

# INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA SEPTICEMIA HEMORRÁGICA VÍRICA

---

## 1. Ámbito de aplicación

La infección por el virus de la septicemia hemorrágica vírica (VSHV) es la infección por el agente patógeno causante de la septicemia hemorrágica vírica, que pertenece al género *Novirhabdovirus* y a la familia *Rhabdoviridae*.

## 2. Información sobre la enfermedad

### 2.1. Factores del agente

#### 2.1.1. El agente etiológico

El VSHV es una partícula con forma de bala, de aproximadamente 70 nm de diámetro y 180 nm de longitud, que contiene un genoma de ARN monocatenario levógiro de aproximadamente 11 000 nucleótidos, y que posee una envoltura que contiene la glicoproteína de membrana, que es el antígeno neutralizante de superficie. El genoma codifica seis proteínas: una nucleoproteína N; una fosfoproteína P (antes designada M1); una proteína de matriz M (antes designada M2); una glicoproteína G; una proteína no viriónica NV y una polimerasa L (Walker *et al.*, 2000).

Las secuencias de nucleótidos del gen G se han utilizado para clasificar las cepas del VSHV en cuatro genotipos principales (I, II, III y IV) y nueve subtipos (Ia-Ie y IVa-IVd) con distribuciones geográficas casi distintas (Einer-Jensen *et al.*, 2004; Elsayed *et al.*, 2006). La gama de hospedadores y la patogenicidad parecen estar vinculadas, al menos en cierta medida, al genotipo del VSHV

#### i) Genotipo Ia

Casi todas las cepas del VSHV que causan brotes en las explotaciones europeas de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) se agrupan en el sublinaje Ia, del que se han notificado cepas en la mayoría de los países de Europa continental (Einer-Jensen *et al.*, 2004; Kahns *et al.*, 2012; Snow *et al.*, 2004; Toplak *et al.*, 2010). Sin embargo, también se han detectado cepas del genotipo Ia en otras especies de peces de aleta en Europa, como la trucha marrón (*Salmo trutta*), el lucio (*Esox lucius*) y el timalo (*Thymallus thymallus*) (de Kinkelin & Le Berre, 1977; Jonstrup *et al.*, 2009). Las cepas del genotipo Ia han causado generalmente brotes en truchas arcoiris criadas en agua dulce, pero también se han obtenido cepas en truchas arcoiris criadas en el mar y en rodaballos (*Scophthalmus maximus*) (Schlotfeldt *et al.*, 1991; Snow *et al.*, 2004). El genotipo Ia puede subdividirse en dos subpoblaciones principales, Ia-1 y Ia-2, cada cual con una distribución geográfica distinta dentro de Europa (Kahns *et al.*, 2012).

#### ii) Genotipo Ib

Las cepas incluidas en este genotipo se han obtenido de peces de aleta en el medio marino en el Mar Báltico, Kattegat, Skagerrak, el Mar del Norte y el Canal de la Mancha (Einer-Jensen *et al.*, 2004; Skall *et al.*, 2005b; Snow *et al.*, 2004) y tan al norte como la latitud 70°N cerca de Nordkapp, en Noruega (Sandlund *et al.*, 2014). Se observó un único caso en Japón (Nishizawa *et al.*, 2002). Ninguna de las cepas de peces silvestres se ha asociado a brotes clínicos de la enfermedad (Johansen *et al.*, 2013). El genotipo Ib se ha asociado a pruebas de transferencia entre peces silvestres y truchas arcoiris de criadero en solo dos casos en truchas arcoiris criadas en piscifactorías de Suecia en 1998 y 2000 (Nordblom, 1998; Nordblom & Norell, 2000; Skall *et al.*, 2005a).

#### iii) Genotipo Ic

Este genotipo consiste en un grupo más pequeño de cepas danesas procedentes de truchas arcoiris cultivadas en agua dulce. También se han detectado cepas de este genotipo en Alemania y Austria (Jonstrup *et al.*, 2009).

iv) Genotipo Id

Las cepas de este genotipo consisten en algunas cepas antiguas aisladas en Escandinavia de la década de 1960 y de brotes de infección por el VSHV en truchas arcoiris criadas en el mar en 2000. Estos brotes se produjeron en dos zonas diferentes y todas las cepas muestreadas se agruparon en el grupo del genotipo Id. En los ensayos de infección, se demostró que las cepas eran patógenas para la trucha arcoiris, pero menos virulentas que la mayoría de las cepas la (Raja-Halli *et al.*, 2006).

v) Genotipo Ie

Las cepas incluidas en este genotipo se han obtenido de entornos tanto de agua dulce como marinos (el Mar Negro) en Georgia y Turquía. Las cepas procedían de rodaballo de piscifactoría y salvaje (Jonstrup *et al.*, 2009; Kalayci *et al.*, 2006; Nishizawa *et al.*, 2006) y de trucha arco iris (Einer-Jensen *et al.*, 2004). El VSHV le también se ha aislado de pescadilla (*Merlangius merlangus*) y de lubina (*Dicentrarchus labrax*) en el Mar Negro (Altuntas y Ogut, 2010).

vi) Genotipo II

Las cepas incluidas en este genotipo se han detectado principalmente en peces de aleta silvestres, en particular el arenque del Atlántico (*Clupea harengus*), del Mar Báltico, incluyendo el Golfo de Botnia y el Golfo de Finlandia, (Gadd *et al.*, 2011; Snow *et al.*, 2004). También se han detectado cepas del genotipo II en lampreas (*Lampetra fluviatilis*) capturadas en agua dulce de los ríos Kalajoki y Lestijoki, que tienen salida en el Golfo de Botnia (Gadd *et al.*, 2010).

vii) Genotipo III

Las cepas incluidas en este genotipo proceden de peces de aleta salvajes y de piscifactoría del Mar Atlántico Norte, desde el Cabo de Flandes (López-Vázquez *et al.*, 2006b) hasta la costa noruega (Dale *et al.*, 2009), y del Mar del Norte alrededor de las Islas Británicas, Skagerrak y Kattegat. Los brotes de infección por el VSHV en rodaballo criado en el mar en el Reino Unido e Irlanda en la década de 1990 se atribuyeron a la infección por cepas del genotipo III, y en 2007 un brote en truchas arcoiris criadas en el mar en la costa occidental de Noruega se debió al genotipo III del VSHV. Los brotes de infección por el VSHV en cinco especies de peces limpiadores de la zona de las Islas Shetland también se debieron a este genotipo (Munro *et al.*, 2015)

viii) Genotipo IVa

Las cepas incluidas en este genotipo se han detectado en peces de aleta de los entornos costeros de Norteamérica, desde California hasta Alaska en el oeste y alrededor del noreste de Estados Unidos hasta Terranova, Canadá. Este genotipo también se ha notificado en los países asiáticos de Corea del Sur y Japón. Las cepas del genotipo IVa de Norteamérica han causado graves epidemias en numerosas especies marinas silvestres, como el arenque del Pacífico (*Clupea pallasii pallasii*) (Meyers & Winton, 1995), que puede servir como reservorio del virus para el salmón del Atlántico (*Salmo salar*), criado en el mar de forma simpátrica (Garver *et al.*, 2013). En Asia, las cepas del genotipo IVa han causado brotes de la enfermedad en el fletán bastardo (*Paralichthys olivaceus*) (Ogut & Altuntas, 2014).

ix) Genotipo IVb

Las cepas incluidas en este genotipo se han detectado en peces de aleta en agua dulce de la región de los Grandes Lagos de América del Norte (Gagne *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2011; Winton *et al.* 2008) y han causado la muerte de numerosas especies de peces (Faisal & Winters, 2011).

x) Genotipo IVc

Las cepas incluidas en este genotipo se han detectado en peces de aleta de las aguas de estuario de Nuevo Brunswick y Nueva Escocia, Canadá (Gagne *et al.*, 2007; Pierce & Stepien, 2012; Stepien *et al.*, 2015).

xi) Genotipo IVd

Las cepas incluidas en este genotipo se han detectado en Islandia, donde se han identificado en peces lumpen salvajes y cultivados en el mar (*Cyclopterus lumpus*) (Gudmundsdottir *et al.*, 2019).

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

La supervivencia del VSHV en el tejido del hospedador depende de las condiciones de conservación. El VSHV puede seguir siendo infeccioso durante largos periodos de tiempo mientras se conserva

congelado en el tejido de los peces. Sin embargo, los peces infectados por el VSHV sometidos al proceso de congelación comercial (temperatura del bloque central de -24°C) presentaron una reducción del 90% del título del virus después de la descongelación del tejido (Arkush *et al* 2006). El VSHV es sensible a la degradación enzimática, a los entornos con alta carga bacteriana y a las altas temperaturas (por encima de 28°C). El tejido muscular fresco (no congelado) de truchas arcoiris infectadas por el VSHV podría transmitir el VSHV a peces ingenuos (Oidtmann *et al.*, 2011a). El VSHV tolera altas concentraciones de sal, como las de los peces tratados con salmuera (Skall *et al.*, 2015) o mientras se conservan en una solución concentrada de sulfato de amonio (Pham *et al* 2018). Para una retención óptima del VSHV en el tejido de los peces, la muestra debe colocarse en un medio de transporte con antibióticos y mantenerse sobre hielo sin congelar y procesarse en las 24 horas siguientes al muestreo.

### 2.1.3. Supervivencia y estabilidad fuera del hospedador

La supervivencia del VSHV fuera del hospedador depende de las condiciones físico-químicas del medio acuoso (Ahne, 1982) y de la temperatura: el virus sobrevive durante más tiempo a 4°C que a 20°C (Parry & Dixon, 1997).

El VSHV es significativamente más estable en agua dulce que en agua de mar. Se ha documentado que el virus persiste en agua dulce durante 28-35 días a 4°C (Parry & Dixon, 1997) y se ha comprobado que es infeccioso durante 1 año a 4°C en agua dulce filtrada (Hawley & Garver, 2008). En agua dulce cruda a 15°C, el tiempo de inactivación del 99,9% fue de 13 días, pero en agua de mar el virus se inactivó en 4 días (Hawley & Garver, 2008). En otro estudio en el que se utilizó agua de mar a 15°C, la infectividad del virus se redujo en un 50% después de 10 horas, pero aún podía recuperarse después de 40 horas (Kocan *et al.*, 2001). No parece haber una correlación constante entre el origen y la estabilidad de las cepas del virus: las cepas de agua dulce no son siempre las más estables en agua dulce y las de agua de mar no son siempre más estables en agua de mar (Hawley & Garver, 2008).

El virus permanece estable durante más tiempo si se añaden al agua materiales orgánicos estériles, como fluidos ováricos o productos sanguíneos, como el suero bovino (Kocan *et al.*, 2001). Cuando el agua de mar se esterilizó en autoclave, o cuando se hizo pasar por una membrana de 0,22 µm, la supervivencia del virus se prolongó significativamente (60 días a 15°C y 32 días a 20°C), lo que sugiere que la carga bacteriana en el agua es un factor importante para la descomposición del virus.

