La combinación de muestras de más de un animal para una finalidad definida sólo deberá recomendarse cuando se hayan evaluado datos de respaldo sólidos sobre la sensibilidad y la especificidad del diagnóstico y se hayan considerado adecuados. Si no se ha evaluado a fondo el efecto de la combinación sobre la sensibilidad diagnóstica, deberán procesarse y analizarse individualmente los peces de mayor tamaño. Pueden combinarse estadios de vida pequeños, como los alevines, o ejemplares de peces pequeños, para obtener la cantidad mínima de material necesaria para las pruebas.

## 4. Métodos de diagnóstico

Los métodos actualmente existentes para la detección de agentes patógenos que pueden utilizarse en i) la vigilancia de animales aparentemente sanos, ii) el diagnóstico preliminar de animales con signos clínicos y iii) con fines de diagnóstico confirmativo se enumeran en la Tabla 4.1. por estadio de vida del animal.

**Calificaciones para cada finalidad de uso.** Para cada ensayo recomendado se proporciona una calificación cualitativa para cada finalidad de uso. Las calificaciones se determinan en función de múltiples factores de rendimiento y operacionales pertinentes para la aplicación de un ensayo para una finalidad definida. Estos factores son: si las características de rendimiento diagnóstico son apropiadas, el nivel de validación del ensayo, la disponibilidad, el coste, la lo que se tarda en obtener los resultados y el rendimiento y operatividad de la muestra. Para una finalidad de uso definida, los ensayos se clasifican como:

Clave:

+++ =	Métodos más adecuados, con características deseables de rendimiento y operatividad.
++ =	Métodos adecuados, con un rendimiento y unas características operativas aceptables en la mayoría de las circunstancias.
+ =	Métodos adecuados, pero con un rendimiento o unas características operativas que pueden limitar la aplicación en algunas circunstancias.
Casillas sombreadas =	Métodos no adecuados para esta finalidad.

**Etapa de validación.** La etapa de validación corresponde al proceso de desarrollo y validación de ensayos del Capítulo 1.1.2. La etapa de validación es específica para cada finalidad de uso. Cuando se dispone de ella, en la Sección 6.3 se ofrece información sobre el rendimiento diagnóstico de los ensayos recomendados.

Los Laboratorios de Referencia de la OMSA agradecen todo posible comentario sobre el rendimiento diagnóstico de los ensayos recomendados, en particular las PCR. Son de especial interés los factores que afectan a la sensibilidad esperada (por ejemplo, componentes tisulares que inhiben la amplificación) o a la especificidad esperada (por ejemplo, no detección de genotipos particulares o detección de secuencias homólogas dentro del genoma huésped) de un ensayo. Estas cuestiones deberán comunicarse a los Laboratorios de Referencia de la OMSA para que se pueda asesorar a los laboratorios de diagnóstico y modificar las normas en caso necesario.

Table 4.1. Métodos de diagnóstico recomendados por la OMSA y su nivel de validación para la vigilancia de animales aparentemente sanos y para el estudio de animales con signos clínicos

Método	A. Vigilancia de animales aparentemente sanos				B. Diagnóstico preliminar de animales con signos clínicos				C. Diagnóstico confirmativo <sup>1</sup> de un resultado sospechoso en la vigilancia o de un diagnóstico preliminar			
	Estadio de vida tempranos <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adultos	NV	Estadio de vida tempranos <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adultos	NV	Estadio de vida tempranos <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adultos	NV
Preparaciones húmedas												
Histopatología					++	++	++	1				
Citopatología												
Cultivo celular	+	+	++	1	++	++	+++	1	+	+	++	1
Inmunohistoquímica					+	+	+	1				
PCR en tiempo real	+++	+++	+++	1	+++	+++	+++	2	++	++	++	1
PCR convencional	+	+	+	1	++	++	++	1				
PCR convencional seguida de secuenciación del amplicón									+++	+++	+++	1
Hibridación <i>in-situ</i>												
Bioensayo												
LAMP												
Ac-ELISA			+	1								
Ag-ELISA	+	+	+	1	+	+	+	1				
Otros métodos de detección de antígeno												
Otros métodos												

LV = nivel de validación, hace referencia a la fase de validación del Proceso de la OMSA (capítulo 1.1.2); PCR = reacción en cadena de la polimerasa;

LAMP = amplificación isotérmica mediada por bucle; Ag-ELISA o Ac-ELISA = enzoinmunoanálisis de detección de antígeno o de detección de anticuerpo, respectivamente.

