

CAPÍTULO 2.3.4.

INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA ANEMIA INFECCIOSA DEL SALMÓN CON SUPRESIÓN DE HPR O HPRO

1. Ámbito de aplicación

La infección por el virus de la anemia infecciosa del salmón (VAIS) es una infección por el agente patógeno denominado virus de la anemia infecciosa del salmón (VAIS) con supresión de la región altamente polimórfica (HPR), o bien por el VAIS HPRO (es decir, sin supresión de HPR) no patógeno, perteneciente al género Isavirus, de la familia Orthomyxoviridae.

El VAIS con supresión de HPR podría causar enfermedad en el salmón del Atlántico (*Salmo salar*), que puede progresar a un trastorno generalizado y letal caracterizado por una anemia grave y grados variables de hemorragias y necrosis en varios órganos. El curso de la enfermedad se prolonga y la mortalidad diaria es baja (0,05–0,1%), habitualmente solo en unas pocas jaulas. La mortalidad acumulada puede llegar a ser muy alta durante un periodo de varios meses si no se actúa para reducir la propagación de la enfermedad (Rimstad *et al.*, 2011).

La detección del VAIS HPRO no se ha relacionado con signos clínicos de enfermedad en el salmón del Atlántico (Christiansen *et al.*, 2011). El genotipo de este virus se replica de forma transitoria y se ha localizado principalmente en las branquias. Se ha propuesto una relación entre el VAIS HPRO no patógeno y el VAIS con supresión de HPR patógeno, y pueden producirse brotes como consecuencia del surgimiento de VAIS con supresión de HPR a partir de VAIS HPRO (Cardenas *et al.*, 2014; Christiansen *et al.*, 2017; Cunningham *et al.*, 2002; Gagné & Leblanc, 2017; Mjaaland *et al.*, 2002).

2. Información sobre la enfermedad

2.1. Factores del agente

2.1.1. El agente patógeno, cepas del agente

Las propiedades morfológicas, fisicoquímicas y genéticas del ISAV coinciden con las de los *Orthomyxoviridae*, y el ISAV ha sido clasificado como la especie tipo del género Isavirus (Kawaoka *et al.*, 2005) dentro de esta familia de virus.

El VAIS es un virus con envoltura, que muestra una forma icosaédrica pleomórfica, de 100–130 nm de diámetro, con proyecciones superficiales en forma de hongo de aproximadamente 10 nm de longitud (Falk *et al.*, 1997). Sin embargo, hay estudios que indican una mayor heterogeneidad morfológica en células de origen epitelial (Ramírez y Marshall, 2018). El genoma del virus consiste en ocho segmentos de ARN monocatenarios levógiros (Mjaaland *et al.*, 1997). El virus tiene actividad hemaglutinante, destructora de receptores y de fusión (Falk *et al.*, 1997; Mjaaland *et al.*, 1997).

Se han descrito las secuencias de nucleótidos de los ocho segmentos del genoma, que codifican al menos diez proteínas (Clouthier *et al.*, 2002; Rimstad *et al.*, 2011), incluidas las secuencias no codificantes 3' y 5' (Kulshreshtha *et al.*, 2010; Sandvik *et al.*, 2000). Se han identificado cuatro proteínas estructurales principales, incluyendo una nucleoproteína de 68 kDa, una proteína de matriz de 22 kDa, una proteína hemaglutinina-esterasa (HE) de 42 kDa responsable de la actividad de unión y destrucción de receptores, y una glicoproteína de superficie de 50 kDa con actividad putativa de fusión (F), codificada por los segmentos 3, 8, 6 y 5 del genoma, respectivamente. Los segmentos 1, 2 y 4 codifican las polimerasas virales PB2, PB1 y PA. Los dos segmentos genómicos más pequeños, los segmentos 7 y 8, contienen cada uno dos marcos de lectura abiertos (ORF). El ORF1 del segmento 7 codifica una proteína con propiedades antagonistas del interferón de tipo I, mientras que se ha sugerido que el ORF2 codifica una proteína de exportación nuclear (NEP: Ramly *et al.*, 2013). El ORF1 más pequeño del segmento 8 codifica la proteína matriz, mientras que el ORF2 más grande codifica una proteína estructural de unión

a ARN también con propiedades antagonistas del interferón de tipo I, y también interactúa con el sistema de ARNi del huésped (García-Rosado *et al.*, 2008; Thukral *et al.*, 2018).

En el gen HE, se ha identificado una pequeña HPR cerca del dominio transmembrana. Esta región se caracteriza por la presencia de huecos más que por sustituciones de un solo nucleótido (Cunningham *et al.*, 2002; Mjaaland *et al.*, 2002). Se ha sugerido que un gen de longitud total (HPRO) constituye un precursor a partir del cual se originan todas las variantes patógenas del VAIS con supresión de HPR (patógenas). Se ha observado la presencia de genoma de VAIS HPRO no patógeno tanto en salmón del Atlántico salvaje como en el de piscifactoría, ambos aparentemente sanos. Los peces con enfermedad clínica y con signos anatomopatológicos compatibles con una infección por VAIS están infectados por VAIS con delección de HPR (Christiansen *et al.*, 2011; Cunningham *et al.*, 2002; Markussen *et al.*, 2008). Se ha observado una infección mixta por variantes de VAIS con supresión de HRP por variantes de VAIS HPRO (Cardenas *et al.*, 2014; Kibenge *et al.*, 2009). En estudios recientes se ha observado que las variantes de VAIS HPRO son frecuentes en el salmón del Atlántico criado en el mar. El VAIS HPRO es estacional y transitorio y presenta un tropismo tisular con alta prevalencia en las branquias (Christiansen *et al.*, 2011; Lyngstad *et al.*, 2011). Hasta ahora, no se ha redactado un verdadero informe que vincule una presencia inicial de virus HPRO con un posterior brote clínico de AIS. De hecho, el riesgo de que surjan variantes patógenas del VAIS a partir de un reservorio de HPRO se considera bajo (Christiansen *et al.*, 2011). Hasta la fecha no se han hallado pruebas directas de relación entre la presencia del VAIS HPRO y brotes de enfermedad clínica. El riesgo de aparición de variantes patógenas del VAIS con supresión de HPR a partir de un reservorio de VAIS HPRO se considera bajo pero no insignificante (Cardenas *et al.*, 2014; Christiansen *et al.*, 2011; 2017; EFSA, 2012; Lyngstad *et al.*, 2012).

El análisis de la secuencia de varios segmentos del gen ha revelado diferencias entre las cepas tanto dentro de las zonas geográficas definidas como entre ellas. Según las diferencias de secuencia en una secuencia parcial del segmento 6, se han definido dos grupos: uno designado como clado europeo y otro designado como clado norteamericano (Cardenas *et al.*, 2019; Gagne & LeBlanc, 2017).