## 2.2. Factores del hospedador

### 2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Las especies que cumplen los criterios para figurar en la lista de susceptibles a la infección por el VSHV de acuerdo con el Capítulo 1.5. del *Código Sanitario para los Animales Acuáticos (Código Acuático)* son las siguientes:

Familia	Nombre científico	Nombre común	Genotipo
Ammodytidae	<i>Ammodytes hexapterus</i>	Lanzón del Pacífico	IVa
Aralichthyidae	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Fletán bastardo	IVa
Carangidae	<i>Trachurus mediterraneus</i>	Jurel del Mediterráneo	Ie
Centrarchidae	<i>Ambloplites rupestris</i>	Lubina de roca	IVb
	<i>Lepomis gibbosus</i>	Calabaza	IVb
	<i>Lepomis macrochirus</i>	Mojarra oreja azul	IV, IVb
	<i>Micropterus dolomieu</i>	Lobina de boca pequeña	IVb
	<i>Micropterus salmoides</i>	Perca atruchada	IVb
	<i>Pomoxis nigromaculatus</i>	Mojarra negra	IVb
Clupeidae	<i>Alosa immaculata</i>	Sábalo pónico	Ie
	<i>Sardina pilchardus</i>	Sardina	ND
	<i>Clupea harengus</i>	Arenque del Atlántico	Ib, III
	<i>Clupea pallasii pallasii</i>	Arenque del Pacífico	IVa
	<i>Dorosoma cepedianum</i>	Sábalo americano	IVb
	<i>Sardinops sagax</i>	Sardina sudamericana	IVa
	<i>Sprattus sprattus</i>	Espadín europeo	Ib
Cyclopteridae	<i>Cyclopterus lumpus</i>	Pez globo	IVd

Familia	Nombre científico	Nombre común	Genotipo
Cyprinidae	<i>Danio rerio</i>	Pez cebra	IVa
	<i>Notropis hudsonius</i>	Pez limón	IVb
	<i>Notropis atherinoides</i>	Pez esmeralda	IVb
	<i>Pimephales notatus</i>	Peccecillo de nariz roma	IVb
	<i>Pimephales promelas</i>	Peces de cabeza hueca	IVb
Embiotocidae	<i>Cymatogaster aggregata</i>	Mojarra brillante	IVa
Engraulidae	<i>Engraulis encrasicolus</i>	Boquerón europeo	Ie
Esocidae	<i>Esox lucius</i>	Lucio del Norte	Ia, IVb
	<i>Esox masquinongy</i>	Muskellunge	IVb
Fundulidae	<i>Fundulus heteroclitus</i>	Muflón	IVc
Gadidae	<i>Gadus macrocephalus</i>	Bacalao del Pacífico	IVa
	<i>Gadus morhua</i>	Bacalao del Atlántico	Ib, III
	<i>Merlangius merlangus</i>	Merlán	Ie
	<i>Micromesistius poutassou</i>	Bacaladilla	Ib, III
	<i>Trisopterus esmarkii</i>	Faneca noruega	Ib, III
Gasterosteidae	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	Espadín de tres puntas	IVc
Gobiidae	<i>Neogobius melanostomus</i>	Gobio redondo	IVb
	<i>Pomatoschistus minutus</i>	Gobio de arena	Ib
Ictaluridae	<i>Ameiurus nebulosus</i>	Bagre cabeza de toro	IVb
Labridae	<i>Centrolabrus exoletus</i>	Centrolabro	III
	<i>Ctenolabrus rupestris</i>	Tabernero	III
	<i>Labrus bergylta</i>	Pez bola	III
	<i>Labrus mixtus</i>	Pez cuco	III
	<i>Symphodus melops</i>	Pez corcho	III
Lotidae	<i>Gaidropsarus vulgaris</i>	Pez de roca de tres barbas	Ie
Moronidae	<i>Morone americana</i>	Perca blanca	IVb
	<i>Morone chrysops</i>	Lubina blanca	IVb
	<i>Morone saxatilis</i>	Lubina rayada	IVb, IVc
Mullidae	<i>Mullus barbatus</i>	Salmonete	Ie
Osmeridae	<i>Thaleichthys pacificus</i>	Eulachon	IVa
Percidae	<i>Sander vitreus</i>	Ojo de perdiz	IVb
	<i>Perca flavescens</i>	Perca amarilla	IVb
Petromyzontidae	<i>Lampetra fluviatilis</i>	Lamprea de río	II
Pleuronectidae	<i>Limanda limanda</i>	Limanda común	Ib
	<i>Platichthys flesus</i>	Platija europea	Ib
	<i>Pleuronectes platessus</i>	Platija	III
Rajidae	<i>Raja clavata</i>	Raya de espinazo	Ie
Salmonidae	<i>Coregonus artedii</i>	Cisco de lago	IVb
	<i>Coregonus clupeaformis</i>	Pez blanco del lago	IVb
	<i>Coregonus lavaretus</i>	Pez blanco común	Ia
	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Salmón coho	IVa
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Trucha arcoiris	Ia-e, III, IVb
	<i>Oncorhynchus mykiss X Oncorhynchus kisutch hybrids</i>	Híbrido de trucha arco iris y salmón coho	Ia
	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Salmón chinook	IVa, IVb
	<i>Salmo marmoratus</i>	Trucha marroquí	Ia

Familia	Nombre científico	Nombre común	Genotipo
	<i>Salmo salar</i>	Salmón del Atlántico	Ia, Ib, II, III, IVa
	<i>Salmo trutta</i>	Trucha marrón	Ia, Ib
	<i>Salvelinus namaycush</i>	Trucha de lago	Ia, IVa, IVb
	<i>Thymallus thymallus</i>	Tímalo	Ia
Scophthalmidae	<i>Scophthalmus maxima</i>	Rodaballo	Ib, III
Sciaenidae	<i>Aplodinotus grunniens</i>	Corvinón de agua dulce	IVb
Scombridae	<i>Scomber japonicus</i>	Caballa del Pacífico	IVa
Soleidae	<i>Solea senegalensis</i>	Lenguado senegalés	III
Uranoscopidae	<i>Uranoscopus scaber</i>	Caracol del Atlántico	Ie

ND: Indeterminado.

### 2.2.2. Especies con datos ambiguos sobre su susceptibilidad

Las especies de las que no existen pruebas suficientes para cumplir los criterios de inclusión en la lista de especies susceptibles a la infección por el VSHV de acuerdo con el Capítulo 1.5 del Código Acuático son las siguientes:

Familia	Nombre científico	Nombre común	Genotipo
Adrianichthyidae	<i>Oryzias latipes</i>	Medaka común	IVb
	<i>Oryzias dancena</i>	Medaka marino	IVa
Ammodytidae	<i>Ammodytes personatus</i>	Anguila	Ib
Anguillidae	<i>Anguilla anguilla</i>	Anguila europea	III
Argentinidae	<i>Argentina sphyraena</i>	Pequeña anguila argentina	Ib
Belonidae	<i>Belone belone</i>	Pez espada	Ie
Carangidae	<i>Seriola dumerili</i>	Pez espada mayor	IVa
Catostomidae	<i>Catostomus commersonii</i>	Pez espada blanco	IVb
	<i>Moxostoma anisurum</i>	Gallineta de plata	IVb
	<i>Moxostoma macrolepidotum</i>	Cabra roja de cabeza corta	IVb
Centrarchidae	<i>Pomoxi annularis</i>	Perca plateada	IVb
Clupeidae	<i>Alosa pseudoharengus</i>	Alewife	IVb
Cottidae	<i>Cottus pollux</i>	Escorpión fluvial japonés	IVb
Cyprinidae	<i>Semotilus corporalis</i>	Pez gato	IVb
	<i>Notemigonus crysoleucas</i>	Lentejuela dorada	IVb
Esocidae	<i>Esox lucius</i> X <i>E. masquinongy</i> hybrids	Híbrido de <i>E. masquinongy</i> X lucio)	IVb
Fundulidae	<i>Fundulus diaphanus</i>	<i>Fundulus diaphanus</i>	IVb
Gadidae	<i>Gadiculus argenteus</i>	Pez aguja con banda	Ib
	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	Faneca plateada	III
	<i>Theragra chalcogramma</i>	Eglefino	IVa
	<i>Trisopterus minutus</i>	Abadejo de Alaska	III
Ictaluridae	<i>Ictalurus punctatus</i>	Bacalao pobre	IVb
Liparidae	<i>Liparis tessellatus</i>	Bagre de canal	IV
Lotidae	<i>Lota lota</i>	Pez caracol cubero	IVb
	<i>Enchelyopus cimbrius</i>	Rodaballo	Ib
Merlucciidae	<i>Merluccius productus</i>	Lobo de mar	IVa
Moronidae	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Merluza del Pacífico Norte	Ia
Mugilidae	<i>Mugil cephalus</i>	Lubina europea	IV
Ophidiidae	<i>Hoplobrotula armata</i>	Salmonete de roca	IV

Familia	Nombre científico	Nombre común	Genotipo
Osmeridae	<i>Hypomesus pretiosus</i>	Brosmio acorazado	ND
Oxudercidae	<i>Rhinogobius</i> sp. (especies no descritas)	Eperlano de superficie	IVb
Percopsidae	<i>Percopsis omiscomaycus</i>	Yoshinobori	IVb
Petromyzontinae	<i>Petromyzon marinus</i>	Trucha perca	IVb
Pleuronectidae	<i>Glyptocephalus stelleri</i>	Lamprea de mar	IVa
	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Platija negra	III
	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	Fletán del Atlántico	III
Salmonidae	<i>Oncorhynchus mykiss</i> X <i>Salvelinus alpinus</i> hybrids	Híbrido de trucha arco iris X trucha alpina	Ia
	<i>Oncorhynchus mykiss</i> X <i>Salvelinus namaycush</i> hybrids	Híbrido de trucha arco iris X salvelino	Ia
	<i>Oncorhynchus mykiss</i> X <i>Salmo trutta</i> hybrids	Híbrido de trucha arcoiris x trucha marina	Ia
	<i>Salvelinus alpinus</i>	Trucha alpina	Ia
	<i>Salvelinus fontinalis</i>	Trucha de arroyo	Ie
Sciaenidae	<i>Larimichthys polyactis</i>	Verrugato de Manchuria	IV
Scorpaenidae	<i>Scorpaena porcus</i>	Trucha ártica	Ie
	<i>Scorpaena izensis</i>	Trucha de arroyo	IV
Scyliorhinidae	<i>Scyliorhinus torazame</i>	Corvina amarilla	IV
Stromateidae	<i>Pampus argenteus</i>	Cabracho negro	IV
Trichiuridae	<i>Trichiurus lepturus</i>	Cabracho de Izu	IV
Triglidae	<i>Eutrigla gurnardus</i>	Pez gato claudia	III

**ND:** Indeterminado.

Además, se han notificado resultados positivos de la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) específica del agente patógeno en los siguientes organismos, pero no se ha demostrado una infección activa: Bacalao negro (*Anoplopoma fimbria*)

### 2.2.3. Probabilidad de infección por especie, etapa de vida del hospedador, poblaciones y subpoblaciones

La trucha arcoiris es la especie más susceptible a la infección por el VSHV, genotipo Ia. En el caso de los genotipos Ib, II y III del VSHV, es probable que los hospedadores naturales sean especies silvestres de bajura, como el arenque del Atlántico y el espadín europeo, mientras que en el caso del genotipo IVa, el hospedador natural es el arenque del Pacífico. El genotipo III del VSHV ha causado la enfermedad en el rodaballo y peces limpiadores, y el genotipo IVa en el salmón del Atlántico, el rodaballo y el fletán.

La infección por el VSHV puede causar enfermedad y mortalidad en todas las etapas de la vida de los peces susceptibles. El VSHV no infecta a los huevos de los peces (Munro & Gregory, 2010).

En los estudios de peces marinos salvajes, el VSHV se ha aislado en la mayoría de las clases anuales. Sin embargo, se han analizado pocos alevines, ya que normalmente no se capturan durante los estudios. La mayor prevalencia del virus en las poblaciones silvestres muestreadas se encontró en peces de bajura, como el arenque del Atlántico, el espadín europeo y la faneca noruega (Skall *et al.*, 2005a).

A los efectos de la Tabla 4.1, los alevines y pintos de trucha arcoiris (por ejemplo, hasta aproximadamente 1 g de peso) pueden considerarse etapas tempranas de la vida, los peces de engorde y los peces en crecimiento de hasta 50 g pueden considerarse juveniles y los peces de más de 50 g, adultos.

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

En los peces que muestran signos clínicos, el virus es abundante en todos los tejidos, incluidas las branquias, la piel y los músculos (Sandlund *et al.*, 2014). Los órganos diana son el riñón anterior, el corazón y el bazo, ya que son los lugares en los que el virus es más abundante. En las fases crónicas, los títulos del virus pueden llegar a ser elevados en el cerebro (Smail y Snow, 2011; Wolf, 1988).

#### 2.2.5. Animales acuáticos reservorios de la infección

Algunos supervivientes de epizootias se convertirán en portadores del virus a largo plazo. Los arenques del Pacífico que han sobrevivido a la infección por el genotipo IVa del VSHV han transmitido la enfermedad a cohabitantes nunca antes expuestos (Gross *et al.*, 2019). Casi todas las cepas del genotipo Ib, II y III del VSHV halladas en especies de peces salvajes proceden de individuos sin signos clínicos de infección por el VSHV y con títulos bajos del virus (Skall *et al.*, 2005a).

#### 2.2.6. Vectores

El VSHV se ha detectado en numerosas especies de animales que no son especies susceptibles y que, por lo tanto, pueden actuar como vectores. Sin embargo, no se ha demostrado la transmisión del VSHV por vectores. El VSHV se ha aislado en la tortuga mordedora (*Chelra serpentina*), la sanguijuela (*Myzobdella lugubris*), la tortuga mapa del norte (*Graptemys geographica*) y la pulga de agua (*Moina macrocopa*), y estas especies pueden ser vectores para la transmisión del VSHV (Faisal & Schultz, 2009; Goodwin & Merry, 2011; Ito & Olesen, 2017). El VSHV también se ha aislado de los anfípodos *Hyalella* spp. y *Diporeia* spp., lo que sugiere que los macroinvertebrados bentónicos pueden ser vectores del VSHV IVb en los sistemas afectados de manera endémica. En cambio, el VSHV no se detectó en mejillones ni en sedimentos en el mismo entorno acuático (Faisal & Winters 2011; Throckmorton *et al.*, 2017). El VSHV también se ha aislado de la sanguijuela, *Myzobdella lugubris*, en los Grandes Lagos (Faisal & Schulz, 2009; Faisal & Winters, 2011).