<sup>1</sup>En el caso de los diagnósticos confirmativos, deben combinarse varios métodos (véase la Sección 6). <sup>2</sup>La susceptibilidad de estadios de vida tempranos y juveniles se describe en la Sección 2.2.3.

El sombreado indica que la prueba es inadecuada o que no debe utilizarse para esta finalidad.

#### 4.1. Preparaciones húmedas

No es aplicable.

#### 4.2. Histopatología y citopatología

*Microscopía óptica:* se pueden utilizar métodos rutinarios para la fijación del tejido, como en formol neutro tamponado al 10%, la incrustación en parafina, la preparación de cortes de 4–10  $\mu\text{m}$  y la tinción con H/E para demostrar la necrosis tisular y los cuerpos de inclusión basófilos intracitoplasmáticos. Estos cuerpos de inclusión son indicativos, pero no confirmativos de infección por el VNHE. Los cortes fijados en formol e incrustados en parafina también pueden teñirse con un método de inmunoperoxidasa (véase más adelante) para identificar el antígeno del VNHE asociado a las lesiones necróticas.

En cortes de material fijado con formol de rutina teñidos con hematoxilina y eosina (H/E) se observa con frecuencia necrosis coagulativa o licuefactiva aguda focal, multifocal o localmente extensa del hígado, así como riñón e hígado hematopoyéticos. Puede observarse un pequeño número de cuerpos de inclusión basófilos intracitoplasmáticos, especialmente en las zonas que rodean inmediatamente a las zonas necróticas del hígado y el riñón. También pueden observarse lesiones necróticas en corazón, páncreas, tracto gastrointestinal, branquias y pseudobranquias (Reddacliff y Whittington, 1996).

Los tejidos afectados (por ejemplo, riñón, hígado y bazo) contienen células que presentan necrosis. Las células contienen inclusiones citoplasmáticas conspicuas, que son zonas enrarecidas del citoplasma en las que se ensambla el virus. Los núcleos de las células infectadas se sitúan frecuentemente en la periferia y presentan una forma distorsionada

#### 4.3. Cultivo celular para el aislamiento

##### 4.3.1. Preparación de tejidos de peces para el aislamiento del virus

Se ha validado un método sencillo de preparación de tejidos de peces para cultivo celular y ELISA (Whittington y Steiner, 1993) (véase el muestreo de la sección 3).

- i) Congelar los tubos que contienen tejidos a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta que se necesiten.
- ii) Añadir 0,5 ml de medio de homogeneización (medio mínimo esencial de Eagle, con sales de Earle con glutamina) [MEM] con 200 unidades internacionales [UI]  $\text{ml}^{-1}$  de penicilina, 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de estreptomomicina y 4  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de anfotericina B) a cada tubo. Triturar el tejido con un mortero estéril hasta obtener una masa fina.
- iii) Añadir otros 0,5 ml de medio de homogeneización a cada tubo y mezclar con un mortero.
- iv) Añadir tres perlas de vidrio estériles a cada tubo (3 mm de diámetro) y cerrar la tapa del tubo.
- v) Agitar enérgicamente la suspensión durante 20–30 segundos y dejarla a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas.
- vi) Volver a agitar la suspensión como se ha indicado anteriormente y centrifugar durante 10 minutos a 2 500  $g$  en una microcentrífuga de sobremesa.
- vii) Transferir el sobrenadante, ahora denominado homogeneizado tisular clarificado, a un nuevo tubo estéril. Los homogenados pueden congelarse a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta que se necesiten para el aislamiento del virus y ELISA.