Además de las variaciones observadas en la HPR del gen HE, otros segmentos génicos son también importantes para la aparición de enfermedad clínica. Se ha identificado un posible marcador de virulencia en la proteína de fusión (F). Aquí, se ha observado que la sustitución de un solo aminoácido, o bien la inserción de una secuencia, cerca del posible punto de segmentación de la proteína es un prerrequisito para la virulencia (Kibenge *et al.*, 2007; Markussen *et al.*, 2008). No obstante, se han hallado variantes del VAIS con delección sin este marcador de virulencia en el segmento 5 (Cardenas *et al.*, 2019). Además de la inserción/recombinación, el VAIS también usa la recombinación de segmentos génicos en su evolución, con posibles vínculos con la virulencia (Cardenas *et al.*, 2014; Devold *et al.*, 2006; Gagné & Leblanc, 2017; Markussen *et al.*, 2008; Mjaaland *et al.*, 2005).

2.1.2. Supervivencia y estabilidad en muestras procesadas o conservadas

Un estudio científico concluyó que el VAIS conserva la infectividad durante al menos 6 meses a -80°C en homogeneizados de tejidos (Smail & Grant, 2012). El aislamiento en cultivo celular ha tenido éxito incluso a partir de peces conservados enteros congelados a -20°C durante varios años. La experiencia de los laboratorios de diagnóstico ha indicado la idoneidad de los procedimientos generales de manipulación de muestras (véase el Capítulo 2.3.0) para el VAIS.

2.1.3. Supervivencia y estabilidad fuera del hospedador

Se ha detectado el ARN del VAIS mediante la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) en el agua de mar de receptáculos de red con salmones atlánticos positivos al VAIS, pero no en una muestra recogida a 80–100 metros aguas abajo de la piscifactoría (Lovdal & Enger). Es difícil estimar con exactitud el tiempo que el virus puede seguir siendo infeccioso en el entorno natural debido a una serie de factores, como la presencia de partículas o sustancias que pueden unirse o inactivar el virus. Un estudio en el que se utilizó agua de mar natural a 10°C , expuesta o no a los rayos UVA y UVB, demostró que el título inicial de AIS disminuyó sustancialmente en un período de 72 horas, con algunos indicios de que la infectividad en un modelo de desafío IP se perdió entre 3 y 6 horas (Vike *et al.*, 2014).

En el apartado 2.4.5 se indican métodos de inactivación.

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Las especies que cumplen los criterios de inclusión en la lista de especies susceptibles a la infección por el VAIS según el Capítulo 1.5 del *Código Sanitario para los Animales Acuático (Código Acuático)* son las siguientes: salmón del Atlántico (*Salmo salar*), trucha común (*Salmo trutta*) y trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

2.2.2. Especies con evidencia incompleta de susceptibilidad

Las especies con evidencias incompletas de susceptibilidad según el Capítulo 1.5 del *Código Acuático* son las siguientes: arenque (*Clupea harengus*) y *Oncorhynchus masou*.

Además, se han obtenido resultados positivos en la RT-PCR específica de agente patógeno en los siguientes organismos, aunque no se ha demostrado infección activa *in vivo*: salmón del Pacífico (*Oncorhynchus kisutch*).

2.2.3. Probabilidad de infección según la especie, la fase del ciclo de vida, la población o las subpoblaciones

En el salmón del Atlántico, las fases de vida que van del alevín del saco vitelino al adulto se consideran susceptibles. Los brotes de enfermedad se observan principalmente en jaulas de agua de mar, y en el estadio de agua dulce se han observado unos pocos casos, incluido un caso en alevines de saco vitelino (Rimstad *et al.*, 2011). Se ha inducido experimentalmente infección por VAIS con supresión de HPR tanto en alevines como en pintos de salmón del Atlántico mantenidos en agua dulce.

2.2.4. Distribución del agente patógeno en el hospedador

Hay pruebas de la presencia del virus en prácticamente todos los órganos de los peces, así como en los líquidos ováricos y los óvulos (Marshall *et al.*, 2014), sin embargo, la variante HPRO tiene predilección por las branquias.

VAIS con delección de HPR: Las células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos parecen ser las principales células diana para la replicación del VAIS, tal y como demuestran la microscopía electrónica, la inmunohistoquímica y la hibridación *in situ*. También se ha demostrado la replicación del virus en los leucocitos, y los macrófagos sinusoidales del tejido renal se tiñen de forma positiva para el VAIS mediante inmunohistoquímica (IHC). Además, los glóbulos rojos pueden tener agregados del virus en la membrana celular externa, como indica la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFAT) con un anticuerpo monoclonal (MAb) contra la proteína HE. Dado que las células endoteliales permiten la replicación y el virus puede ser transportado en los glóbulos rojos, el virus puede aparecer en cualquier órgano. Los muestreos repetidos a lo largo de una infección crónica señalan al riñón y al corazón como los órganos con mayor probabilidad de dar positivo en las pruebas. La enfermedad clínica y las lesiones macroscópicas en los órganos aparecen sobre todo en los salmones del Atlántico con anemia grave (Aamelfot *et al.*, 2012; McBeath *et al.*, 2015; Rimstad *et al.*, 2011).

Para la interacción con las células, la molécula de hemaglutinina-esterasa (HE) del VAIS, al igual que la hemaglutinina (HA) de otros ortomixovirus (virus de la gripe A, B y C), es esencial para la unión del virus a los residuos de ácido siálico de la superficie celular. En el caso del VAIS, la partícula viral se une a receptores de glicoproteínas que contienen residuos de ácido siálico 4-O-acetilado, que también funciona como sustrato para la enzima destructora de receptores. La captación y replicación posteriores parecen seguir la vía descrita para los virus de la gripe A, indicada por la demostración de la fusión dependiente de un pH bajo, la inhibición de la replicación por actinomicina D y α -amanitina, la acumulación temprana de nucleoproteína seguida de proteína de matriz en el núcleo y la brotación de viriones progenie desde la superficie celular (Cottet *et al.*, 2011; Rimstad *et al.*, 2011).

VAIS HPRO: El tropismo tisular observado tuvo lugar sobre todo en las branquias cuando se realizaron pruebas de PCR en varios órganos del salmón del Atlántico (Christiansen *et al.*, 2011). La inmunotinción *in situ* de las branquias positivas a la PCR del VAIS HPRO muestra una tinción que se limita al epitelio, lo que indica la replicación y el desprendimiento en el agua, más que la infección invasiva. La inmunotinción no pudo demostrar la infección por el virus VAIS HPRO en los órganos internos.

2.2.5. Animales acuáticos reservorios de la infección

La infección persistente en portadores de por vida no se ha documentado en el salmón del Atlántico, pero a nivel de piscifactoría, la infección puede persistir en la población por la infección continua de nuevos individuos que no desarrollan signos clínicos de la enfermedad. Esto puede incluir la infección con las variantes de VAIS HPRO, que parece ser sólo de naturaleza transitoria (Christiansen *et al.*, 2011; Lyngstad *et al.*, 2011). La infección experimental de la trucha arco iris y la trucha marrón con el VAIS con supresión de HPR indica que podría ser posible una infección persistente en estas especies (Rimstad *et al.*, 2011).