Las aves piscívoras pueden actuar como vectores del VSHV portando el virus, por ejemplo, en sus picos y patas (Olesen & Jorgensen, 1982), o a través de la regurgitación de peces infectados (Peters & Neukirch, 1986).

### 2.3. Patrón de la enfermedad

#### 2.3.1. Mortalidad, morbilidad y prevalencia

La mortalidad varía dependiendo de muchas condiciones ambientales y fisiológicas, la mayoría de las cuales no han sido totalmente determinadas. La enfermedad es, en general, una enfermedad de aguas frescas o frías, con una mortalidad máxima a temperaturas de entre 9 y 12 °C. Los alevines de trucha arcoiris pequeños (0,3-3 g) son los más susceptibles al genotipo Ia, con mortalidades cercanas al 100%, pero todos los tamaños de trucha arcoiris pueden verse afectados, con mortalidades que van del 5 al 90% (Skall *et al.*, 2004). Los ensayos de infección por inmersión también indujeron una mortalidad de hasta el 100% en el arenque del Pacífico cuando fue expuesto al genotipo IVa (Hershberger *et al.*, 2010a). La mortalidad en los peces de aleta silvestres también varía desde la ausencia de muertes observables hasta una mortalidad alta. La prevalencia de los genotipos Ib, II y III del VSHV varía del 0 al 16,7% en las aguas del norte de Europa (Skall *et al.*, 2005b).

#### 2.3.2. Signos clínicos, incluidos cambios conductuales

La aparición de los siguientes signos clínicos es característica de la infección por el VSHV: aparición rápida de mortalidad, letargo, oscurecimiento de la piel, exoftalmia, anemia (branquias pálidas), hemorragias en la base de las aletas o en las branquias, los ojos o la piel, natación anormal, como destellos y espirales, y abdomen distendido debido a la presencia de edema en la cavidad peritoneal. En la trucha arcoiris, el aspecto clínico suele ser el de peces oscuros y letárgicos con exoftalmia en las orillas del estanque y en la salida. Es característico que los peces enfermos no intenten escapar cuando se les tiende una red.

La infección por algunos genotipos del VSHV da lugar a signos clínicos predominantes en algunas especies susceptibles. Se han descrito con frecuencia lesiones cutáneas en bacalao y arenques de los océanos Pacífico y Atlántico (incluido el Mar del Norte), y en eglefinos del Mar del Norte (Jensen & Larsen, 1979; Meyers *et al.*, 1992; Meyers & Winton, 1995; Smail, 2000; Vestergard Jorgensen & Olesen, 1987). En el fletán bastardo de piscifactoría también se ha descrito una forma "anémica" (branquias pálidas) de infección por el VSHV (Isshiki *et al.*, 2001).

### 2.3.3 Signos anatomopatológicos macroscópicos

Los signos anatomopatológicos macroscópicos consisten en hemorragias petequiales generalizadas en la piel, el tejido muscular (especialmente los músculos dorsales) y los órganos internos. Es importante examinar la musculatura dorsal para detectar la presencia de posibles hemorragias petequiales, que es un signo muy habitual de infección por el VSHV. El riñón se torna rojo oscuro en la fase aguda y puede presentar una necrosis grave en los peces moribundos. El bazo está moderadamente hinchado. El hígado suele estar pálido y moteado. El tracto gastrointestinal, especialmente el intestino posterior, se torna pálido y carece de alimento.

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

La transmisión se produce principalmente de forma horizontal a través del agua, con la excreción del virus en la orina, y directamente por la piel (Smail y Snow, 2011). También se ha demostrado la transmisión oral, lo que indica que la depredación de peces y vectores infectados puede conducir a la transmisión la enfermedad (Schonherz *et al.* 2012).

Experimentalmente, se ha comprobado que alimentar con tejido muscular fresco (sin congelar) a truchas arcoiris infectadas puede transmitir el VSHV a peces ingenuos (Oidtmann *et al.*, 2011a).

No hay indicios ni pruebas de una verdadera transmisión vertical del VSHV (Bovo *et al.*, 2005a; Munro & Gregory, 2010).

### 2.3.5. Factores medioambientales

La enfermedad suele aparecer a temperaturas entre 4°C y 14°C. A temperaturas del agua entre 15°C y 18°C, la enfermedad suele tener un curso corto con bajos niveles de mortalidad.

Las temperaturas bajas del agua (1–5°C) suelen dar lugar a un curso prolongado de la enfermedad, con una baja mortalidad diaria pero una alta mortalidad acumulada. Los brotes de infección por el VSHV se producen en todas las estaciones, pero son más frecuentes en primavera, cuando la temperatura del agua aumenta o fluctúa.

Las observaciones en condiciones de campo y los estudios experimentales sugieren que a temperaturas más cálidas del agua se reduce o inhibe en gran medida la transmisión. A temperaturas del agua superiores a los 18°C no se observan brotes naturales de infección por el VSHV. En los estudios de desafío, los peces expuestos al VSHV y criados a temperaturas inferiores a 15°C presentaron una elevada mortalidad, mientras que los infectados y criados a 20°C no lo hicieron (Arkush *et al.*, 2006; Castric & de Kinkelin, 1984). Puede consultarse más información en Wolf (1988) y en Smail & Snow (2011).

### 2.3.6. Distribución geográfica

Se han notificado casos de infección por el VSHV en países de Europa, América del Norte y Asia del Norte. Algunos países de estas regiones se han declarado libres de la infección por el VSHV. La enfermedad nunca se ha notificado en el hemisferio sur.

Para obtener información reciente sobre la distribución a nivel de país, consulte la interfaz de WAHIS (<https://wahis.oie.int/#/home>).

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

### 2.4.1. Vacunación

Aunque la investigación sobre el desarrollo de vacunas contra el VSHV lleva más de cuatro décadas, todavía no se dispone de una vacuna comercial. Las vacunas candidatas han incluido vacunas muertas, vacunas vivas atenuadas, una vacuna recombinante en sistemas de expresión procarióticos y eucarióticos, y vacunas basadas en el ADN. Para una revisión, véase Lorenzen & LaPatra (2005). En la actualidad, ninguna vacuna afecta a la sensibilidad y especificidad de las pruebas de diagnóstico de la infección por el VSHV.

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

Actualmente no se dispone de ningún tratamiento.



### 2.4.3. Inmunoestimulación

Se han evaluado varios inmunoestimulantes, como los betaglucanos derivados de la levadura, los péptidos derivados de la IL-1 $\beta$  y los probióticos, para mejorar la protección contra la infección por el VSHV (Peddie *et al.*, 2003). Varios investigadores informan de efectos positivos, pero no se dispone de ningún inmunoestimulante dirigido específicamente a mejorar la resistencia a la infección por el VSHV. Además, se desconoce si su uso puede afectar a la sensibilidad y especificidad de las pruebas de diagnóstico del VSHV.

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

Se ha demostrado una variación genética aditiva en la trucha arcoiris para la resistencia a la infección por el VSHV (Dorson *et al.*, 1995; Henryon *et al.*, 2002a; 2002b). En un estudio de Henryon *et al.* (2005), la heredabilidad de la resistencia al VSHV fue de 0,11 respecto al tiempo hasta la muerte en una escala de tiempo logarítmica. La identificación de un loci de rasgo cuantitativo (QTL) importante para la resistencia al VSHV en la trucha arcoiris puede allanar el camino para la selección genética de peces resistentes al VSHV (Verrier *et al.*, 2013); sin embargo, actualmente no se comercializan cepas de trucha arcoiris resistentes.

### 2.4.5. Métodos de inactivación

El VSHV es sensible a varios desinfectantes comunes (por ejemplo, luz ultravioleta, cloro, yodóforos, hipoclorito de sodio), a temperaturas superiores a 30°C, a la degradación bacteriana en los sedimentos y a la actividad enzimática en los peces en descomposición. Se puede consultar una revisión en Bovo *et al.*, 2005b.

### 2.4.6. Desinfección de huevos y larvas

La desinfección de los huevos recién fecundados o con ojos es una medida preventiva eficaz y rentable para detener la propagación de la enfermedad en los salmónidos (puede consultarse el protocolo recomendado en el capítulo 4.4. del *Código Acuático*).

### 2.4.7. Prácticas generales de manejo

La mala calidad del agua, una alta densidad de peces, una alta tasa de alimentación y la infección por otras enfermedades, como la enfermedad renal proliferativa, la ictiofuria, la enfermedad renal bacteriana, etc. pueden influir en el curso y la gravedad de la infección por el VSHV. En general, el aumento de la temperatura, la restricción de la alimentación, la reducción de la densidad de peces y la restricción de la manipulación pueden reducir la mortalidad. En las piscifactorías infectadas endémicamente, cuando la temperatura del agua está cerca de los niveles máximos suele repoblarse con alevines nunca antes expuestos al virus.

## 3. Selección de ejemplares y obtención, transporte y manipulación de las muestras

### 3.1. Selección de las poblaciones y de los ejemplares

Las inspecciones clínicas deberán llevarse a cabo durante un período en el que la temperatura del agua sea inferior a 14°C o siempre que sea probable que la temperatura del agua alcance su mínimo anual. Todas las unidades de producción (estanques, tanques, jaulas de red, etc.) deben ser inspeccionadas para detectar la posible presencia de peces muertos, débiles o con un comportamiento anormal. Debe prestarse especial atención a la zona de salida del agua, donde los peces débiles tienden a acumularse debido a la corriente de agua

Los peces que se van a muestrear se seleccionan de la siguiente manera:

- i) Para el genotipo I, en las piscifactorías en las que haya truchas arcoiris, se seleccionarán peces de esa especie para el muestreo. Si no hay truchas arcoiris, la muestra deberá obtenerse de peces de todas las demás especies susceptibles al VSHV que estén presentes (según la lista en la Sección 2.2.1) o de especies con signos ambiguos de susceptibilidad (según la lista en la Sección 2.2.2). Sin embargo, todas las especies deben estar representadas proporcionalmente en la muestra. En el caso de otros genotipos (II, III y IV), deberán tomarse muestras de especies que se sepa que son susceptibles al genotipo en cuestión.
- ii) Las especies susceptibles deberán ser muestreadas siguiendo criterios, basados en el riesgo, de selección dirigida de poblaciones con historial de mortalidad anormal o episodios de posible exposición (por ejemplo, a través de aguas superficiales no tratadas, obtención de muestras silvestres o introducción de poblaciones de riesgo desconocido).

- iii) Si se utiliza más de una procedencia de agua para la producción de peces, se incluirán en la muestra peces de todas ellas.

### 3.2. Selección de órganos y tejidos

En poblaciones con enfermedad clínica, los tejidos óptimos son el riñón anterior, el bazo y el corazón (Lovy *et al.*, 2012; Oidtmann *et al.* 2011).

En poblaciones aparentemente sanas, los tejidos óptimos son el riñón anterior y el corazón y, durante la fase crónica de la infección, el encéfalo, ya que el VSHV puede persistir en los tejidos del sistema nervioso (Hershberger, 2010b; Lovy *et al.*, 2012; Oidtmann *et al.*, 2011b).

Cuando se tomen muestras de peces de tamaño demasiado pequeño como para llevar a cabo una disección de tejidos concretos, deberán recogerse las vísceras, incluido el riñón, u homogeneizarse los peces enteros después de retirar la parte del cuerpo situada detrás del poro anal. Cuando se tomen muestras de reproductores, se puede tomar líquido ovárico y espermático.

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

Cuando sea posible, deben evitarse los tejidos con alta actividad enzimática, como el hígado y las vísceras, ya que el VSHV es muy sensible a la degradación enzimática. Cuando se realicen ensayos de cultivo celular, deben evitarse los tejidos que contengan un elevado número de bacterias, como el intestino o la piel, para minimizar el riesgo de contaminación bacteriana de las células del cultivo tisular. Los conservantes y los fijadores, como el RNAlater y el formaldehído, pueden ser tóxicos para las células del cultivo tisular, como el epiteloma *papulosum cyprini* (EPC) y el pececillo de cabeza plana (FHM), y pueden afectar a los métodos de detección molecular (Auinger *et al.*, 2008; Pham *et al.*, 2018).

### 3.4. Muestreo no letal

Se comprobó que las biopsias de aletas y branquias se pueden tomar con un muestreo no letal y resultan eficaces para la detección del genotipo IVb del VSHV (Cornwell *et al.*, 2013) en peces clínicamente enfermos, y la RT-PCR anidada de muestras de sangre de peces infectados también demostró ser eficaz para la detección del VSHV (López-Vázquez *et al.*, 2006a). En el caso de los peces reproductores, puede analizarse líquido ovárico o espermático como alternativa a las pruebas letales. Sin embargo, los métodos de muestreo no letal no han sido totalmente validados para la detección de todos los genotipos del VSHV.

### 3.5. Conservación de muestras para el envío

Para obtener orientación sobre los métodos de conservación de las muestras para los métodos de ensayo previstos, véase el capítulo 2.3.0.