##### 4.3.2. Líneas celulares para el aislamiento del virus

El VNHE se replica bien en muchas líneas celulares de peces, como BF-2 (alevín de mojarra de agallas azules; ATCC CCL 91), FHM (pececillo de cabeza plana; ATCC CCL 42), EPC (*epithelioma papulosum cyprini* [Cinkova *et al.*, 2010]), y CHSE-214 (línea celular de embrión de salmón Chinook; ATCC CRL 1681) a temperaturas que oscilan entre 15 y  $22^{\circ}\text{C}$  (Crane *et al.*, 2005). Las temperaturas de incubación de  $20^{\circ}\text{C}$  o  $24^{\circ}\text{C}$  dan como resultado títulos más altos que los  $15^{\circ}\text{C}$ ; y se recomienda incubar BF-2, EPC o CHSE 214 a  $22^{\circ}\text{C}$  para maximizar los títulos, lo que podría ser importante para la detección de cantidades bajas del virus en tejidos de peces (Ariel *et al.*, 2009). El Laboratorio de Referencia de la OMSA prefiere las células BF-2 con una temperatura de incubación de  $22^{\circ}\text{C}$ . A continuación, se indica el procedimiento para las células BF-2. El procedimiento para las células CHSE-214 se indica más adelante, en el apartado de tinción con inmunoperoxidasa (Sección 4.7).

#### 4.3.3. Procedimiento técnico para el cultivo celular

*Muestras:* homogenados tisulares.

Las células se cultivan (en matraces, tubos o placas de múltiples pocillos) con medio de crecimiento (MEM + 10% de suero fetal bovino [FBS] con 100 UI ml<sup>-1</sup> de penicilina, 100 µg ml<sup>-1</sup> de estreptomicina y 2 µg ml<sup>-1</sup> de anfotericina B). Las células se incuban a 22°C hasta que estén casi confluentes, lo que puede llevar hasta 4 días dependiendo de la tasa de siembra. El medio se cambia a un medio de mantenimiento (MEM con un 2% de FBS y 100 UI ml<sup>-1</sup> de penicilina, 100 µg ml<sup>-1</sup> de estreptomicina y 2 µg ml<sup>-1</sup> de anfotericina B) el día de la inoculación. Se realiza una dilución de homogenados individuales o combinados a 1/10 utilizando medio de homogeneización. Cada cultivo se inocula con 100 µl de muestra por ml de medio de cultivo. Esto representa una dilución final de 1/100 de un homogenado tisular de 0,1 mg ml<sup>-1</sup>. Se hace otra dilución a 1/10 que representa una dilución final de 1/1000, y se inoculan dos cultivos. No se realiza ninguna etapa de adsorción. Como alternativa, pueden inocularse directamente dos o tres cultivos con 10 µl de homogenado sin diluir por ml de medio de cultivo. Obsérvese que el uso de un gran inóculo sin diluir suele ir acompañado de una tasa alta de toxicidad o contaminación celular. Los cultivos se incuban a 22°C en una incubadora durante 6 días. Los cultivos se leen en los días 3 y 6. Los cultivos se pasan al menos una vez para detectar muestras con niveles bajos de virus. El día 6, los cultivos primarios (P1) se congelan durante la noche a -20°C, se descongelan, se mezclan suavemente y, a continuación, el sobrenadante del cultivo se inocula en células frescas como antes (P2), es decir, 100 µl de sobrenadante P1 por ml de medio de cultivo. Los sobrenadantes P1 restantes se transfieren a tubos estériles de 5 ml y se ponen a 4°C para su análisis mediante ELISA, PCR u otro medio para confirmar que la causa del efecto citopático (ECP) es el VNHE. P2 se incuba como se ha indicado anteriormente, y se realiza un tercer pase si es necesario.

#### 4.3.4. Interpretación de los resultados

El ECP está bien desarrollado y consiste en una lisis focal rodeada de células granulares redondeadas. Esta alteración se extiende rápidamente hasta afectar a toda la monocapa, que se desprende y desintegra. Los cultivos celulares pueden analizarse para detectar posible ADN del VNHE mediante PCR en tiempo real y PCR convencional con análisis de la secuencia, tal como se describe en la Sección 4.4. El antígeno puede detectarse mediante inmunocitoquímica en cultivos celulares con anticuerpos policlonales; el protocolo puede consultarse al laboratorio de referencia.

La identidad de los virus en cultivo celular se determina mediante PCR y secuenciación de amplicones.

Se debe realizar un seguimiento de las líneas celulares para garantizar que la susceptibilidad a los agentes patógenos diana no ha cambiado.