2.2.6. Vectores

La transmisión del VAIS por piojos del salmón y del mar (*Lepeophtheirus salmonis* y *Caligus rogercresseyi*; Oelckers *et al.*, 2014) se ha demostrado en condiciones experimentales.

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mortalidad, morbilidad y prevalencia

El patrón de la enfermedad por VAIS con delección de HPR depende de varios factores, como la cepa del virus. Durante los brotes de infección por el VAIS con supresión de HPR, la morbilidad y la mortalidad pueden variar en gran medida en una misma jaula de red y entre jaulas de piscifactorías de agua salada, y entre piscifactorías (Hammell & Dohoo, 2005). La morbilidad y la mortalidad en el interior de una jaula de red puede empezar a niveles muy bajos. Lo habitual es que la mortalidad diaria oscile entre el 0,5% y el 1% en las jaulas afectadas. Sin intervención, la mortalidad aumenta y a menudo alcanza el pico a primeros de verano y en invierno. El intervalo de mortalidades acumuladas durante un brote va de insignificante a moderada, pero en los casos graves puede tener lugar una mortalidad acumulada superior al 90% durante varios meses. Inicialmente, un brote de enfermedad clínica puede limitarse a una o dos jaulas de red a lo largo de un periodo prolongado. En estos casos, si las jaulas de red con enfermedad clínica se sacrifican de inmediato, puede prevenirse la aparición de infección clínica por el VAIS con supresión de HPR en ese lugar.

El VAIS HPRO no se ha asociado a enfermedad clínica en el salmón del Atlántico.

2.3.2. Signos clínicos, incluidos cambios comportamentales

Los signos más llamativos de la infección por el VAIS con supresión de HPR son unas branquias pálidas (excepto en caso de estasis sanguínea en las branquias), exoftalmia, distensión abdominal, sangre en la cámara anterior del ojo y, a veces, hemorragias, sobre todo en el abdomen, así como edema en las escamas.

En general, el salmón del Atlántico infectado de forma natural por el VAIS con supresión de HPR está aletargado y puede estar cerca de la pared de la jaula de red.

Los peces afectados en general están en buen estado, pero los enfermos no tienen alimento en el tracto digestivo.

2.3.3. Lesiones anatomopatológicas macroscópicas

Los peces infectados por el VAIS con supresión de HPR pueden presentar gran variedad de alteraciones anatomopatológicas, desde ninguna a alteraciones graves, según factores como la dosis infectiva, la cepa vírica, la temperatura, la edad y el estado inmunitario de los peces. Ninguna lesión es patognomónica de la infección por el VAIS con supresión de HPR, pero siempre hay anemia y perturbaciones circulatorias. Se ha descrito que los siguientes hallazgos son compatibles con la infección por el VAIS con supresión de HPR, aunque casi nunca se observan todas las alteraciones a la vez en un solo pez: i) edema en la vejiga natatoria; ii) pequeñas hemorragias del peritoneo visceral y parietal; iii) hígado focal o difusamente rojo oscuro (en la superficie puede haber una fina capa de fibrina); iv) bazo hinchado y de color rojo oscuro con márgenes redondeados; v) enrojecimiento oscuro de la mucosa de la pared intestinal en los sacos ciegos, intestino medio y posterior, sin sangre en el lumen intestinal de los ejemplares frescos; vi) riñón hinchado y de color rojo oscuro con sangre y líquido saliendo de las superficies de los cortes; y vii) hemorragias puntuales del músculo esquelético.

2.3.4. Modos de transmisión y ciclo de vida

La principal vía de infección es probablemente horizontal a través de las branquias tanto para el VAIS HPRO como para el VAIS con supresión de HPRO, pero no se puede excluir la infección a través del intestino o la piel. No se puede excluir la transmisión vertical (Marshall *et al.*, 2014).

El VAIS puede eliminarse a través de la piel, las mucosas, la orina, las heces (Totland *et al.*, 1996), el líquido ovárico y los óvulos (Marshall *et al.*, 2014).

A excepción de un único informe de Ditlecadet *et al.* (2021), el VAIS HPRO no se ha aislado en cultivo celular, lo que dificulta los estudios *in vivo* e *in vitro* de las características y el ciclo de vida de esta variante.

2.3.5. Factores medioambientales

Por lo general, los brotes de infección por el virus de la anemia infecciosa del papiloma humano tienden a ser estacionales y se producen a principios del verano y del invierno; sin embargo, pueden producirse brotes en cualquier momento del año.

2.3.6. Distribución geográfica

El ISAV se notificó inicialmente en Noruega a mediados de la década de 1980 (Thorud & Djupvik, 1988). Desde entonces se ha notificado en otros países de Europa, Norteamérica y Sudamérica. Véase WAHIS (<https://wahis.woah.org/#/home>) para información reciente sobre la distribución a nivel de país.

2.4. Bioseguridad y estrategias de control de la enfermedad

2.4.1. Vacunación

La vacunación contra la infección por el VAIS se lleva a cabo en Norteamérica desde 1999 y en las Islas Feroe desde 2005. En Noruega, la vacunación se realiza normalmente en las regiones con alta prevalencia de brotes. Chile comenzó a vacunar contra la infección por el VAIS en 2010. Sin embargo, la eficacia de la vacuna parece insuficiente, dado que todos los casos de VAIS, tanto HPRO como con supresión de HPRO, que se produjeron en las Islas Feroe, ocurrieron en peces vacunados. La misma falta de eficacia se ha observado en Noruega después de la vacunación alrededor de las zonas de brotes.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas, incluidos agentes bloqueantes

Actualmente no se dispone de quimioterapia. Sin embargo, el fármaco antiviral de amplio espectro Ribavirin (1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide) es eficaz para inhibir la replicación del VAIS tanto *in vitro* como *in vivo* (Rivas-Aravena *et al.*, 2011). También cabe destacar que recientemente se ha demostrado que los péptidos interferentes tienen un efecto antiviral no tóxico contra el VAIS (Cárdenas *et al.*, 2020).

2.4.3. Inmunoestimulación

No es aplicable.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

Se han observado diferencias de susceptibilidad entre distintos grupos familiares de salmón del Atlántico en agua dulce en pruebas de desafío y en pruebas de campo, lo cual indica el potencial de la selección genética a favor de la resistencia (Gjøen *et al.*, 1997). Las empresas de cría están utilizando ensayos de infección, selección familiar y selección genómica para mejorar la resistencia a la AIS, pero se carece de información científica sobre el efecto de esto en la incidencia de la enfermedad o la prevalencia de la infección subclínica.