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

Pueden consultarse recomendaciones sobre el transporte de muestras para el aislamiento de virus al laboratorio en 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

En los peces, las muestras pueden tomarse de acuerdo con el procedimiento descrito en el apartado 3.5.1, utilizando un instrumento estéril, y transferirse a un tubo de plástico estéril que contenga medio de transporte.

Como alternativa, las muestras pueden introducirse en al menos cinco volúmenes de reactivos de estabilización del ARN, según la recomendación de los fabricantes. Las muestras en reactivos estabilizadores de ARN pueden enviarse sobre hielo o a temperatura ambiente si el tiempo de transporte no supera las 24 horas.

También pueden enviarse al laboratorio peces enteros (véase la sección 3.5.1).

Las muestras también pueden congelarse a -80°C y conservarse congeladas hasta su análisis (Siah *et al.*, 2014).

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

Las muestras de tejido para histopatología deben fijarse en formalina neutra tamponada al 10% inmediatamente después de su recogida. La proporción recomendada entre el fijador y el tejido es de 10:1. Para evitar una reticulación excesiva, el tejido debe transferirse a etanol después de 24 horas si se utilizan métodos distintos de la histopatología, como por ejemplo, la hibridación *in situ*.

### 3.5.4. Muestras para otras pruebas

Si las muestras se procesan para ELISA u otras pruebas inmunoquímicas, se deben seguir los procedimientos descritos en la Sección 3.5.1 relativas al aislamiento de agentes patógenos.

## 3.6. Combinación de varias muestras

No se ha evaluado el efecto de la combinación de muestras en la sensibilidad del diagnóstico, por lo que los peces más grandes deben procesarse y analizarse individualmente. Sin embargo, pueden combinarse muestras, especialmente los alevines o los ejemplares de hasta 0,5 g, para obtener suficiente material para el aislamiento del virus o la detección por métodos moleculares.

## 4. Métodos de diagnóstico

Los métodos actualmente disponibles para identificar infecciones que pueden usarse en i) vigilancia de poblaciones aparentemente sanas, ii) propósitos de diagnóstico preliminar y iii) diagnóstico confirmatorio se enumeran en la Tabla 4.1. por etapa de la vida. Las designaciones utilizadas en la Tabla indican:

Clave:

+++ =	Método(s) recomendado(s) validado(s) para el propósito indicado y normalmente hasta la fase 3 de la Vía de Validación de la OIE;
++ =	Método(s) adecuado(s) pero pueden precisar una validación posterior;
+ =	Se puede utilizar en algunas situaciones, pero el coste, la fiabilidad, la falta de validación u otros factores limitan mucho su aplicación;
Casillas sombreadas =	No adecuado para este propósito.

La selección de una prueba para un propósito determinado depende de las sensibilidades y especificidades analíticas y de diagnóstico, así como de la repetibilidad y reproducibilidad del método. Los Laboratorios de Referencia de la OIE agradecen los comentarios sobre el rendimiento diagnóstico de las pruebas, en particular las PCR, sobre los factores que afectan la sensibilidad analítica o la especificidad analítica del ensayo, como los componentes tisulares que inhiben la amplificación, la presencia de bandas no específicas o inciertas, etc., y sobre cualquier ensayo que se encuentre en la categoría +++.

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 afectados clínicamente

Método	A. Vigilancia de animales aparentemente sanos				B. Diagnóstico preliminar de animales afectados clínicamente				C. Diagnóstico confirmativo <sup>1</sup> de un resultado sospechoso en la vigilancia o de un diagnóstico preliminar			
	Etapas de vida tempranas <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adultos	LV	Etapas de vida tempranas <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adultos	LV	Etapas de vida tempranas <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adultos	LV
Preparaciones húmedas												
Inmunohistoquímica <sup>3</sup>									++	++	++	2
Histopatología <sup>3</sup>						++	++	1				
Cultivo celular	+++	+++	+++	3	+++	+++	+++	3	+++	+++	+++	3
PCR en tiempo real	+++	+++	+++	3	+++	+++	+++	3	+++	+++	+++	3
PCR convencional	++	++	++	3	+++	++	+++	3	+++	++	+++	3
Secuenciación de amplicón <sup>4</sup>									+++	+++	+++	3
Hibridación <i>in-situ</i>												
Bioensayo												
LAMP												
Ac-ELISA												
Ag-ELISA									+ <sup>5</sup>	++ <sup>5</sup>	++ <sup>5</sup>	1
IFAT					++	++	++	2	++ <sup>5</sup>	++ <sup>5</sup>	++ <sup>5</sup>	2
Neutralización sérica para la detección de Ac												

LV = nivel de validación, relativo a la fase de validación en la Vía de la OIE (Capítulo 1.1.2); RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa; LAMP = amplificación isotérmica mediada por bucle; Ac- o Ag-ELISA = enzimoimmunoanálisis de detección de anticuerpo o antígeno, respectivamente;

IFAT = prueba de la inmunofluorescencia indirecta. <sup>1</sup>En el caso del diagnóstico confirmativo, debe aplicarse una combinación de varios métodos (véase el apartado 6).

<sup>2</sup>Las fases de vida temprana y juvenil se han definido en el apartado 2.2.3.

<sup>3</sup>La citopatología y la histopatología se pueden validar si se han comparado estadísticamente los resultados de distintos operadores.

<sup>4</sup>Secuenciación del producto de la PCR.

<sup>5</sup>Solo para identificación de agente patógeno cultivado. El sombreado indica que la prueba es inadecuada o que no debe utilizarse para este propósito.

#### 4.1. Preparaciones húmedas

No es aplicable.

#### 4.2. Histopatología y citopatología

El riñón, el hígado y el bazo presentan una extensa necrosis y degeneración focales: vacuolas citoplasmáticas, picnosis, cariólisis e invasión linfocítica. Aunque el músculo esquelético no parece ser un sitio principal de infección, pueden acumularse eritrocitos en los haces y fibras del músculo esquelético sin causar daño al músculo *per se* (Evensen *et al.*, 1994).

#### 4.3. Cultivo celular para el aislamiento

Las líneas celulares recomendadas para la detección del VSHV son los alevines de perca sol (BF-2), el embrión de salmón chinook (CHSE-214), el *epithelioma papulosum cyprini* (EPC), el pececillo cabeza hueca (FHM) o la gónada de trucha arcoiris (RTG-2). La susceptibilidad de una línea celular a la infección por el VSHV dependerá de una serie de parámetros, como el linaje de la línea celular o las diferencias entre las cepas víricas. En general, las cepas del VSHV que pertenecen a los genotipos I, II o III se cultivan mejor en BF-2 (Lorenzen *et al.*, 1999), mientras que las cepas del genotipo IV se cultivan mejor en la línea celular EPC (Departamento del Interior de EE.UU., 2007).

##### 4.3.1. Líneas celulares

Las líneas celulares deben ser controladas regularmente (por ejemplo, cada 6 meses) para garantizar que la susceptibilidad a los agentes patógenos objetivo no ha cambiado.

Las células se cultivan a 20-24°C en un medio adecuado, por ejemplo, el medio esencial mínimo de Eagle (MEM) (o sus modificaciones) con un suplemento de un 10% de suero fetal bovino (FBS) y antibióticos a las concentraciones estándar. Cuando las células se cultivan en frascos cerrados, se recomienda tamponar el medio con bicarbonato. El medio utilizado para el cultivo de células en unidades abiertas puede estar tamponado con Tris/HCl (23 mM) y Na-bicarbonato (6 mM), o con medio tamponado con HEPES (HEPES= ácido N-2-hidroxietil-piperazina-N-2-etanosulfónico). El pH debe mantenerse a  $7,6 \pm 0,2$ . Los cultivos celulares que se utilicen para la inoculación con material tisular deben ser jóvenes (4–48 horas de edad) y estar en crecimiento activo (no confluyente) en el momento de la inoculación. La susceptibilidad de las células puede mejorarse reduciendo la cantidad de FBS al 2%. También se ha demostrado que el tratamiento previo de las células con una solución de PEG-20.000 al 7% (p/v) (10-15  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) 15-30 minutos antes de la inoculación de la muestra aumenta la detección del VSHV en el cultivo (Batts *et al.*, 1991).

##### 4.3.2. Preparación e inoculación de muestras

- i) **Nota:** Las muestras de tejidos y líquidos deben mantenerse frías durante todo el proceso de preparación de la muestra. Se homogeneizan las muestras de tejido con un mortero o un homogeneizador de tejidos. Puede ser necesario un pequeño volumen de medio (MEM-4 o HBSS [solución salina equilibrada de Hank] + antibióticos) para lograr una homogeneización completa.
- ii) Se ajusta el volumen de medio a una proporción final de 10:1 (medio:tejido) y se mezcla bien. En el caso de las muestras líquidas, se ajusta el volumen de medio a una proporción final de 1:1.
- iii) Se centrifuga el homogeneizado o las muestras líquidas a 2000–4000 **g** durante 15 minutos a 2–5°C.
- iv) Se retira el sobrenadante y se pasa por un filtro de membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  (si se dispone de él) o se trata durante 4 horas a 15°C o toda la noche a 4°C con antibióticos, como por ejemplo, gentamicina a 1 mg/ml.  

Si la muestra no puede ser inoculada dentro de las 48 horas siguientes a su obtención, el sobrenadante puede conservarse a –80°C siempre que el examen virológico se realice en un plazo máximo de 14 días.
- v) Si las muestras proceden de una zona en la que está presente el virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI), los sobrenadantes pueden tratarse con antisuero contra el VNPI. Se mezcla el sobrenadante con partes iguales de un conjunto oportunamente diluido de antisueros de los serotipos autóctonos del VNPI y se incuba durante un mínimo de una hora a 15°C o hasta 18 horas a 4°C. El título del antisuero debe ser al menos 1/2000 en una prueba de neutralización en placa al 50%.

El tratamiento de todos los inóculos con antisuero contra el VNPI tiene por objeto impedir que se desarrolle el efecto citopático (ECP) causado por el VNPI en los cultivos celulares inoculados. Esto reducirá la duración del examen virológico, así como el número de casos en los que la aparición del ECP tendría que considerarse potencialmente indicativa del VSHV. Cuando las muestras procedan de unidades de producción que se consideren libres de infección por el VSHV, podrá omitirse el tratamiento de los inóculos con antisuero contra el VSHV.

- vi) Las muestras se inoculan en cultivos celulares al menos a dos diluciones, a saber, la dilución primaria y una dilución 1:10 de la misma, lo que da lugar a diluciones finales de material tisular en medio de cultivo celular de 1:100 y 1:1000, respectivamente. La ratio entre el tamaño del inóculo y el volumen del medio de cultivo celular debe ser de aproximadamente 1:10. Para cada dilución y cada línea celular, debe utilizarse un mínimo de unos 2 cm<sup>2</sup> de superficie celular, correspondiente a un pocillo de una bandeja de cultivo celular de 24 pocillos. Se recomienda el uso de bandejas de cultivo celular, pero también se aceptan otras unidades de superficie de crecimiento similar o mayor.
- vi) Los cultivos celulares inoculados se incuban a 15°C durante 7–10 días. Utilizando un microscopio con un aumento de 40–150x, los cultivos deben inspeccionarse en busca de toxicidad al día siguiente de la inoculación, especialmente si el sobrenadante no se filtró en el paso iv. Se recomienda el uso de un microscopio de contraste de fase de fases.
- vii) Se vigilan las células regularmente (2-3 veces por semana) para detectar la posible presencia de ECP.

Si se observa el ECP, es necesario identificar el virus mediante las pruebas recomendadas en la sección 6. Si no se observa el ECP después del período de incubación primaria, se realiza el subcultivo.

#### *Subcultivo*

- i) Se retira el sobrenadante del cultivo primario y se inocula una placa de cultivo celular recién sembrada (<48 horas).
- ii) Se incuban las placas inoculadas a 15°C y se controlan durante 7–10 días como se ha descrito anteriormente.

Si se observa ECP, es necesario identificar el virus mediante las pruebas recomendadas en la sección 6. Si no se observa ECP después del período de incubación primaria o del subcultivo, la muestra es negativa.

#### **4.4. Amplificación de ácido nucleico**

El uso de pruebas moleculares (RT-PCR convencional y RT-PCR en tiempo real) es común debido a su rapidez, sensibilidad y especificidad. Las RT-PCR en tiempo real suelen ser más sensibles que las convencionales. El uso de estas pruebas para la detección e identificación del virus durante la fase aguda de la enfermedad está justificado desde hace varios años. En la fase aguda de la infección, la sensibilidad de algunas RT-PCR convencionales (Kim *et al.*, 2018) y de RT-PCR en tiempo real (Garver *et al.*, 2011; Jonstrup *et al.*, 2013) es comparable a la de la detección mediante cultivo celular y posterior identificación. Los métodos moleculares descritos en este capítulo se dirigen todos al gen de la nucleoproteína, ya que es el gen de mayor transcripción en el genoma del VSHV (Chico *et al.*, 2006).