### 4.4. Amplificación de ácido nucleico

Aunque se han descrito varios métodos de PCR convencional o PCR cuantitativa en tiempo real para la detección de ranavirus (Jaramillo *et al.*, 2012; Pallister *et al.*, 2007; Stilwell *et al.*, 2018), el VNHE solo puede detectarse cuando estos métodos se combinan con métodos que detectan específicamente el VNHE.

Las muestras pueden analizarse mediante PCR en tiempo real, pero como los ensayos descritos no son específicos del VNHE, en toda muestra que dé positivo mediante PCR en tiempo real, debe realizarse la identificación del VNHE mediante PCR convencional y secuenciación de amplicones. Para las pruebas por PCR convencional, se utilizan dos ensayos de PCR con cebadores MCP y se requiere la secuenciación de amplicones para diferenciar el VNHE del virus del bagre europeo (VBE), el virus de la rana 3 (VR3) y el virus de Bohle (VB) (Marsh *et al.*, 2002).

Las PCR deberán realizarse siempre con los controles especificados en la Sección 2.5 *Uso de técnicas moleculares para pruebas de vigilancia, pruebas de confirmación y diagnóstico* del Capítulo 2.3.0 *Información general (enfermedades de los peces)*. Cada muestra para diagnóstico deberá analizarse por duplicado, es decir, analizando dos alícuotas.

### Extracción de ácidos nucleicos

Para la extracción de ácidos nucleicos Se pueden utilizar diferentes kits y procedimientos. La calidad y la concentración del ácido nucleico extraído son importantes y pueden comprobarse utilizando un método adecuado según las circunstancias

#### 4.4.1. PCR en tiempo real

El protocolo de cribado respecto a ranavirus en tiempo real utilizado en el Laboratorio de Referencia de la OMSA se basa en Pallister *et al.*, 2007. Se pueden utilizar otras PCR en tiempo real de acuerdo con protocolos publicados para la detección de la secuencia del gen de la proteína de la cápside mayor del VNHE y otros ranavirus. El ensayo descrito por Jaramillo *et al.* (2012) utiliza la química de detección SYBR Green, y el ensayo descrito por Stilwell *et al.* (2018) detecta múltiples especies de ranavirus utilizando la química de detección de sonda de hidrólisis.

Agente patógeno/ gen diana	Cebador/sonda (5'→3')	Concentración	Parámetros de ciclado
Método 1 (Pallister <i>et al.</i> , 2007); N.º de acceso a GenBank: DQ457105			
Ranavirus/MCP	Dir: RANA CON: CTC-ATC-GTT-CTG-GCC-ATC-A Inv: RANA CON: TCC-CAT-CGA-GCC-GTT-CA Sonda: RANA CON Pr FAM-CAC-AAC-ATT-ATC-CGC-ATC-MGB	900 nM para cada cebador, 250 nM para la sonda	45 ciclos de 95°C/15 seg; 60°C/60 seg
Método 2 (Jaramillo <i>et al.</i> , 2012); N.º de acceso a GenBank.:			
Ranavirus/MCP	C1096 GAC-TGA-CCA-ACG-CCA-GCC-TTA-ACG C1097 GCG-GTG-GTG-TAC-CCA-GAG-TTG-TCG	12,5 pM para cada cebador	40 ciclos de 95°C/30 seg; 58°C/30 seg
Método 3 (Stilwell <i>et al.</i> , 2018); N.º de acceso a GenBank.:			
Ranavirus/MCP	Dir: RanaF1: CCA-GCC-TGG-TGT-ACG-AAA-ACA Inv: RanaR1 ACT-GGG-ATG-GAG-GTG-GCA-TA Sonda: RanaP1 FAM-TGG-GAG-TCG-AGT-ACT-AC-MGB	900 nM para cada cebador, 250 nM para la sonda	40 ciclos de 95°C/30 seg; 60°C/45 seg

#### 4.4.2. PCR convencional

El producto amplificado obtenido de la PCR con cebador MCP-1 y digerido con PflM I permite diferenciar el VNHE y el VB del VR3 y el VBE. El producto amplificado obtenido de la PCR con cebador MCP-2 y digerido con Hinc II, Acc I y Fnu4H I (individualmente) permite diferenciar el VNHE y el VB entre sí y de VR3 y VBE. Tanto el cebador MCP-1 como el MCP-2 se dirigen a una región del gen de la proteína de la cápside (Marsh *et al.*, 2002).