2.4.5. Métodos de inactivación

El VAIS es sensible a la irradiación UV (UVC) y al ozono. Se obtuvo una reducción de 3 logs en la infectividad en agua dulce y agua de mar estériles con una dosis de UVC de aproximadamente 35 Jm⁻²

y 50 Jm⁻², respectivamente, mientras que el valor correspondiente para el ISAV en aguas residuales de una planta de procesamiento de pescado fue de aproximadamente 72 Jm⁻². El agua de mar ozonizada (4 minutos con 8 mg ml⁻¹, 600–750 mV de potencial redox) puede inactivar completamente el VAIS. La incubación del homogeneizado de tejido de peces enfermos a pH 4 o pH 12 durante 24 horas inactivó el VAIS. La incubación en presencia de cloro (100 mg ml⁻¹) durante 15 minutos también inactivó el virus (Rimstad *et al.*, 2011). El VAIS aislado en cultivo celular puede sobrevivir durante semanas a bajas temperaturas, pero la infectividad del virus se pierde en 30 minutos de exposición a 56°C (Falk *et al.*, 1997).

2.4.6. Desinfección de huevos y larvas

La desinfección de huevos según los procedimientos estándar se sugiere como importante medida de control (capítulo 4.4. del *Código Acuático*).

2.4.7. Prácticas generales de manejo

La incidencia de infección por el VAIS puede reducirse en gran medida mediante la implementación de medidas legislativas o prácticas de manejo relativas al desplazamiento de peces, controles sanitarios obligatorios y reglamentación sobre transporte y sacrificio. También pueden contribuir a reducir la incidencia de la enfermedad medidas específicas que incluyan restricciones sobre piscifactorías afectadas, sospechosas o próximas, el sacrificio sanitario obligatorio, la segregación generacional (“todo dentro/todo fuera”), así como la desinfección de los desechos y el agua residual de las pesquerías y las plantas de procesamiento de peces.

La manipulación de los peces (por ejemplo, la clasificación o el tratamiento, la división o el traslado de las jaulas) puede iniciar brotes de enfermedades en las explotaciones infectadas, especialmente si se han experimentado problemas no diagnosticados a largo plazo (Lyngstad *et al.*, 2008).

La experiencia de las Islas Faroe, donde la prevalencia de VAIS HPRO es alta, pone de manifiesto que la combinación de una buena bioseguridad y unas buenas prácticas de manejo reduce considerablemente el riesgo de brotes de infección por el VAIS con supresión de HPR (Christiansen *et al.*, 2017).

3. Elección, obtención, transporte y manipulación de las muestras

3.1. Elección de poblaciones y de muestras

Para detectar el virus de la anemia infecciosa del salmón con supresión de HPR, las inspecciones clínicas deberán llevarse a cabo durante un período en el que la temperatura del agua sea propicia para el desarrollo de la enfermedad clínica (véase la sección 2.3.5). Se inspeccionarán todas las unidades de producción (estanques, tanques, jaulas de red, etc.) y se tomarán muestras de los peces que presenten signos clínicos, sinus anatomopatológicos macroscópicos y anemia compatibles con los descritos en las secciones 2.3.2 y 2.3.3.

Para la detección del virus de la anemia infecciosa del papiloma humano, se tomarán muestras de las branquias de ejemplares seleccionados al azar en diferentes momentos del ciclo de producción.

A los efectos de la vigilancia de la enfermedad, los peces que se someterán a muestreo se seleccionarán como sigue:

- i) Se tomarán muestras preferentemente de las especies más susceptibles (véase la Sección 2.2.3). Las demás especies susceptibles enumeradas en el apartado 2.2.1 se muestrearán proporcionalmente.
- ii) Deberán emplearse criterios basados en el riesgo para muestrear preferentemente lotes o poblaciones con un historial de mortalidad anormal, acontecimientos de exposición potencial o cuando haya pruebas de mala calidad del agua o de la cría. Si se utiliza más de una fuente de agua para la producción de peces, se incluirán en la muestra los peces de todas las fuentes de agua.
- iii) Si hay peces débiles, de comportamiento anormal o recién muertos, se seleccionarán dichos peces. Si no hay peces de este tipo (por ejemplo, durante la vigilancia de poblaciones aparentemente sanas), se seleccionarán peces de aspecto normal y aparentemente sanos, recogidos de manera que todas las partes de la explotación y todas las clases anuales estén proporcionalmente representadas en la muestra.

Para las investigaciones de brotes de enfermedades, deberán recogerse peces moribundos o que presenten signos clínicos de infección por el virus de la anemia infecciosa del salmón. Lo ideal es que los peces se recojan vivos, pero también pueden seleccionarse peces muertos recientemente para las pruebas de diagnóstico. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que habrá un riesgo significativo de contaminación por bacterias ambientales si los animales llevan muertos algún tiempo.

3.2. Elección de órganos o tejidos

3.2.1. Detección de VAIS con supresión de HPR

Para las pruebas de diagnóstico sólo deben utilizarse órganos internos que no hayan estado expuestos al medio ambiente.

Los órganos o el material tisular del que se tomarán muestras pueden incluir: i) para histología: riñón medio, hígado, corazón, páncreas, intestino y bazo; ii) para inmunohistoquímica: riñón medio y corazón, incluidas las válvulas y el bulbo arterioso; iii) para análisis de RT-PCR (convencional y en tiempo real): riñón medio y corazón; y iv) para cultivo de virus: riñón medio, corazón, hígado y bazo.

3.2.2. Detección del VAIS HPRO

Se recomienda tejido de branquias.

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

Se carece de información sobre muestras o tejidos no aptos para la detección de agentes patógenos; siga las recomendaciones de la sección 3.2 para la detección de virus.

3.4. Muestreo no letal

Se prefiere la sangre para el muestreo no letal para el virus de la anemia infecciosa del papiloma humano según un estudio de Giray *et al.* (2005) en el que se comparó la sangre y el moco con muestras de riñón derivadas tanto de peces infectados con o sin signos clínicos y analizadas mediante RT-PCR y aislamiento del virus en cultivo celular. Los hisopos de branquia se recomiendan para el muestreo no letal para la detección de HPRO (Amelfort *et al.*, 2016).

3.5. Conservación de muestras para el envío

Para orientación sobre los métodos de conservación de muestras para los métodos analíticos indicados, véase el Capítulo 2.3.0.

3.5.1. Muestras para el aislamiento del agente patógeno

El éxito del aislamiento del agente patógeno depende en gran medida de la calidad de las muestras (tiempo transcurrido desde la recogida y tiempo de conservación). Las muestras frescas deben conservarse en hielo y, preferiblemente, enviarse al laboratorio en las 24 horas siguientes a su recogida. Para evitar la degradación de las muestras, utilice métodos de conservación alternativos sólo tras consultar con el laboratorio receptor.

3.5.2. Conservación de las muestras para la detección por métodos moleculares

Las muestras de tejido para las pruebas de RT-PCR en tiempo real deben conservarse en etanol de grado analítico/reactivo (sin desnaturalizar) al 70–90% (v/v). La proporción recomendada de etanol respecto a tejido es de 10:1, según estudios en animales terrestres y en personas. No se recomienda el uso de etanol de grado inferior (de laboratorio o industrial). Si el material no puede ser fijado, puede ser congelado. Existen conservantes comerciales para el ARN, que tienen mejor eficacia que el etanol a temperatura ambiente. Se pueden utilizar fijadores comerciales validados que sean al menos tan eficaces como los fijadores descritos anteriormente.