Recientemente, se ha desarrollado y validado una nueva RT-PCR de un solo paso (Kim *et al.*, 2018) para ser utilizada en lugar de la RT-PCR convencional recomendada anteriormente para detectar el VSHV. Este novedoso ensayo tiene una mayor sensibilidad de detección de todos los genotipos del VSHV, y supera al antiguo método, particularmente en la detección del genotipo IV.

Para la detección de todos los genotipos del VSHV con RT-PCR en tiempo real, los métodos de Jonstrup *et al.* (2013) y Garver *et al.* (2011) han sido validados hasta la fase 3, y muestran una sensibilidad similar a la de la detección por cultivo celular. Estos métodos tienen una alta sensibilidad y especificidad analítica y de diagnóstico, y son robustos en todos los laboratorios (Garver *et al.*, 2011; Jonstrup *et al.*, 2013; Warg *et al.*, 2014a; 2014b).

Se deben realizar los siguientes controles con cada ensayo: control negativo de extracción; control positivo; control sin molde; control interno de PCR.

#### 4.4.1. RT-PCR en tiempo real

El ARN total puede purificarse a partir de: alícuotas de medio de cultivo celular de células de monocapa infectadas; o los tejido/órganos homogeneizados en MEM especificados en la sección 4.3.1, muestras de tejido en reactivo estabilizador de ARN, muestras de tejido fresco o congelado, o fluido ovárico.

En el caso del medio de cultivo de células de monocapa infectadas, o en el de tejido homogeneizado en MEM, las alícuotas deben centrifugarse a 1000 **g** durante 5 minutos para eliminar los restos celulares.

Las RT-PCR en tiempo real de un paso (Jonstrup *et al.*, 2013) y de dos pasos (Garver *et al.*, 2011) dirigidas al gen de la nucleoproteína del VSHV han sido validadas en la fase 3 y se describen en el presente documento.

Debe incluirse un control positivo y uno negativo en cada etapa del ensayo: extracción, transcripción inversa (solo en el ensayo de dos pasos) y RT-PCR en tiempo real. Puede incluirse un control interno (endógeno) de la PCR; sin embargo, dado el gran número de especies de peces susceptibles a la infección por el VSHV, la selección de un control interno no es sencilla. Si se va a utilizar un control endógeno, hay que diseñar, optimizar y validar los cebadores y las sondas para cada especie de pez que se vaya a analizar.

El ARN total de las células y/o tejidos infectados se extrae mediante un método de separación de fases (por ejemplo, fenol-cloroformo o Trizol) o mediante el uso de un kit comercial de aislamiento de ARN, que se deberá utilizar según las instrucciones del fabricante.

##### *RT-PCR en tiempo real de un solo paso*

En la RT-PCR de un solo paso se utilizan cebadores específicos de los genes tanto para generar un transcrito de ADNc como para la RT-PCR en tiempo real. Ambas reacciones se producen en el mismo tubo, lo cual minimiza el riesgo de contaminación. La amplificación de la RT-PCR en tiempo real en un solo paso puede realizarse utilizando el cebador directo 5'-AAA-CTC-GCA-GGA-TGT-GTG-CGT-CC-3', el cebador inverso: 5'-TCT-GCG-ATC-TCA-GTC-AGG-ATG-AA-3', y la sonda marcada con FAM: 6'-FAM-TAG-AGG-GCC-TTG-GTG-ATC-TTC-TG-BHQ1. Los cebadores se utilizan a una concentración final de 900 nM y la concentración final de la sonda es de 250 nM. Se añaden 5 µl de ARN extraído (50 ng-2 ug) a cada reacción de RT-PCR de 25 µl. El ensayo se validó utilizando el kit Quantitect Probe RT-PCR (Qiagen, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante, y se recomienda, puesto que otros kits de un solo paso han mostrado una sensibilidad baja (Jonstrup *et al.*, 2013). Las condiciones del ciclo térmico son 50°C durante 30 minutos, 95°C durante 15 minutos, 40 ciclos de 94°C durante 15 segundos, 60°C durante 40 segundos, 72°C durante 20 segundos.

##### *RT-PCR en tiempo real de dos pasos*

###### i) Paso 1: Transcripción inversa

El ARN extraído se transcribe de forma no discriminatoria en ADNc utilizando cebadores aleatorios. Las reacciones de síntesis del ADNc y las condiciones de ciclado se consiguen mejor siguiendo las instrucciones del fabricante para los kits comerciales que han sido ampliamente probados con varios moldes de ARN, incluyendo dianas ricas en GC y AU y ARNs expresados a bajos niveles.

###### ii) Paso 2: PCR en tiempo real

El ensayo TaqMan de PCR en tiempo real utiliza el cebador directo 5'-ATG-AGG-CAG-GTG-TCG-GAG-G-3', el cebador inverso 5'-TGT-AGT-AGG-ACT-CTC-CCA-GCA-TCC y la sonda marcada con FAM 5'-6FAM-TAC-GCC-ATC-ATG-ATG-AGT-MGBNFQ-3'. Los cebadores se utilizan a una concentración final de 600 nM, y la concentración final de la sonda es de 200 nM. Se añaden 2,5 µl de producto de ADNc a cada reacción de PCR de 25 µl. Las condiciones del ciclo térmico son 50°C durante 2 minutos, 95°C durante 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto (Garver *et al.*, 2011).

Una muestra es negativa si no se registra ningún Ct (ciclo umbral), mientras que las muestras con un Ct se consideran positivas para el VSHV. El valor de corte depende de los ajustes de cada laboratorio.

#### 4.4.2. RT-PCR convencional

El aislamiento del ARN se realiza como en la sección 4.4.1. Debe incluirse control positivo y negativo en cada etapa de los ensayos: extracción y RT-PCR. Debido a la naturaleza sensible de las PCR, se recomienda encarecidamente que la mezcla primaria, la adición del molde y la amplificación de la RT-PCR se lleven a cabo en campanas o áreas espacialmente separadas.

Se debe realizar una RT-PCR de un solo paso según lo descrito por Kim *et al.* (2018) con el conjunto de cebadores 3F2R: cebadores directos (3F, 5'-(GGG-ACA-GGA-ATG-ACC-ATG-AT-3') y cebadores inversos (2R, (5'-TCT-GTC-ACC-TTG-ATC-CCC-TCC-AG-3') dirigidos a una región de 319 nt del gen de la nucleoproteína (posiciones 658-977).

La RT-PCR puede realizarse utilizando, por ejemplo, el sistema Qiagen OneStep RT-PCR (Qiagen, Alemania) o un kit similar, según las instrucciones del fabricante. En resumen, la mezcla de reacción se ajusta a un volumen final de 25 µl, incluyendo 5 µl del ARN vírico extraído, 5 µl de tampón de RT-PCR de un solo paso que contenga MgCl<sub>2</sub> 12,5 mM (concentración final de 2,5 mM), cada cebador a una concentración de 10 pM y 1 µl de mezcla de enzimas.

Se recomiendan los siguientes ciclos: 50°C durante 30 minutos, 95°C durante 15 minutos, 35 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 68°C durante 60 segundos. Posteriormente, la reacción se mantiene a 68°C durante 7 minutos.

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

Hasta la fecha, ningún otro método de amplificación de ácidos nucleicos capaz de detectar el VSHV de forma universal ha sido suficientemente validado.

### 4.5. Secuenciación del amplicón

El genotipo del VSHV puede identificarse mediante la secuenciación del amplicón generado por la RT-PCR convencional utilizando el conjunto de cebadores 3F2R (Kim *et al.*, 2018). La secuenciación de los nucleótidos del gen de la glicoproteína se utiliza mucho para la identificación de cepas y para el estudio epidemiológico, y se recomienda como uno de los pasos finales para el diagnóstico confirmativo. Existen varias RT-PCR convencionales que amplifican la secuencia codificante del gen de la glicoproteína central (669 nt) o completa (1524 nt), pero los datos de validación son escasos. El gen de la glicoproteína puede amplificarse por RT-PCR convencional utilizando los conjuntos de cebadores y las concentraciones indicadas en la Tabla 4.5.1. La transcripción inversa y la posterior amplificación por PCR pueden realizarse utilizando un kit diseñado para ello según las instrucciones del fabricante.

**Tabla 4.5.1.** Conjuntos de cebadores para la RT-PCR convencional, la secuenciación y el análisis filogenético

Cebador	Secuencia (5'–3')	Tamaño del producto (pb)	Concentración final del cebador	Referencia
GB+	GTC-GAA-GAA-GAG-ATA-GGC	1757	0,6 µM	Einer-Jensen <i>et al.</i> , 2004 Gudmundsdottir <i>et al.</i> , 2019
GB-	GTT-GGG-TCG-CCA-TGT-TTC-T		0,6 µM	
G330+	ACT-ACC-TAC-ACA-GAG-TGA-C	914	0,2 µM	Garver <i>et al.</i> , 2013
G1243-	CAA-TTT-GTC-CCC-GAA-TAT-CAT		0,2 µM	
G422+	TCC-CGT-CAA-GAG-GCC-AC	669	0,2 µM	
G1179-	TTC-CAG-GTG-TTG-TTT-ACC-G		0,2 µM	

#### 4.6. Hibridación *in situ*

No aplicable en relación al diagnóstico inicial y vigilancia de la infección por el VSHV.

#### 4.7. Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica revela células endoteliales positivas para el VSHV, principalmente en el sistema vascular (Evensen *et al.*, 1994). Se comercializan anticuerpos policlonales y monoclonales específicos para la inmunohistoquímica.

#### 4.8. Bioensayo

No aplicable en relación al diagnóstico inicial y vigilancia de la infección por el VSHV.



## 4.9. Métodos de detección basados en anticuerpos o en antígenos

Los métodos de detección basados en anticuerpos y antígenos no deben utilizarse como método de cribado de poblaciones sanas.

### 4.9.1. Enzimoimmunoanálisis (ELISA) de antígeno

- i) Se recubren los pocillos de las microplacas diseñadas para enzimoimmunoanálisis (ELISA) con diluciones adecuadas de inmunoglobulinas (Ig) purificadas de proteína A de sueros de conejo contra el VSHV en tampón carbonato, pH 9,6 (50 µl/pocillo).
- ii) Se incuban toda la noche a 4°C.
- iii) Se aclaran en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenga 0,05% de Tween-20 (PBST).
- iv) Se añade un 1% de Triton X-100 a la suspensión de virus a identificar.
- v) Se dispensan 50 µl por pocillo de diluciones de dos o cuatro pasos (en PBST que contenga un 1% de albúmina de suero bovino) del virus que se va a identificar y del VSHV control, así como de un control negativo (por ejemplo, el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa [VNHI]), y se deja que reaccionen con el anticuerpo de recubrimiento contra el VSHV durante 1 hora a 37°C.
- vi) Se aclaran en PBST.
- vii) Se añaden a los pocillos anticuerpos monoclonales contra la proteína N del VSHV (IP5B11) a razón de 50 µl pocillo<sup>-1</sup>.
- viii) Se incuban durante 1 hora a 37°C.
- ix) Se aclaran con PBST.
- x) Se añaden a los pocillos (50 µl pocillo<sup>-1</sup>) anticuerpos monoclonales anti-anticuerpos de ratón conjugados a peroxidasa de rábano picante (HRP).
- xi) Se incuban durante 1 hora a 37°C.
- xii) Se aclaran con PBST.
- xiii) Se visualiza la reacción con TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) y se mide la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm.

La versión de ELISA anterior se ofrece como ejemplo. Pueden utilizarse otras versiones de ELISA cuyo rendimiento se haya demostrado.

A modo de control positivo, se utiliza el sobrenadante de cultivos celulares inoculados con una cepa conocida de VSHV.

A modo de control negativo, se utiliza el sobrenadante de cultivo celular de la línea celular inoculada con un virus heterólogo (por ejemplo, VNHI) o de un cultivo no infectado.

### 4.9.2. Prueba de la inmunofluorescencia indirecta (IFAT)

- i) Se preparan monocapas de células en pocillos de 2 cm<sup>2</sup> de placas de plástico de cultivo celular o en cubreobjetos para alcanzar alrededor del 80% de confluencia, lo que suele lograrse en 24 horas de incubación a 22°C (se siembran seis monocapas de células por cada cepa de virus que se quiera identificar, más dos como controles positivos y dos como controles negativos). El contenido de FCS del medio de cultivo celular puede reducirse al 2–4%. Si hay que identificar varias cepas de virus, se recomienda encarecidamente el uso de placas Terasaki.
- ii) Cuando las monocapas celulares estén listas para la infección, es decir, el mismo día o el día siguiente a la siembra, se inoculan las suspensiones de virus que se van a identificar realizando pasos de dilución a la décima parte directamente en los pocillos o matraces de cultivo celular.
- iii) Diluir la suspensión de virus de control del VSHV de forma similar, para obtener un título de virus de unas 5000–10.000 unidades formadoras de placas (UFP) ml<sup>-1</sup> en el medio de cultivo celular.
- iv) Se incuban a 15°C durante 24 horas.
- v) Se retira el medio de cultivo celular, se enjuaga una vez con PBS 0,01 M, pH 7,2, y luego tres veces brevemente con una mezcla fría de un 30% de acetona y un 70% de etanol (v/v) (conservada a –20°C).