Agente patógeno/ gen diana	Cebador/sonda (5'→3')	Concentración	Parámetros de ciclado
Método 1 (Marsh <i>et al.</i> , 2002): el tamaño del amplicón de MCP-1 es 321 pb y el tamaño del amplicón de MCP-2 de 625 pb			
MCP-1 Ubicación del gen: 266-586	M151: AAC-CCG-GCT-TTC-GGG-CAG-CA M152: CGG-GGC-GGG-GTT-GAT-GAG-AT	250 ng de cada cebador	35 ciclos de 94°C/30 seg, 50°C/30 seg, 72°C/1 min NOTA: la temperatura de hibridación podría aumentarse a 60 o 62°C para reducir la amplificación inespecífica cuando el ensayo se utiliza para analizar tejidos de peces.
MCP-2 Ubicación del gen: 842-1466	M153: ATG-ACC-GTC-GCC-CTC-ATC-AC MI54: CCA-TCG-AGC-CGT-TCA-TGA-TG		

#### 4.4.3. Otros métodos de amplificación de ácido nucleico

No es aplicable.

#### 4.5. Secuenciación del amplicón

The size of the PCR amplicon should be verified, for example by agarose gel electrophoresis. Both DNA strands of the PCR product must be sequenced and analysed in comparison with reference sequences.

#### 4.6. *In-situ* hybridisation

Not applicable

#### 4.7. Immunohistochemistry

##### 4.7.1. Inmunohistoquímica (tinción con inmunoperoxidasa)

*Muestras:* cortes de tejido fijados en formol e incrustados en parafina.

*Procedimiento técnico*

El siguiente protocolo está destinado a la demostración cualitativa de antígenos del VNHE en cortes de tejido fijados en formol e incrustados en parafina (Reddacliff y Whittington, 1996). Se asume que los antígenos pueden haberse entrecruzado y, por lo tanto, incluye un paso de digestión con proteasa que puede omitirse si se examinan muestras sin fijar. Para la tinción, se utiliza un kit comercial (DAKO® LSAB K0679) con estreptavidina marcada con peroxidasa y una mezcla de anticuerpos anti-inmunoglobulinas de conejo/ratón/cabra biotinilado como anticuerpos de enlace. También se utilizan otros reactivos comerciales. Para mayor comodidad, también los suministra DAKO<sup>1</sup>. El anticuerpo primario anti-VNHE purificado por afinidad (lote n.º M708) es suministrado liofilizado por el Laboratorio de Referencia de la OMSA.

- i) Realizar cortes de 5 µm y montarlos en portaobjetos SuperFrost® Plus G/Edge (Menzel-Glaser, HD Scientific N.º Cat, HD 041300 72P3). Marcar alrededor del corte con un lápiz de diamante para limitar la dispersión de los reactivos.
- ii) Desparafinar los cortes:  
Precalentar los portaobjetos en una incubadora a 60°C durante 30 minutos.  
Poner los portaobjetos en un baño de xileno e incubar durante 5 minutos. Repetir una vez. Obsérvese que pueden utilizarse sustitutos del xileno sin efectos nocivos.  
Eliminar el exceso de líquido y poner los portaobjetos en etanol absoluto durante 3 minutos. Repetir la operación una vez.  
Eliminar el exceso de líquido y poner los portaobjetos en etanol al 95% durante 3 minutos. Repetir una vez.  
Eliminar el exceso de líquido y poner los portaobjetos en agua destilada o desionizada durante 30 segundos.
- iii) Exponer los antígenos mediante un tratamiento con proteasa. Inundar el portaobjetos con proteinasa K (5-7 µg ml<sup>-1</sup>) e incubar durante 20 minutos (solución lista para usar, DakoCytomation Cat. N.º S3020). Enjuagar el portaobjetos sumergiéndolo tres veces en agua. Poner en un baño de PBST durante 5 minutos (PBS pH 7,2, 0,05% [v/v] Tween 20). Eliminar el exceso de solución de lavado y limpiar cuidadosamente alrededor del corte.
- iv) Ejecutar la reacción de inmunotinción utilizando el Kit Universal DAKO LSAB®+, Peroxidasa (DakoCytomation N.º Cat. K0679). Garantizando que el corte de tejido está completamente cubierto, añadir los siguientes reactivos al portaobjetos. Evitar que se seque.