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

Los métodos estándar de obtención, conservación y procesado de las muestras para las técnicas histológicas se describen en el apartado 2.2. del Capítulo 2.3.0 Información general (enfermedades de los peces).

3.5.4. Muestras para microscopía electrónica

El VAIS se ha caracterizado por microscopía electrónica de transmisión (MET) utilizando procedimientos generales (Falk *et al.*, 1997).

3.5.5. Muestras para otras pruebas

Actualmente, no se utiliza ninguna otra prueba, como por ejemplo, las serológicas, para fines de diagnóstico.

3.6. Combinación de varias muestras

La combinación de muestras de más de un animal para un fin determinado sólo deberá recomendarse cuando se hayan evaluado datos de respaldo sólidos sobre la sensibilidad y la especificidad del diagnóstico y se hayan considerado adecuados. Las fases de vida pequeñas, como los alevines, pueden combinarse para obtener la cantidad mínima de material necesario para las pruebas. Si se recurre a la combinación, se recomienda combinar trozos de órganos de un máximo de cinco peces.

4. Métodos de diagnóstico

Los métodos actualmente disponibles para la detección de patógenos que pueden utilizarse en i) la vigilancia de animales aparentemente sanos, ii) el diagnóstico presuntivo en animales clínicamente afectados y iii) con fines de diagnóstico confirmatorio se enumeran en la Tabla 4.1. por etapa de vida del animal.

Calificaciones para propósitos de uso. Para cada ensayo recomendado se proporciona una calificación cualitativa para el propósito de uso. Las calificaciones se determinan sobre la base de múltiples factores de rendimiento y operacionales relevantes para la aplicación de un ensayo para un propósito definido. Estos factores incluyen las características de rendimiento de diagnóstico apropiadas, el nivel de validación del ensayo, el coste de disponibilidad, la puntualidad, y el rendimiento y la operatividad de las muestras. Para un propósito específico de uso, los ensayos se clasifican como:

- +++ = Los métodos - son los más adecuados con un rendimiento y características operativas deseables.
- ++ = Los métodos son adecuados con un rendimiento y características operativas aceptables en la mayoría de las circunstancias.
- + = Los métodos - son adecuados, pero el rendimiento o las características operativas pueden limitar su aplicación en algunas circunstancias.
- Casillas sombreadas = No son adecuados para este propósito.

Etapa de validación. La etapa de validación corresponde a la vía de desarrollo y validación de ensayos del capítulo 1.1.2. La etapa de validación es específica para cada propósito de uso. En la sección 6.3 se ofrece información sobre el rendimiento diagnóstico de los ensayos recomendados, cuando se dispone de ella.

Los Laboratorios de Referencia de la OIE agradecen los comentarios sobre el rendimiento diagnóstico de los ensayos recomendados, en particular los métodos de PCR. Es de especial interés cualquier factor que afecte a la sensibilidad esperada del ensayo (por ejemplo, componentes tisulares que inhiban la amplificación) o a la especificidad esperada (por ejemplo, no detección de determinados genotipos, detección de secuencias homólogas dentro del genoma del huésped). Estas cuestiones deberán comunicarse a los Laboratorios de Referencia de la OIE para que se pueda asesorar a los laboratorios de diagnóstico y modificar las normas si es necesario.

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 ¹ de un resultado sospechoso en la vigilancia o de un diagnóstico preliminar			
	Etapas de vida tempranas ²	Juveniles ²	Adultos	LV	Etapas de vida tempranas ²	Juveniles ²	Adultos	LV	Etapas de vida tempranas ²	Juveniles ²	Adultos	LV
Preparaciones húmedas					+	+	+	1				
Histopatología ³					++	++	++	1				
Citopatología ³					++	++	++	1	++	++	++	1
PCR en tiempo real	+++	+++	+++	1	+++	+++	+++	1	++	++	++	1
PCR convencional	+	+	+	1	++	++	++	1	++	++	+	1
Secuenciación del amplicón ⁴									+++	+++	+++	NA
Hibridación <i>in situ</i>												
Inmunohistoquímica					++	++	++	1	++	++	++	1
FAT en improntas deriñón o en frotis desangr					++	++	++	1	+++	+++	+++	1
Bioensayo												
LAMP												
Ab ELISA												
Ag ELISA												
Prueba de neutralización en suero												

LV = nivel de validación, relativo a la fase de validación en la vía de la OIE (Capítulo 1.1.2); NA = no aplicable; RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa; LAMP = amplificación isotérmica mediada por bucle. Ab-ELISA o Ag-ELISA = enzimoimmunoanálisis de detección de Ab o Ag, respectivamente. ¹En el caso de los diagnósticos confirmativos, deben combinarse varios métodos (véase la Sección 6). ²Las fases de vida temprana y juvenil se han definido en el apartado 2.2.3. ³La citopatología y la histopatología se pueden validar si se han comparado estadísticamente los resultados de distintos operadores. ⁴Secuenciación del producto de la PCR.

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

Las alteraciones histológicas en el salmón del Atlántico clínicamente enfermo son variables, pero pueden incluir lo siguiente:

- i) Numerosos eritrocitos en el seno venoso central y en los capilares laminares, donde también se forman trombos eritrocitarios en las branquias.
- ii) Hemorragias multifocales a confluentes y/o necrosis de los hepatocitos a cierta distancia de los vasos mayores del hígado. Acumulaciones focales de eritrocitos en sinusoides hepáticos dilatados.
- iii) Acumulación de eritrocitos en los vasos sanguíneos de la lámina propia intestinal y finalmente hemorragia en la lámina propia.
- iv) Estroma del bazo distendido por la acumulación de eritrocitos.
- v) Ligeras hemorragias intersticiales multifocales a extensas con necrosis tubular en las zonas hemorrágicas, acumulación de eritrocitos en los glomérulos del riñón.
- vi) Eritrofagocitosis en el bazo y hemorragias secundarias en el hígado y el riñón.

Se ha observado el virus en las células endoteliales y en los leucocitos por microscopía electrónica de preparaciones de tejidos, pero este método no se ha utilizado con fines de diagnóstico.

- Hematocrito <10 en las fases finales (25-30 a menudo en los casos menos avanzados). El hematocrito <10 siempre debe ir seguido por la investigación de la infección por el VAIS con supresión de HPR en el salmón del Atlántico criado en agua de mar.
- Frotis de sangre con eritrocitos degenerados y vacuolizados y presencia de eritroblastos con forma nuclear irregular. Los recuentos diferenciales muestran una reducción de la proporción de leucocitos en relación con los eritrocitos, siendo la mayor reducción entre los linfocitos y los trombocitos.

La anatomopatología hepática conlleva un aumento de los niveles de enzimas hepáticas en la sangre.