- vi) Se deja actuar el fijador durante 15 minutos. Un volumen de 0,5 ml es adecuado para 2 cm<sup>2</sup> de monocapa celular.
- vii) Se deja que las monocapas celulares se sequen al aire durante al menos 30 minutos y se procesan inmediatamente o se congelan a -20°C.
- viii) Se prepara una solución de anticuerpo o suero purificado contra el VSHV en PBST 0,01 M, pH 7,2, a la dilución adecuada (que se habrá establecido previamente o que indique el proveedor del reactivo).
- ix) Se rehidratan las monocapas celulares secas mediante cuatro pasos de enjuague con la solución PBST y se elimina completamente este tampón después del último enjuague.
- x) Se tratan las monocapas celulares con la solución de anticuerpos durante 1 hora a 37°C en una cámara húmeda y no se permite que se produzca evaporación, por ejemplo, introduciendo un trozo de algodón húmedo en la cámara húmeda. El volumen de solución a utilizar es de 0,25 ml por pocillo de 2 cm<sup>2</sup>.
- xi) Se aclaran cuatro veces con PBST como se ha indicado anteriormente.
- xii) Se tratan las monocapas celulares durante 1 hora a 37°C con una solución de anticuerpos conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) o isotiocianato de tetrametilrhodamina-5-(y-6-) (TRITC) contra la inmunoglobulina utilizada como anticuerpo primario y preparada según las instrucciones del proveedor. Estos anticuerpos conjugados suelen ser de conejo o de cabra.
- xiii) Se aclaran cuatro veces con PBST.
- xiv) Se examinan inmediatamente las monocapas celulares tratadas en placas de plástico, o se montan cubreobjetos utilizando, por ejemplo, solución salina de glicerol, pH 8,5 antes de la observación al microscopio.
- xv) Se examinan bajo luz UV incidente utilizando un microscopio con oculares x10 y lentes x20–40 con apertura numérica >0,65 y >1,3 respectivamente. Los controles positivo y negativo deben dar los resultados esperados antes de cualquier otra observación.

Pueden utilizarse en su lugar otras técnicas IFAT o inmunocitoquímicas (fosfatasa alcalina o peroxidasa) cuyo rendimiento se haya demostrado.

Debe incluirse siempre un control positivo, como pocillos o cubreobjetos con células infectadas por una cepa conocida del VSHV.

## 4.10. Otros métodos

### 4.10.1. Prueba de neutralización

- i) Se recoge el medio de cultivo de las monocapas celulares que presenten ECP y se centrifuga a 2000 *g* durante 15 minutos a 4°C, o se filtra a través de una membrana de poros de 0,45 µm (o 450 nm) para eliminar los restos celulares.
- ii) Se diluye el medio que contiene el virus de 10<sup>-2</sup> a 10<sup>-4</sup>.
- iii) Se mezclan alícuotas (por ejemplo, de 200 µl) de cada dilución con volúmenes iguales de una solución de anticuerpos contra el VSHV y, del mismo modo, se tratan alícuotas de cada dilución de virus con el medio de cultivo celular. La solución de anticuerpos neutralizantes [NAb] debe haber dado un título en la prueba de reducción en placa del 50% de, al menos, 2000.
- iv) Paralelamente, deberá realizarse otra prueba de neutralización contra una cepa del virus homóloga (prueba de neutralización positiva).
- v) En caso necesario, podrá realizarse una prueba de neutralización similar utilizando anticuerpos contra el VNPI.
- vi) Se incuban todas las mezclas a 15°C durante 1 hora.
- vii) Se transfieren alícuotas de cada una de las mezclas anteriores a monocapas de 24–48 horas, recubiertas con medio de cultivo celular que contenga un 10% de FCS (se inoculan dos pocillos por dilución), y se incuban a 15°C; las placas de cultivo celular de 24 o 12 pocillos son adecuadas para este fin, utilizando un inóculo de 50 µl.

- viii) Se comprueba en los cultivos celulares la aparición del ECP y se lee el resultado en cuanto se produzca en los controles no neutralizados (las monocapas celulares están protegidas en los controles de neutralización positiva). Los resultados se registran tras un simple examen microscópico (preferiblemente con contraste de fase) o tras descartar el medio de cultivo celular y teñir las monocapas celulares con una solución de violeta de cristal al 1% en etanol al 20%.
- ix) El virus analizado se identifica como VSHV cuando se evita o se retrasa notablemente el ECP en los cultivos celulares que recibieron la suspensión de virus tratada con el anticuerpo específico contra el VSHV, mientras que el ECP es evidente en todos los demás cultivos celulares.
- x) En ausencia de neutralización por los NAb contra el VSHV, es obligatorio realizar una RT-PCR, un ELISA o una IFAT utilizando la muestra sospechosa. Se han observado algunos casos de deriva antigénica del antígeno de superficie, lo cual ha provocado el fracaso ocasional de la prueba de neutralización mediante NAb contra el VSHV.

En su lugar, se pueden utilizar otras pruebas de neutralización cuyo rendimiento se haya demostrado.

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

El aislamiento del virus, la RT-PCR en tiempo real y la RT-PCR convencional son las pruebas recomendadas para la vigilancia a fin de demostrar la ausencia de la enfermedad en poblaciones aparentemente sanas.

## **6. Criterios de diagnóstico confirmativo**

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

Las definiciones de caso sospechoso y de caso confirmado se han desarrollado para apoyar la toma de decisiones relacionadas con el comercio y la confirmación del estado de la enfermedad a nivel de país, zona o compartimento. Las definiciones de casos confirmados de la enfermedad en áreas endémicamente afectadas pueden ser menos estrictas. Se recomienda que todas las muestras que arrojen resultados positivos sospechosos en un país, zona o compartimento libre del agente patógeno se remitan inmediatamente al Laboratorio de Referencia de la OIE para su confirmación, independientemente de que los signos clínicos estén asociados al caso. Si un laboratorio no tiene la capacidad para realizar las pruebas de diagnóstico necesarias, debe solicitar el asesoramiento del Laboratorio de Referencia de la OIE correspondiente.

### **6.1. Animales aparentemente sanos o animales de estado sanitario desconocido<sup>1</sup>**

Las poblaciones aparentemente sanas pueden caer bajo sospecha y, por lo tanto, ser muestreadas si existe un vínculo epidemiológico con una población infectada. La proximidad geográfica o el desplazamiento de animales, productos o equipos de origen animal, etc., desde una población que se sabe que está infectada equivale a un vínculo epidemiológico. Como alternativa, las poblaciones sanas se muestrean en estudios destinados a demostrar la ausencia de la enfermedad.

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

La presencia de infección por el VSHV debe sospecharse si se cumple al menos uno de los siguientes criterios:

- i) ECP característico del VSHV en cultivos celulares;
- ii) Resultado positivo en la RT-PCR en tiempo real;
- iii) Resultado positivo en la RT-PCR convencional.

---

<sup>1</sup> Por ejemplo, *mercancías* transfronterizas.

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

Se considera que la presencia de infección por VSHV debe confirmarse si se cumple uno o más de los siguientes criterios:

- i) Aislamiento del VSHV en cultivo celular, seguido de la identificación del virus por RT-PCR en tiempo real, Ag-ELISA, IFAT o por RT-PCR convencional y secuenciación del amplicón;
- ii) Detección del VSHV en preparaciones tisulares mediante RT-PCR en tiempo real, y mediante una RT-PCR convencional (dirigida a una región no solapada del genoma) y secuenciación del amplicón.
- iii) Detección del VSHV en preparaciones de tejidos mediante inmunohistoquímica, y mediante una RT-PCR convencional y secuenciación del amplicón.

Se debe contactar con los Laboratorios de Referencia para la remisión de muestras cuando los laboratorios analíticos no puedan realizar ninguna de las pruebas recomendadas y se estén realizando pruebas que puedan dar lugar a una notificación a la OIE.

## **6.2 Animales afectados clínicamente**

Ningún signo clínico es patognomónico de la infección por el VSHV, sin embargo, pueden reducir el rango de posibles diagnósticos.

### **6.2.1. Definición de caso sospechoso en animales afectados clínicamente**

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

- i) Signos anatomopatológicos o clínicos macroscópicos asociados a la infección por el VSHV, tal como se describe en el presente capítulo, con o sin mortalidad elevada;
- ii) Signos histopatológicos compatibles con la infección por el VSHV, tal como se describe en el presente capítulo;
- iii) Un resultado positivo en la RT-PCR en tiempo real;
- iv) Un resultado positivo en una RT-PCR convencional;
- v) Un resultado positivo en una IFAT;
- vi) ECP característico del VSHV en cultivo celular.

### **6.2.2. Definición de caso confirmado en animales afectados clínicamente**

La presencia de infección por el VSHV se confirmará si se cumplen uno o varios de los siguientes criterios

- i) Aislamiento del VSHV en cultivo celular, seguido de la identificación del virus mediante RT-PCR en tiempo real, Ag-ELISA, IFAT o mediante RT-PCR convencional y secuenciación del amplicón;
- ii) Detección del VSHV en preparaciones tisulares mediante RT-PCR en tiempo real, y mediante una RT-PCR convencional (dirigida a una región no solapada del genoma) y secuenciación del amplicón;
- iii) Detección del VSHV en preparaciones de tejidos mediante inmunohistoquímica, y mediante una RT-PCR convencional y secuenciación del amplicón.

Se debe contactar con los Laboratorios de Referencia para la remisión de muestras cuando los laboratorios analíticos no puedan realizar ninguna de las pruebas recomendadas y se estén realizando pruebas que den lugar a una notificación a la OIE.

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

El rendimiento diagnóstico de las pruebas recomendadas para la vigilancia o el diagnóstico de la infección por el VSHV figura en la Tabla 6.3. Esta información puede utilizarse para el diseño de encuestas sobre la infección por el VSHV; sin embargo, debe tenerse en cuenta que el rendimiento diagnóstico es específico de las circunstancias de cada estudio de rendimiento diagnóstico (incluidos el propósito de la prueba, la población de origen, los tipos de muestras tisulares y las especies hospedadoras), y que el rendimiento diagnóstico puede variar según las condiciones. Los datos sólo se presentan cuando las pruebas están validadas al menos al

nivel dos de la vía de validación descrita en el capítulo 1.1.2 y se dispone de datos en los estudios de precisión diagnóstica publicados.

**Tabla 6.3.** Rendimiento diagnóstico de las pruebas recomendadas para la vigilancia o el diagnóstico

Tipo de prueba	Propósito de la prueba	Poblaciones de origen	Órgano o tejido de las muestras	Especie	DSe (n)	DSp (n)	Prueba de referencia	Cita
Cultivo celular	Vigilancia	Peces infectados de forma experimental	Riñón, corazón y bazo	Trucha arcoiris	86 (84)	–	RT-PCR en tiempo real	Jonstrup <i>et al.</i> , 2013
Cultivo celular	Diagnóstico clínico	Peces infectados de forma experimental	Riñón	Salmón del Atlántico	100 (100)	94.4 (100)	Pseudo-prueba de referencia*	Garver <i>et al.</i> , 2011
RT-PCR en tiempo real	Vigilancia	Peces infectados de forma experimental	Riñón	Salmón del Atlántico	93 (30)	100 (70)	Cultivo celular	Garver <i>et al.</i> , 2011
RT-PCR en tiempo real	Vigilancia	Peces infectados de forma experimental	Riñón, corazón y bazo	Trucha arcoiris	90 (84)	100 (43)	Cultivo celular	Jonstrup <i>et al.</i> , 2013

\*una compilación de 8 resultados analíticos para evaluar tanto la RT-PCR en tiempo real como la prueba de aislamiento del virus (Garver *et al.*, 2011); DSe = sensibilidad diagnóstica; DSp = especificidad diagnóstica; n = número de muestras utilizadas en el estudio.