---

1 Dako Cytomation California Inc., 6392 via Real, Carpinteria, CA 93013, EE.UU., 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; Visite <http://www.dakosytomahon.com> para conocer los enlaces a otros países.

- v) Peróxido de hidrógeno al 3%: cubrir el corte e incubar durante 5 minutos. Aclarar suavemente con PBST y poner en un nuevo baño de lavado.
- vi) Anticuerpo primario (anticuerpo anti-VNHE purificado por afinidad 1:/1500 Lote N.º M708) y reactivo de control negativo (suero no inmune a una dilución de 1/1500) en un segundo portaobjetos. Cubrir el corte e incubar durante 15 minutos. Enjuagar los portaobjetos.
- vii) Anticuerpo de enlace secundario marcado con biotina: cubrir el corte e incubar durante 15 minutos. Aclarar los portaobjetos.
- viii) Estreptavidina peroxidasa: cubrir el corte e incubar durante 15 minutos. Aclarar los portaobjetos.
- ix) Solución sustrato-cromógeno: cubrir el corte e incubar durante 5 minutos. Enjuagar suavemente los portaobjetos con agua destilada.
- x) Tinción de contraste poniendo los portaobjetos en un baño de hematoxilina de DAKO® Mayer durante 1 minuto (modificación de Lillie, N.º Cat. S3309). Aclarar suavemente con agua destilada. Sumergir 10 veces en un baño de agua. Poner en agua destilada o desionizada durante 2 minutos.
- xi) Montar y cubrir las muestras con un medio de montaje acuoso (DAKO® Faramount Aqueous Mounting Medium N.º Cat. S3025).

#### *Interpretación de los resultados*

El antígeno del VNHE se tiñe de marrón en las zonas que rodean las áreas degeneradas y necróticas de las partes parenquimatosas. No debe haber tinción cuando se utiliza suero control negativo en el mismo corte.

Disponibilidad de la prueba y de los reactivos: los reactivos de anticuerpos y los protocolos de la prueba pueden solicitarse al Laboratorio de Referencia de la OMSA.

#### **4.8. Bioensayo**

No es aplicable.

#### **4.9. Métodos de detección de anticuerpo o de detección de antígeno**

Se ha descrito un ELISA para la detección de antígeno del VNHE y un ELISA para la detección de anticuerpos contra el VNHE (Whittington y Steiner, 1993). Se han descrito ELISA indirectos para la detección de anticuerpos inducidos tras la exposición al VNHE en la trucha arco iris y la perca europea (Whittington *et al.*, 1994; 1999; Whittington y Reddacliff, 1995). Los mismos anticuerpos son adecuados para la inmunohistoquímica en tejidos fijados y para la detección de antígeno de ranavirus en cultivo celular. Los reactivos y protocolos se pueden solicitar al laboratorio de referencia. Cabe señalar que los anticuerpos policlonales utilizados en todos los métodos relacionados (inmunoperoxidasa, ELISA de captura de antígeno e inmunomicroscopía electrónica) reaccionan de forma cruzada con todos los ranavirus conocidos, excepto los ranavirus de Santee Cooper (Ahne *et al.*, 1998; Cinkova *et al.*, 2010; Hedrick *et al.*, 1992; Hyatt *et al.*, 2000).

#### **4.10. Otros métodos**

Se desconoce la sensibilidad y especificidad de estos ensayos respecto a las de una prueba estándar, y la interpretación de los resultados es difícil. Los protocolos y reactivos específicos anti-inmunoglobulina necesarios para realizar estas pruebas se pueden solicitar al laboratorio de referencia

### **5. Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia destinada a demostrar ausencia de la enfermedad en poblaciones aparentemente sanas**

La PCR en tiempo real es el método más apropiado para cribar poblaciones de peces sanos en busca del VNHE; sin embargo, los métodos disponibles no son específicos del VNHE. Toda muestra positiva a la PCR en tiempo real debe analizarse mediante PCR convencional y análisis de secuencias para distinguir el VNHE de otros ranavirus.