4.3. Cultivo celular para el aislamiento

Se recomiendan las células ASK (Devold et al., 2000) para el aislamiento primario del VAIS con supresión de HPR, pero pueden utilizarse otras líneas celulares susceptibles, como la SHK-1 (Dannevig et al., 1995). Sin embargo, hay que tener en cuenta la variabilidad de las cepas y la capacidad de replicación en diferentes líneas celulares. Las células ASK parecen soportar el aislamiento y el crecimiento de los aislados del virus conocidos hasta ahora. En las células ASK puede aparecer un efecto citopático más marcado (ECP). Tanto las líneas celulares SHK-1 como ASK parecen perder la susceptibilidad al VAIS con supresión de HPR con el aumento de pases.

Las células SHK-1 y ASK se cultivan a 20°C en el medio de cultivo celular L-15 de Leibovitz complementado con suero fetal bovino (5% o 10%), L-glutamina (4 mM), gentamicina (50 µg ml⁻¹) y 2-mercaptoetanol (40 µM) (este último suplemento puede omitirse).

Para el aislamiento del virus, pueden utilizarse células cultivadas en frascos de cultivo de tejidos de 25 cm² o en placas de cultivo celular de múltiples pocillos, que pueden sellarse con parafilm o con un sellador de placas para estabilizar el pH del medio. Es posible que las células cultivadas en placas de 24 pocillos no crezcan muy bien en monocapas, pero esta característica puede variar entre laboratorios y según el tipo de placas de cultivo celular utilizadas. Deberán inocularse controles positivos de VAIS con supresión de HPR en serie junto con las muestras de tejido como prueba de la susceptibilidad de las células al VAIS con supresión de HPR (esto deberá realizarse en un lugar distinto al de las muestras problema). Véanse en el capítulo 2.3.0 los métodos utilizados para la inoculación de monocapas celulares, el seguimiento de los cultivos y el subcultivo.

Los cultivos celulares inoculados se incuban durante al menos 14 días y se examinan como se describe en el capítulo 2.3.0. Al final del período de incubación, o antes si aparece un ECP evidente, se recoge el medio para la identificación del virus mediante inmunofluorescencia (IFAT) (véase la sección 4.9), PCR en tiempo real o PCR

convencional (véanse las secciones 4.4.1 y 4.4.2), ya que la replicación del virus puede producirse sin un ECP aparente.

El procedimiento ha dado buenos resultados para el aislamiento del virus de la anemia infecciosa del salmón con supresión de HPR a partir de peces con signos clínicos o de casos sospechosos.

Hasta 2022, para el VAIS HPRO, no había habido informes de cultivo del VAIS HPRO ni de marcadores de virulencia en el segmento F. Sin embargo, en 2022, se describió una variante del VAIS similar al HPRO dentro del clado norteamericano y se cultivó en células ASK y SHK-1 (Ditlecadet *et al.*, 2022). Se descubrió que esta variante tiene marcadores de virulencia F, pero aún no se han publicado estudios experimentales en peces para esta variante.

Las líneas celulares deben ser monitoreadas para asegurar que su susceptibilidad a los agentes patógenos objetivo no ha cambiado.

4.4. Amplificación de ácidos nucleicos

4.4.1. RT-PCR en tiempo real

Los cebadores y las sondas que se muestran en la Tabla 4.4.1 para la RT-PCR en tiempo real detectarán tanto el VAIS europeo como el norteamericano con supresión de la HPR y el VAIS HPRO. La RT-PCR en tiempo real puede utilizarse para la detección del VAIS a partir del ARN total (o del ácido nucleico total) extraído de los órganos/tejidos recomendados (véase la sección 3.2) y se recomienda en lugar de la RT-PCR (véase la sección 4.4.2.), ya que tiene mayor especificidad y, probablemente, también sensibilidad. Los conjuntos de cebadores derivados del segmento genómico 8 y del segmento 7 han sido utilizados por varios laboratorios y se han considerado adecuados para la detección del VAIS durante los brotes de la enfermedad y en peces portadores aparentemente sanos.

Debido a la presencia generalizada de variantes de VAIS HPRO es esencial hacer un seguimiento de cualquier resultado positivo de la RT-PCR basado en los conjuntos de cebadores del segmento 7 u 8 mediante el análisis de la secuencia de la HPR del segmento 6, con el fin de determinar si el virus aislado es un virus con supresión de HPR, un VAIS HPRO o ambos. Los cebadores, diseñados y validados por el Laboratorio de Referencia de la OIE, figuran en el cuadro 4.4.2.1. La validación del conjunto de cebadores HPR para las cepas HPRO de Norteamérica está restringida por los limitados datos de secuencia disponibles en el Genbank para el extremo 3' del segmento 6 del VAIS (Marshall *et al.*, 2014).

Los cebadores para los segmentos 7 y 8, así como los cebadores de secuenciación para el segmento 6 de la HPR, se enumeran a continuación y también pueden utilizarse para la RT-PCR convencional si es necesario.

Tabla 4.4.1.1. Secuencias de cebador y sondas y condiciones de ciclado para la RT-PCR en tiempo real para detección del VAIS

Secuencias de cebador y sonda (5'→3') (concentración)	Condiciones de ciclado	Segmento genómico	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
Directo: CAG-GGT-TGT-ATC-CAT-GGT-TGA-AAT-G (900nM) Inverso: GTC-CAG-CCC-TAA-GCT-CAA-CTC- (900nM) Sonda: 6FAM-CTC-TCT-CAT-TGT-GAT-CCC-MGBNFQ (250nM)	1 × 2 minutos @ 50°C 1 × 10 minutos @ 95°C	7	155	Snow <i>et al.</i> , 2006
Directo: CTA-CAC-AGC-AGG-ATG-CAG-ATG-T (900 nM) Inverso: CAG-GAT-GCC-GGA-AGT-CGA-T (900 nM) Sonda: 6FAM-CAT-CGT-CGC-TGC-AGT-TC-MGBNFQ (250 nM)	45 × 15 segundos @ 95°C y 1 minuto @ 60°C	8	104	Snow <i>et al.</i> , 2006

Con cada ensayo deben realizarse los siguientes controles: control negativo de extracción; control positivo; control sin plantilla; control interno de RT-PCR. El control positivo debe distinguirse de la secuencia genómica del virus, lo cual permitirá la detección de cualquier contaminación cruzada que conduzca a falsos positivos.

4.4.2. RT-PCR

Los cebadores descritos en la Tabla 4.4.2 para la RT-PCR detectarán tanto el VAIS europeo como el norteamericano con supresión de la HPR y el VAIS HPRO. La RT-PCR puede utilizarse para la detección del VAIS a partir del ARN total (o del ácido nucleico total) extraído de los órganos/tejidos recomendados (véase la sección 3.2). Sin embargo, se recomienda la RT-PCR en tiempo real (véase la Sección 4.4.1.) para la detección del VAIS, ya que tiene mayor especificidad y, probablemente, también sensibilidad.