## 7. Bibliografía

- AHNE W. (1982). Vergleichende Untersuchung über die Stabilität von vier fischpathogenen Viren (VSHV, PFR, SVCV, IPNV) (Comparative studies on the stability of four fish-pathogenic viruses [VSHV, PFR, SVCV, IPNV]). *Zentralbl. Veterinarmed. [B]*, **29**, 457–476. (In German).
- ALTUNTAS C. & OGUT H. (2010). Monthly occurrence and prevalence of viral haemorrhagic septicemia virus (VSHV) in whiting *Merlangius merlangus*. *Dis. Aquat. Org.*, **88**, 107–113.
- ARKUSH K.D., MENDONCA H.L., MCBRIDE A.M., YUN S., MCDOWELL T.S. & HEDRICK R.P. (2006). Effects of temperature on infectivity and of commercial freezing on survival of the North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus (VSHV). *Dis. Aquat. Org.*, **69**, 145–151.
- AUINGER B.M., PFANDL K. & BOENIGK J. (2008). Improved methodology for identification of protists and microalgae from plankton samples preserved in Lugol's iodine solution: combining microscopic analysis with single-cell PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 2505–2510.
- BATTS W.N., TRAXLER G.S. & WINTON J.R. (1991). Factors affecting the efficiency of plating for selected fish rhabdoviruses. In: *Proceeding of the 2nd International Symposium on Viruses of Lower Vertebrates*, Fryer J.L., ed. July 29–31, Oregon University, Corvallis, OR, 17–24.
- BOVO G., HÅSTEIN T., HILL B., LAPATRA S., MICHEL C., OLESEN N.J., SHCHELKUNOV I., STORSET A., WOLLFROM T. & MIDTLING P.J. (2005a). QLK2-CT-2002-01546: Fish Egg Trade Work package 1 report: Hazard identification for vertical transfer of fish disease agents, 1–35. VESO, P.O. Box 8109, Dep., N-0032 Oslo, Norway.
- BOVO G., HILL B., HUSBY A., HÅSTEIN T., MICHEL C., OLESEN N.J., STORSET A. & MIDTLING P. (2005b). Fish Egg Trade Work package 3 report: Pathogen survival outside the host, and susceptibility to disinfection, 1–53. VESO, P.O. Box 8109 Dep., N-0032 Oslo, Norway. Available at: [http://www.eurl-fish.eu/-/media/Sites/EURL-FISH/english/activities/scientific%20reports/fisheggtrade%20wp\\_3.ashx?la=da](http://www.eurl-fish.eu/-/media/Sites/EURL-FISH/english/activities/scientific%20reports/fisheggtrade%20wp_3.ashx?la=da)
- CASTRIC J. & DE KINKELIN P. (1984). Experimental study of the susceptibility of two marine fish species, sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*), to viral haemorrhagic septicemia. *Aquaculture*, **41**, 203–212.
- CHICO V., GOMEZ N., ESTEPA A. & PEREZ L. (2006). Rapid detection and quantitation of viral hemorrhagic septicemia virus in experimentally challenged rainbow trout by real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods*, **132**, 154–159.
- CORNWELL E.R., BELLMUND C.A., GROOCCOCK G.H., WONG P.T., HAMBURY K.L., GETCHELL R.G. & BOWSER P.R. (2013). Fin and gill biopsies are effective nonlethal samples for detection of viral hemorrhagic septicemia virus genotype IVb. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **25**, 203–209.

- DALE O.B., ORPETVEIT I., LYGSTAD T.M., KAHNS S., SKALL H.F., OLESEN N.J. & DANNEVIG B.H. (2009). Outbreak of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in seawater-farmed rainbow trout in Norway caused by VHS virus Genotype III. *Dis. Aquat. Org.*, **85**, 93–103.
- DE KINKELIN P. & LE BERRE M. (1977). Isolation of a pathogenic rhabdovirus of brown trout (*Salmo trutta* L., 1766). *C.R. Hebd. Séances Acad. Sci.*, **284**, 101–104.
- DORSON M., QUILLET E., HOLLEBECQ M.G., TORHY C. & CHEVASSUS B. (1995). Selection of rainbow trout resistant to viral haemorrhagic septicaemia virus and transmission of resistance by gynogenesis. *Vet. Res.*, **26**, 361–368.
- EINER-JENSEN K., AHRENS P., FORSBERG R. & LORENZEN N. (2004). Evolution of the fish rhabdovirus viral haemorrhagic septicaemia virus. *J. Gen. Virol.*, **85**, 1167–1179.
- ELSAIED E., FAISAL M., THOMAS M., WHELAN G., BATTIS W. & WINTON J. (2006). Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus from muskellunge, *Esox masquinongy* (Mitchill), in Lake St Clair, Michigan, USA reveals a new sublineage of the North American genotype. *J. Fish Dis.*, **29**, 611–619.
- EVENSEN Ø., MEIER W., WAHLI T., OLESEN N.J., JØRGENSEN P.E.V. & HÅSTEIN T. (1994). Comparison of immunohistochemistry and virus cultivation for detection of viral haemorrhagic septicaemia virus in experimentally infected rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Org.*, **20**, 101–109.
- FAISAL M. & SCHULZ C.A. (2009). Detection of Viral hemorrhagic septicemia virus (VSHV) from the leech *Myzobdella lugubris* Leidy, 1851. *Parasit. Vectors*, **2**, 45.
- FAISAL M. & WINTERS A.D. (2011). Detection of viral hemorrhagic septicemia virus (VSHV) from *Diporeia* spp. (Pontoporeiidae, Amphipoda) in the Laurentian Great Lakes, USA. *Parasit. Vectors*, **4**, 2.
- GADD T., JAKAVA-VILJANEN M., EINER-JENSEN K., ARIEL E., KOSKI P. & SIHVONEN L. (2010). Viral haemorrhagic septicaemia virus (VSHV) genotype II isolated from European river lamprey *Lampetra fluviatilis* in Finland during surveillance from 1999 to 2008. *Dis. Aquat. Org.*, **88**, 189–198.
- GADD T., JAKAVA-VILJANEN M., TAPIOVAARA H., KOSKI P. & SIHVONEN L. (2011). Epidemiological aspects of viral haemorrhagic septicaemia virus genotype II isolated from Baltic herring, *Clupea harengus membras* L. *J. Fish Dis.*, **34**, 517–529.
- GAGNE N., MACKINNON A.M., BOSTON L., SOUTER B., COOK-VERSLOOT M., GRIFFITHS S., & OLIVIER G. (2007). Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus from mummichog, stickleback, striped bass and brown trout in eastern Canada. *J. Fish Dis.*, **30**, 213–223.
- GARVER K.A., HAWLEY L.M., McCLURE C.A., SCHROEDER T., ALDOUS S., DOIG F., SNOW M., EDES S., BAYNES C. & RICHARD J. (2011). Development and validation of a reverse transcription quantitative PCR for universal detection of viral hemorrhagic septicemia virus. *Dis. Aquat. Org.*, **95**, 97–112.
- GARVER K.A., TRAXLER G.S., HAWLEY L.M., RICHARD J., ROSS J.P. & LOVY J. (2013). Molecular epidemiology of viral haemorrhagic septicaemia virus (VSHV) in British Columbia, Canada, reveals transmission from wild to farmed fish. *Dis. Aquat. Org.*, **104**, 93–104. doi: 10.3354/dao02588.
- GOODWIN A.E. & MERRY G.E. (2011). Mortality and carrier status of bluegills exposed to viral hemorrhagic septicemia virus genotype IVb at different temperatures. *J. Aquat. Anim. Health*, **23**, 85–91.
- GROSS L., RICHARD J., HERSHBERGER P. & GARVER K. (2019). Low susceptibility of sockeye salmon *Oncorhynchus nerka* to viral hemorrhagic septicemia virus genotype IVa. *Dis. Aquat. Org.*, **135**, 201–209. doi: 10.3354/dao03398
- GUDMUNDSDOTTIR S., VENDRAMIN N., CUENCA A., SIGURÐARDOTTIR H., KRISTMUNDSSON A., IBURG T.M. & OLESEN N.J. (2019). Outbreak of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) in Iceland caused by VHS virus Genotype IV. *J. Fish Dis.*, **42**, 47–62. <https://doi.org/10.1111/jfd.12910>
- HAWLEY L.M. & GARVER K.A. (2008). Stability of viral hemorrhagic septicemia virus (VSHV) in freshwater and seawater at various temperatures. *Dis. Aquat. Org.*, **82**, 171–178.
- HENRYON M., BERG P., OLESEN N.J., KJÆR T.E., SLIERENDRECHT W.J., JOKUMSEN A. & LUND I. (2005). Selective breeding provides an approach to increase resistance of rainbow trout to the diseases, enteric redmouth disease, rainbow trout fry syndrome, and viral haemorrhagic septicaemia. *Aquaculture*, **250**, 621–636.

HENRYON M., JOKUMSEN A., BERG P., LUND I., PEDERSEN P.B., OLESEN N.J. & SLIERENDRECHT W.J. (2002a). Erratum to “Genetic variation for growth rate, feed conversion efficiency, and disease resistance exists within a farmed population of rainbow trout” (*Aquaculture*, 2002, **209**, 59–76). *Aquaculture*, **216**, 389–390.

HENRYON M., JOKUMSEN A., BERG P., LUND I., PEDERSEN P.B., OLESEN N.J. & SLIERENDRECHT W.J. (2002b). Genetic variation for growth rate, feed conversion efficiency, and disease resistance exists within a farmed population of rainbow trout. *Aquaculture*, **209**, 59–76.

HERSHBERGER P., GREGG J., GRADY C., COLLINS R. & WINTON J. (2010a). Kinetics of viral shedding provide insights into the epidemiology of viral hemorrhagic septicemia in Pacific herring. *Marine Ecology-Progress Series*, **400**:187e93.

HERSHBERGER P.K., GREGG J.L., GRADY C.A., TAYLOR L. & WINTON J.R. (2010b). Chronic and persistent viral hemorrhagic septicemia virus infections in Pacific herring. *Dis. Aquat. Org.*, **93**, 43–49.

ISSHIKI T., NISHIZAWA T., KOBAYASHI T., NAGANO T. & MIYAZAKI T. (2001). An outbreak of VSHV (viral hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in Japan. *Dis. Aquat. Org.*, **47**, 87–99.

ITO T. & OLESEN N.J. (2017). Viral haemorrhagic septicaemia virus (VSHV) remains viable for several days but at low levels in the water flea *Moina macrocopa*. *Dis. Aquat. Org.*, **127**, 11–18.

JENSEN N.J. & LARSEN J.L. (1979). The Ulcus-syndrome in cod (*Gadus morhua*). I. A pathological and histopathological study. *Nord Vet. Med.*, **31**, 222–228.

JOHANSEN R., BERGH Ø., MODAHL I., DAHLE G., GJERSET B., HOLST J.C., SANDLUND N. (2013). High prevalence of viral haemorrhagic septicaemia virus (VSHV) in Norwegian spring-spawning herring. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **478**, 223–230.

JONSTRUP S.P., GRAY T., KAHNS S., SKALL H.F., SNOW M. & OLESEN N.J. (2009). FishPathogens.eu/VSHV: a user-friendly viral haemorrhagic septicaemia virus isolate and sequence database. *J. Fish Dis.*, **32**, 925–929. [www.fishpathogens.eu](http://www.fishpathogens.eu)

JONSTRUP S.P., KAHNS S., SKALL H.F., BOUTRUP T.S. & OLESEN N.J. (2013). Development and validation of a novel Taqman based real time RT-PCR assay suitable for demonstrating freedom from viral haemorrhagic septicaemia virus. *J. Fish Dis.*, **36**, 9–23.

KAHNS S., SKALL H.F., KAAS R.S., KORSHOLM H., JENSEN B.B., JONSTRUP S.P., DODGE M.J., EINER-JENSEN K., STONE D. & OLESEN, N. J. (2012). European freshwater VSHV genotype Ia isolates divide into two distinct subpopulations. *Dis. Aquat. Org.*, **99**, 23–35.

KALAYCI G., INCOGLU S. & OZKAN B. (2006). First isolation of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) virus from turbot (*Scophthalmus maximus*) cultured in the Trabzon coastal area of the Black Sea in Turkey. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **26**, 157–162.

KIM H.J., CUENCA A. & OLESEN N.J. (2018). Validation of a novel one-step reverse transcription polymerase chain reaction method for detecting viral haemorrhagic septicaemia virus. *Aquaculture*, **492**, 170–183.

KOCAN R.M., HERSHBERGER P.K., ELDER N.E. & WINTON J.R. (2001). Survival of the North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus (VSHV) in filtered seawater and seawater containing ovarian fluid, crude oil and serum-enriched culture medium. *Dis. Aquat. Org.*, **44**, 75–78.

LOPEZ-VAZQUEZ C., DOPAZO C.P., OLVEIRA J.G., BARJA I. & BANDÍN J.L. (2006a). Development of a rapid, sensitive and non-lethal diagnostic assay for the detection of viral haemorrhagic septicaemia virus *J. Virol. Methods*, **133**, 167–174.

LOPEZ-VAZQUEZ C., RAYNARD R.S., BAIN N., SNOW M., BANDÍN I. & DOPAZO C.P. (2006b). Genotyping of marine viral haemorrhagic septicaemia virus isolated from the Flemish Cap by nucleotide sequence analysis and restriction fragment length polymorphism patterns. *Dis. Aquat. Org.* **73**, 23–31.