## 6. Criterios de diagnóstico confirmativo

Esta sección sólo aborda los resultados de las pruebas de diagnóstico para la detección de la infección en ausencia (Sección 6.1.) o en presencia de signos clínicos (Sección 6.2.), pero no evalúa si el agente infeccioso es la causa del episodio clínico.

Las definiciones de caso sospechoso y confirmado se han fijado para respaldar la toma de decisiones relacionadas con el comercio y la confirmación del estatus sanitario a nivel de país, zona o compartimento. Las definiciones de caso para la confirmación de la enfermedad en zonas afectadas endémicamente pueden ser menos estrictas. Si una Autoridad Competente no está en condiciones de realizar las pruebas de diagnóstico necesarias, deberá pedir asesoramiento al Laboratorio de Referencia de la OMSA apropiado y, si es necesario, remitir muestras a dicho laboratorio para que realice pruebas de confirmación de muestras del caso índice en un país, una zona o un compartimento que se considere libre de la enfermedad.

### 6.1. Animales aparentemente sanos o animales que no se sabe si están infectados<sup>2</sup>

Las poblaciones aparentemente sanas pueden caer bajo sospecha, y por lo tanto ser objeto de muestreo, si existe un vínculo epidemiológico con una población infectada. La proximidad hidrográfica a una población infectada o el desplazamiento de animales o productos de origen animal o equipos, etc., desde una población que se sabe que está infectada equivalen a un vínculo epidemiológico. Como alternativa, se toman muestras de poblaciones sanas para demostrar la ausencia de enfermedad.

#### 6.1.1. Definición de caso sospechoso en animales aparentemente sanos

Se sospechará la presencia de infección por el VNHE si se cumple al menos uno de los criterios siguientes:

- i) ECP característico del VNHE en cultivo celular
- ii) Resultado positivo en la PCR en tiempo real o convencional
- iii) Resultado positivo en el ELISA de detección de antígeno del VNHE

#### 6.1.2. Definición de caso confirmado en animales aparentemente sanos

Se considera confirmada la presencia de infección por el VNHE si se cumple al menos uno de los criterios siguientes:

- i) ECP característico del VNHE en cultivo celular seguido de identificación del VNHE por PCR convencional y análisis de la secuencia del amplicón
- ii) Un resultado positivo en muestras de tejido mediante PCR en tiempo real e identificación del VNHE mediante PCR convencional seguida del análisis de la secuencia del amplicón

### 6.2 Animales con signos clínicos

Los signos clínicos no son patognomónicos de una única enfermedad; sin embargo, pueden reducir el abanico de posibles diagnósticos.

#### 6.2.1. Definición de caso sospechoso en animales con signos clínicos

Se sospechará la presencia de infección por el VNHE si se cumple al menos uno de los criterios siguientes:

- i) Histopatología compatible con el VNHE
- ii) ECP característico del VNHE en cultivos celulares
- iii) Resultado positivo de la PCR en tiempo real o convencional

<sup>2</sup> Por ejemplo, instalaciones transfronterizas.

### 6.2.2. Definición de caso confirmado en animales con signos clínicos

La presencia de infección por el VNHE se considerará confirmada si, además de los criterios del punto 6.2.1, se cumple al menos uno de los criterios siguientes:

- i) ECP característico del VNHE en cultivo celular seguido de identificación del VNHE por PCR convencional y análisis de la secuencia del amplicón
- ii) un resultado positivo en muestras de tejido mediante PCR en tiempo real e identificación del VNHE mediante PCR convencional seguida del análisis de la secuencia del amplicón

### 6.3. Sensibilidad y especificidad diagnóstica de las pruebas de diagnóstico

El rendimiento diagnóstico de las pruebas recomendadas para la vigilancia o el diagnóstico de la infección por el VNHE figura en los cuadros de los apartados 6.3.1 y 6.3.2. (actualmente no se dispone de datos). Esta información puede utilizarse para diseñar estudios de detección de la infección por el VNHE; sin embargo, debe tenerse en cuenta que el rendimiento diagnóstico depende de las circunstancias de cada estudio de la precisión diagnóstica (incluida la finalidad de la prueba, la población de origen, los tipos de muestras de tejidos y las especies hospedadoras) y que el rendimiento diagnóstico puede variar según las condiciones. Solo se presentan datos cuando las pruebas han sido validadas al menos en el nivel 2 del proceso de validación descrito en el Capítulo 1.1.2. y se dispone de información en los estudios de precisión diagnóstica publicados.