Tabla 4.4.2.1. Secuencias de cebadores y condiciones de ciclado para la RT-PCR de detección del Segmento 6 del VAIS

Secuencias de cebadores (5'→3') (concentration)	Condiciones de ciclado	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
Directo: GAC-CAG-ACA-AGC-TTA-GGT-AAC-ACA-GA (200 nM) Rev: GAT-GGT-GGA-ATT-CTA-CCT-CTA-GAC-TTG-TA (200 nM)	1 × 30 minutos @ 50°C 1 × 2 minutos @ 94°C 40 × 1 minuto @ 94°C, 1 minuto @ 50°C, 1 minuto @ 68°C 1 × 7 minutos @ 68°C	304 si HPRO	Diseñado por el Laboratorio de Referencia de la OIE.

4.5. Secuenciación del amplicón

Hay pruebas de la generación de amplicones completos para los ocho segmentos del genoma vírico que incluyen los extremos 5' y 3' de cada uno (Toro-Ascuy et al., 2015).

Para la RT-PCR y la secuenciación del amplicón se utilizan los cebadores del ensayo del segmento 6 que se indican en la sección 4.4.2.

4.6. Hibridación *in-situ*

Existen métodos publicados pero no se recomiendan debido a la falta de validación.

4.7. Inmunohistoquímica (IHC)

4.7.1. IHC en cortes de parafina de tejido fijado en formalina

El anticuerpo contra la nucleoproteína del VAIS con supresión de HPR se utiliza en cortes de parafina de tejidos fijados con formalina. Esta tinción IHC ha dado reacciones positivas tanto en salmones del Atlántico infectados de forma experimental como natural. Los órganos preferidos son el riñón medio y el corazón (zona de transición que incluye las tres cámaras y las válvulas). Los casos sospechosos debido a los signos anatomopatológicos se verifican con una IHC positiva. Los cortes histológicos se preparan de acuerdo con los métodos estándar.

i) Preparación de los cortes de tejido

Los tejidos se fijan en formol neutro tamponado con fosfato al 10% durante al menos 1 día, se deshidratan en etanol graduado, se aclaran en xileno o isopropanol y se incrustan en parafina, según los protocolos estándar. Cortes de aproximadamente 3 µm de grosor (para la IHC, tomados en portaobjetos recubiertos de poli-L-lisina) se calientan a 56–58°C (máximo 60°C) durante al menos 20 minutos, se desparafinan en xileno, se rehidratan mediante etanol graduado y se tiñen

con hematoxilina y eosina para la valoración morfológica anatomopatológica y la IHC, como se describe a continuación.

ii) Procedimiento de tinción para la IHC

Todas las incubaciones se realizan a temperatura ambiente en una plataforma oscilante, a menos que se indique lo contrario.

- a) La recuperación de antígenos se consigue hirviendo los cortes en tampón citrato 0,1 M, pH 6,0, durante 2 × 5 minutos, seguido de un bloqueo con leche seca no grasa al 5% y suero de cabra al 2% en TBS 50 mM (TBS; Tris/HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6) durante 20 minutos.
- b) A continuación, los cortes se incuban durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario (monoespecífico generado en conejo, por ejemplo, un anticuerpo contra la nucleoproteína del VAIS) diluido en TBS con leche en polvo desnatada al 1%, seguido de tres lavados en TBS, el último con Tween 20 al 0,1%.
- c) Para la detección de los anticuerpos unidos, los cortes se someten a una incubación con anticuerpos anti IgG de la especie generados en conejo y biotinilados (diluidos 1/200 en 2,5% de BSA en tampón Tris) durante 60 minutos, seguida de ABC-AP (diluida 1/100 en tampón Tris) durante 45 minutos. Tras un último lavado, se añaden Fast Red (1 mg ml⁻¹) y Naphthol AS-MX phosphate (0,2 mg ml⁻¹) con Levamisol 1 mM en TBS 0,1 M (pH 8,2) para revelar durante 20 minutos. A continuación, se lavan los cortes en agua del grifo antes de realizar la contratinción con hematoxilina de Harris y se montan en un medio de montaje acuoso. En cada montaje se incluyen cortes de tejido control positivos y negativos para el VAIS.

iii) Interpretación

Los cortes control negativo no deben presentar ninguna reacción de color significativa. Los cortes control positivo deben presentar una tinción citoplasmática e intranuclear claramente visible de las células endoteliales de los vasos sanguíneos o del endocardio del corazón. Un corte de la muestra problema sólo debe considerarse positivo si se encuentra una tinción roja intranuclear clara de las células endoteliales. La localización intranuclear es propia de la nucleoproteína del ortomixovirus durante una fase de la replicación del virus. La tinción citoplasmática concurrente suele ser dominante. Los patrones de tinción citoplasmática y de otro tipo sin localización intranuclear deben considerarse inespecíficos o no concluyentes.

Las reacciones de tinción positivas más intensas suelen obtenerse en las células endoteliales del corazón y del riñón. Las reacciones de tinción endotelial en lesiones hemorrágicas muy extensas pueden ser leves o estar ausentes, posiblemente debido a la lisis de las células endoteliales infectadas.

4.7.2. IFAT en improntas de tejido y frotis de sangre

Una prueba inmunofluorescencia indirecta (IFAT) utilizando MABs validados contra la hemaglutinina-esterasa (HE) del VAIS en improntas de riñón, en frotis de sangre o en cortes de tejido congelado de riñón, corazón e hígado ha dado reacciones positivas tanto en salmones del Atlántico infectados de forma experimental como natural. Los casos sospechosos (véase la sección 6.1) pueden confirmarse con una IFAT positiva.

i) Preparación de huellas de tejido

Un pequeño trozo de riñón medio se seca brevemente contra un papel absorbente para eliminar el exceso de líquido, y se hacen varias improntas en un área del tamaño de la uña del pulgar en portaobjetos recubiertos de poli-L-lisina. Las improntas se secan al aire, se fijan en acetona 100% refrigerada durante 10 minutos y se conservan a 4°C durante unos días o a -80°C hasta su uso.

ii) Procedimiento de tinción

Después de bloquear con leche desnatada en polvo al 5% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 30 minutos, las preparaciones se incuban durante 1 hora con una dilución adecuada

de MAb anti-VAIS, seguida de tres lavados. Para la detección de los anticuerpos unidos, las preparaciones se incuban con anticuerpos anti Ig de la especie generados en ratón y conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) durante 1 hora. Para el lavado se utiliza PBS con Tween 20 al 0,1%. Todas las incubaciones se realizan a temperatura ambiente.

iii) Preparación del frotis de sangre

La fracción de sangre se obtiene utilizando un gradiente de Percoll discontinuo. Una pequeña fracción se unta en un portaobjetos recubierto de poli-L-lisina. El frotis se seca al aire, se fija en acetona 100% refrigerada durante 10 minutos y se conserva a 4°C durante unos días o a -80°C hasta su uso.

iv) Procedimiento de tinción

Después de bloquear con leche desnatada en polvo al 5% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 30 minutos, la preparación se incuba durante 1 hora con una dilución adecuada de MAb anti-VAIS, seguida de tres lavados. Para la detección de los anticuerpos unidos, la preparación se incuba con anticuerpos anti Ig de la especie generados en ratón y conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) durante 1 hora. Para el lavado se utiliza PBS con Tween 20 al 0,1%. Todas las incubaciones se realizan a temperatura ambiente

4.8. Bioensayo

No está disponible.