LORENZEN E., CARSTENSEN B. & OLESEN N.J. (1999). Inter-laboratory comparison of cell lines for susceptibility to three viruses: VSHV, IHNV and IPNV. *Dis. Aquat. Org.*, **37**, 81–88.

LORENZEN N. & LAPATRA S.E. (2005). DNA vaccines for aquacultured fish. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **24**, 201–213.

LOVY J., LEWIS N.L., HERSHBERGER P.K., BENNETT W. & GARVER K.A. (2012). Viral tropism and pathology associated with viral hemorrhagic septicemia in larval and juvenile Pacific herring from British Columbia. *Vet. Microbiol.*, **161**, 66–76.

MEYERS T.R., SULLIVAN J., EMMENEGGER E., FOLLETT J., SHORT S., BATTS W.N. & WINTON J.R. (1992). Identification of viral haemorrhagic septicaemia virus from Pacific cod *Gadus macrocephalus* in Prince William Sound, Alaska, USA. *Dis. Aquat. Org.*, **12**, 167–175.

MEYERS T.R. & WINTON J.R. (1995). Viral haemorrhagic septicaemia virus in North America. *Ann. Rev. Fish Dis.*, **5**, 3–24.

MUNRO E.S. & GREGORY A. (2010). The risk associated with vertical transmission of viral haemorrhagic septicaemia virus (VSHV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **30**, 154–158.

MUNRO E.S., MCINTOSH R.E., WEIR S.J., NOGUERA P.A., SANDILANDS J.M., MATEJUSOVA I., MAYES A.S. & SMITH R. (2015). A mortality event in wrasse species (Labridae) associated with the presence of viral haemorrhagic septicaemia virus *J. Fish Dis.*, **38**, 335–341.

NISHIZAWA T., IIDA H., TAKANO R., ISSHIKI T., NAKAJIMA K. & MUROGA K. (2002). Genetic relatedness among Japanese, American and European isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus (VSHV) based on partial G and P genes. *Dis. Aquat. Org.*, **48**, 143–148.

NISHIZAWA T., SAVAS H., ISIDAN H., ÜSTÜNDAG C., IWAMOTO H. & YOSHIMIZU M. (2006). Genotyping and pathogenicity of viral hemorrhagic septicemia virus from free-living turbot (*Psetta maxima*) in a Turkish coastal area of the Black Sea. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 2373–2378.

NORDBLOM B. (1998) Report on an Outbreak of Viral Haemorrhagic Septicaemia in Sweden. Report for the Standing Veterinary Committee, Swedish Board of Agriculture, Department for Animal Production and Health.

NORDBLOM B. & NORELL A.W. (2000). Report on an Outbreak of VHS (Viral Hemorrhagic Septicaemia) in Farmed Fish in Sweden. Report for the Standing Veterinary Committee, Swedish Board of Agriculture, Department for Animal Production and Health.

OGUT H. & ALTUNTAS C. (2014). Survey of viral haemorrhagic septicaemia virus in wild fishes in the southeastern Black Sea. *Dis. Aquat. Org.*, **109**, 99–106. doi: 10.3354/dao02728.

OIDTMANN B., JOINER C., REESE R.A., STONE D., DODGE M. & DIXON P. (2011a). Risks Associated with Commodity Trade: Transmission of Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus (VSHV) to Rainbow Trout Fry from VSHV-Carrying Tissue-Homogenates. *Transbound. Emerg. Dis.*, **58**, 224–231.

OIDTMANN B., JOINER C., STONE D., DODGE M., REESE R.A. & DIXON P. (2011b). Viral load of various tissues of rainbow trout challenged with viral haemorrhagic septicaemia virus at various stages of disease. *Dis. Aquat. Org.*, **93**, 93–104.

OLESEN N.J. & JORGENSEN P.E. (1982). Can and do herons serve as vectors for Egtved virus? *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **2**, 48.

PARRY L. & DIXON P.F. (1997). Stability of nine viral haemorrhagic septicaemia virus (VSHV) isolates in seawater. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **17**, 31–36.

PEDDIE S., MCLAUCHLAN P.E., ELLIS A.E. & SECOMBES C.J. (2003). Effect of intraperitoneally administered IL-1b-derived peptides on resistance to viral haemorrhagic septicaemia in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Org.*, **56**, 195–200.

PETERS F. & NEUKIRCH M. (1986). Transmission of some fish pathogenic viruses by the heron, *Ardea cinerea*. *J. Fish Dis.*, **9**, 539–544.

PHAM P.H., SOKEECHAND B.S.H., GARVER K.A., JONES G., LUMSDEN J.S. & BOLS N.C. (2018). Fish viruses stored in RNA later can remain infectious and even be temporarily protected from inactivation by heat or by tissue homogenates. *J. Virol. Methods*, **253**, 31–37.



- PIERCE L.R. & STEPIEN C.A. (2012). Evolution and biogeography of an emerging quasispecies: Diversity patterns of the fish Viral Hemorrhagic Septicemia virus (VSHV). *Mol. Phyl. Evol.*, **63**, 327–341.
- RAJA-HALLI M., VEHMAS T.K., RIMAILA-PÄRNÄNEN E., SAINMAA S., SKALL H.F., OLESEN N.J. & TAPIOVAARA H. (2006). Viral haemorrhagic septicaemia (VHS) outbreaks in Finnish rainbow trout farms. *Dis. Aquat. Org.*, **72**, 201–211.
- SANGLUND N., GJERSET B., BERGH Ø., MODAHL I., OLESEN N.J. & JOHANSEN R. (2014). Screening for Viral Hemorrhagic Septicemia Virus in Marine Fish along the Norwegian Coastal Line. *PLoS ONE* 9(9): e108529. doi:10.1371/journal.pone.0108529
- SCHLOTFELDT H.-J., AHNE W., JØRGENSEN P.E.V. & GLENDE W. (1991). Occurrence of viral haemorrhagic septicaemia in turbot (*Scophthalmus maximus*) – a natural outbreak. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **11**, 105–107.
- SCHONHERZ A.A., HANSEN M.H., JØRGENSEN H.B., BERG P., LORENZEN N. & EINER-JENSEN K. (2012). Oral transmission as a route of infection for viral haemorrhagic septicaemia virus in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.*, **35**, 395–406.
- SIAH A., DUESEND H., FRISCH H., NYLUND A., MCKENZIE & SAKSIDA S. (2014). Development of a Multiplex Assay to Measure the Effects of Shipping and Storage Conditions on the Quality of RNA Used in Molecular Assay for Detection of Viral Haemorrhagic Septicemia Virus. *J. Aquat. Anim. Health*, **26**, 173–180.
- SKALL H.F., JØRGENSEN C. & OLESEN N.J. (2015). Evaluation of the effect of percolation and NaCl solutions on viral haemorrhagic septicaemia virus (VSHV) under experimental conditions. *Aquaculture*, **448**, 507–511.
- SKALL H.F., OLESEN N.J. & MELLERGAARD S. (2005a). Viral haemorrhagic septicaemia virus in marine fish and its implications for fish farming – a review. *J. Fish Dis.*, **28**, 509–529.
- SKALL H.F., OLESEN N.J. & MELLERGAARD S. (2005b). Prevalence of viral haemorrhagic septicaemia virus in Danish marine fishes and its occurrence in new host species. *Dis. Aquat. Org.*, **66**, 145–151.
- SKALL H.F., SLIERENDRECHT W.J., KING J.A. & OLESEN N.J. (2004). Experimental infection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with viral haemorrhagic septicaemia virus isolates from European marine and farmed fishes. *Dis. Aquat. Org.*, **58**, 99–110.
- SMAIL D.A. (2000). Isolation and identification of Viral Haemorrhagic Septicaemia (VHS) viruses from cod *Gadus morhua* with uncus syndrome and from haddock *Melanogrammus aeglefinus* having skin haemorrhages in the North Sea. *Dis. Aquat. Org.*, **41**, 231–235.
- SMAIL D.A. & SNOW M. (2011). Viral Haemorrhagic Septicaemia. In: Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections, Second Edition, Woo P.T.K. & Bruno D.W. eds. CABI, Wallingford, UK, 110–142.
- SNOW M., BAIN N., BLACK J., TAUPIN V., CUNNINGHAM C.O., KING J.A., SKALL H.F. & RAYNARD R.S. (2004). Genetic population structure of marine viral haemorrhagic septicaemia virus (VSHV). *Dis. Aquat. Org.*, **61**, 11–21.
- STEPIEN C.A., PIERCE L.R., LEAMAN D.W., NINER M.D. & SHEPHERD B.S. (2015). Gene Diversification of an Emerging Pathogen: A Decade of Mutation in a Novel Fish Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS) Substrain since Its First Appearance in the Laurentian Great Lakes. *PLoS one*, 1–25.
- THOMPSON T.M., BATTS W.N., FAISAL M., BOWSER P., CASEY J.W., PHILLIPS K., GARVER K.A., WINTON J. & KURATH G. (2011). Emergence of Viral hemorrhagic septicemia virus in the North American Great Lakes region is associated with low viral genetic diversity. *Dis. Aquat. Org.*, **96**, 29–43. doi: 10.3354/dao02362
- THROCKMORTON E., BRENDEN T., PETERS A.K., NEWCOMB T.J., WHELAN G.E. & FAISAL M. (2017). Potential Reservoirs and Risk Factors for VSHV IVb in an Enzootic System: Budd Lake, Michigan. *J. Aquat. Anim. Health*, **29**, 31–42. doi: 10.1080/08997659.2016.1254121
- TOPLAK I., HOSTNIK P., RIHTARIČ D., OLESEN N.J., SKALL H.F. & JENČIČ V. (2010). First isolation and genotyping of viruses from recent outbreaks of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in Slovenia. *Dis. Aquat. Org.*, **92**, 21–2.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF THE INTERIOR, US GEOLOGICAL SURVEY (2007). Detection of viral hemorrhagic septicemia virus. USGS FS 2007-3055. US Department of the Interior, US Geological Survey. Fact Sheets.
- VESTERGARD JØRGENSEN P.E. & OLESEN N.J. (1987). Cod ulcer syndrome rhabdovirus is indistinguishable from the Egtved (VHS) virus. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **7**, 73.

WALKER P.J., BENMANSOUR A., DIETZGEN R. *ET AL.* (2000). Family Rhabdoviridae. *In: Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L. *et al.*, eds. 563–583.

WARG J.V., CLEMENT T., CORNWELL E.R., CRUZ A., GETCHELL R.G., GIRAY C., GOODWIN A.E., GROOCCOCK G.H., FAISAL M., KIM R., MERRY G.E., PHELPS N.B.D., REISING M.M., STANDISH I., ZHANG Y. & TOOHEY-KURTH K. (2014a). Detection and surveillance of viral hemorrhagic septicemia virus using real-time RT-PCR. I. Initial comparison of four protocols. *Dis. Aquat. Org.*, **111**, 1–13.

WARG J.V., CLEMENT T., CORNWELL E.R., CRUZ A., GETCHELL R.G., GIRAY C., GOODWIN A.E., GROOCCOCK G.H., FAISAL M., KIM R., MERRY G.E., PHELPS N.B.D., REISING M.M., STANDISH I., ZHANG Y. & TOOHEY-KURTH K. (2014b). Detection and surveillance of viral hemorrhagic septicemia virus using real-time RT-PCR. II. Diagnostic evaluation of two protocols. *Dis. Aquat. Org.*, **111**, 15–22.

VERRIER E.R., DORSON M., MAUGER S., TORHY C., CIOBOTARU C., HERVET C., DECHAMP N., GENET C., BOUDINOT P. & QUILLET E. (2013). Resistance to a Rhabdovirus (VSHV) in Rainbow Trout: Identification of a Major QTL Related to Innate Mechanisms. *PLoS ONE* **8**(2): e55302. doi:10.1371/journal.pone.0055302

WINTON J., KURATH G. & BATTS W. (2008). Molecular epidemiology of viral hemorrhagic septicemia virus in the Great Lakes region (USGS Fact Sheet 2008-3003). Available at <http://wfrc.usgs.gov/products/fs20083003.pdf>

WOLF K. (1988). Viral hemorrhagic septicemia. *In: Fish Viruses and Fish Viral Diseases*. Cornell University Press, Ithaca, New York, USA, 217–249.

\*  
\* \*

**NB:** Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la infección por el virus de la septicemia hemorrágica viral (puede consultarse en la Tabla del final de este *Manual Acuático* o en la página web de la OIE: <https://www.oie.int/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>).

Para más información sobre la septicemia hemorrágica viral, por favor contacte con el Laboratorio de Referencia de la OIE.

**NB:** ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1995 COMO SEPTICEMIA HEMORRÁGICA VIRAL.  
ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2012.