#### 6.3.1. Para el diagnóstico preliminar de animales con signos clínicos

Tipo de prueba	Finalidad de la prueba	Poblaciones de origen	Tipos de tejidos o muestras	Especies	DSe (n)	DSp (n)	Prueba de referencia	Cita bibliográfica
PCR en tiempo real	Diagnóstico	Peces con signos clínicos (múltiples especies) de brotes de la enfermedad y de infecciones experimentales	Combinación de riñón, hígado y bazo de un mismo pez	Perca europea ( <i>Perca fluviatilis</i> ), pez negro de río ( <i>Gadopsis marmoratus</i> ), perca dorada ( <i>Macquaria ambigua</i> ), bacalao trucha ( <i>Maccullochella macquariensis</i> ), siluro de agua dulce ( <i>Tandanus tandanus</i> ), perca Macquarie ( <i>Macquaria australasica</i> ), trucha arco iris ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	94.3%* (n = 105)	100% (n = 441)	Aislamiento del virus en cultivo celular BF-2	Jaramillo et al., (2012)
Real-time PCR	Diagnóstico	Peces con signos clínicos (múltiples especies) de brotes de la enfermedad y de infecciones experimentales	Combinación de riñón, hígado y bazo de un mismo pez	Perca europea ( <i>Perca fluviatilis</i> ), pez negro de río ( <i>Gadopsis marmoratus</i> ), perca dorada ( <i>Macquaria ambigua</i> ), bacalao trucha ( <i>Maccullochella macquariensis</i> ), siluro de agua dulce ( <i>Tandanus tandanus</i> ), perca Macquarie ( <i>Macquaria australasica</i> ), trucha arco iris ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	95%* (n = 106)	100% (n = 80)	Aislamiento del virus en cultivo celular BF-2	Stilwell et al., 2018

DSe: = sensibilidad diagnóstica, DSp = especificidad diagnóstica, n = número de muestras utilizadas en el estudio; PCR: = reacción en cadena de la polimerasa. Nota: estas pruebas detectan múltiples ranavirus además del VNHE que infectan hospedadores anfibios. \*Un resultado positivo se debe caracterizar empleando secuenciación para confirmar que indica la presencia del VNHE.

**6.3.2. Para la vigilancia de animales aparentemente sanos: no disponible**

Tipo de prueba	Finalidad de la prueba	Poblaciones de origen	Tipos de tejidos o muestras	Especies	DSe (n)	DSp (n)	Prueba de referencia	Cita bibliográfica

DSe = sensibilidad diagnóstica, DSp = especificidad diagnóstica, qPCR = reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

**7. Bibliografía**

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*) wuth 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., GILLIGAN D., ASMUS M., TWEEDIE A. & WHITTINGTON R.J. (2019). Geographic distribution of Epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) in freshwater fish in south eastern Australia: lost opportunity for a notifiable pathogen to expand its geographic range. *Viruses*, **11**, 315 doi:10.3390/v11040315

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., 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 haematopoeitic 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 Hematopoeitic 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 haematopoeitic 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 (EHNV) 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 (EHNV) 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 (EHNV) 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 (EHNV): 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:** Existe un Laboratorio de Referencia de la OMSA para la infección por el virus de la necrosis hematopoyética epizoótica (VNHE) (por favor, consúltese la página web de la OMSA: <https://www.woah.org/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>).

Para más información sobre la infección por el VNHE, contacte con el Laboratorio de Referencia de la OMSA. El Laboratorio de Referencia de la OMSA puede suministrar ADN purificado del VNHE, antígeno del VNHE inactivado y anticuerpos policlonales contra el VNHE, junto con métodos técnicos. Se cobra un tanto por los reactivos para cubrir los costes de funcionamiento del laboratorio.

**NB:** ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1995 COMO NECROSIS HEMATOPOYÉTICA EPIZOÓTICA;  
ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2023.