4.9. Métodos de detección basados en anticuerpos o en antígenos

4.9.1. Identificación del virus mediante IFAT

Todas las incubaciones se realizan a temperatura ambiente, salvo que se indique lo contrario.

- i) Se preparan monocapas de células en placas de cultivo tisular adecuadas (por ejemplo, placas de 96 o 24 pocillos), en frascos de portaobjetos o en cubreobjetos, dependiendo del tipo de microscopio disponible (es necesario un microscopio fluorescente invertido para las monocapas cultivadas en placas de cultivo tisular). Las células SHK-1 crecen bastante mal en cubreobjetos de vidrio. Deben incluirse las monocapas necesarias para los controles negativo y positivo.
- ii) Se inoculan las monocapas con las suspensiones de virus que deben identificarse en diluciones de diez veces, dos monocapas por cada dilución. Se añade el control de virus positivo en diluciones que se sepa que dan una buena reacción de tinción. Se incuban los cultivos celulares inoculados a 15°C durante 7 días o, si aparece ECP, durante un tiempo más corto.
- iii) Se fijan en acetona al 80% durante 20 minutos después de eliminar el medio de cultivo celular y se enjuagan una vez con acetona al 80%. Se retira el fijador y se seca al aire durante 1 hora. Los cultivos celulares fijados pueden conservarse en seco durante menos de 1 semana a 4°C o a -20°C para una conservación más prolongada.
- iv) Se incuban las monocapas celulares con MAb anti-HPR con supresión del VAIS en una dilución adecuada en PBS durante 1 hora, y se enjuagan dos veces con PBS/0,05% Tween 20. Si se observa una unión no específica, se incuban con PBS que contenga 0,5% de leche desnatada en polvo.
- v) Se incuban con el anticuerpo contra inmunoglobulina específico de la especie conjugado a FITC durante 1 hora (o si se utiliza el anticuerpo generado en conejos como anticuerpo primario, se utiliza el anticuerpo conjugado a FITC contra la inmunoglobulina de conejo), según las instrucciones del proveedor. Para aumentar la sensibilidad, el anticuerpo anti Ig de cabra generado en ratón y conjugado con FITC puede sustituirse por anticuerpo anti Ig generado en ratón marcado con biotina y estreptavidina marcada con FITC, con el aclarado descrito antes del paso adicional. Se aclara una vez con PBS/0,05% Tween 20, como se ha descrito anteriormente. Los núcleos pueden teñirse con yoduro de propidio (100 µg ml⁻¹ en agua destilada estéril). Se añade PBS (sin Tween 20)

y se examina al microscopio de fluorescencia. Para evitar la decoloración, las placas teñidas deben mantenerse en la oscuridad hasta su examen. Para reducir el fotoblanqueo del FITC debido a la exposición a la luz de excitación durante la microscopía, puede añadirse una solución de 1,4-diazabicyclooctano (DABCO 2,5% en PBS, pH 8,2) o un reactivo similar como solución antidecoloración.

4.10. Otros métodos

Ninguno publicado o validado.

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

La RT-PCR en tiempo real está validada para la vigilancia destinada a demostrar la ausencia en poblaciones aparentemente sanas.

6. Criterios de diagnóstico confirmativo

Esta sección sólo aborda los resultados de las pruebas de diagnóstico para la detección de la infección en ausencia (Sección 6.1.) o en presencia de signos clínicos (Sección 6.2.), pero no evalúa si el agente infeccioso es la causa del cuadro 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 estatus respecto a la enfermedad a nivel de país, zona o compartimento. Las definiciones de caso para la confirmación de la enfermedad en áreas afectadas endémicamente pueden ser menos estrictas. Se recomienda que todas las muestras que arrojen resultados positivos sospechosos en un país, una zona o un compartimento por lo demás libres de agentes patógenos se remitan inmediatamente al Laboratorio de Referencia de la OIE para su confirmación, independientemente de que haya o no signos clínicos asociados al caso. Si un laboratorio no tiene la capacidad de realizar las pruebas de diagnóstico necesarias, deberá solicitar el asesoramiento del Laboratorio de Referencia de la OIE correspondiente.

6.1. Animales aparentemente sanos o animales cuyo estado de salud se desconoce¹

Las poblaciones aparentemente sanas pueden caer bajo sospecha, y por lo tanto ser muestreadas, si existe(n) un vínculo epidemiológico con una población infectada. La proximidad geográfica a una población infectada conocida o el movimiento de animales o productos animales o equipos, etc., equivalen a un vínculo epidemiológico. Como alternativa, se toman muestras de poblaciones sanas en los 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 VAIS HPRO o con supresión de HPR debe sospecharse si se cumple al menos uno de los criterios siguientes:

- i) Positivo en una RT-PCR
- ii) Positivo en una RT-PCR en tiempo real

6.1.2. Definición de caso confirmado en animales aparentemente sanos

Se debe contactar con los Laboratorios de Referencia para el envío de muestras cuando los laboratorios analíticos no puedan aplicar ninguno de los métodos recomendados y se estén realizando pruebas que den lugar a la notificación a la OIE.

1 Por ejemplo, instalaciones transfronterizas.

Definición de caso confirmado de infección por el virus de la AIS con supresión de HPR

La presencia de infección por el virus de la anemia infecciosa del salmón con supresión de HPR se considera confirmada si, además de los criterios indicados en la sección 6.1.1, se cumple al menos uno de los siguientes puntos:

- i) Detección del virus de la anemia infecciosa del salmón en muestras de tejido mediante RT-PCR (convencional o en tiempo real) y detección del virus de la anemia infecciosa del salmón en cortes histológicos de órganos internos mediante enzimoimmunoanálisis con anticuerpos específicos contra el virus de la anemia infecciosa del salmón (IFAT o inmunohistoquímica)
- ii) Detección del virus de la anemia infecciosa del salmón en muestras de tejido mediante RT-PCR (convencional o en tiempo real) y PCR convencional del segmento 6 y secuenciación del amplicón para verificar la supresión de HPR

Definición de caso confirmado de infección por el VAIS HPRO

La presencia de infección por el VAIS HPRO se considera confirmada si se cumple el siguiente criterio:

- i) Detección del VAIS en muestras de tejido mediante RT-PCR en tiempo real y detección del VAIS mediante RT-PCR convencional del segmento 6 y secuenciación del amplicón para verificar la supresión de HPRO

6.2. Animales afectados clínicamente

Los signos clínicos no son patognomónicos de una sola enfermedad; no obstante, pueden estrechar la variedad de posibles diagnósticos.

6.2.1. Definición de caso sospechoso en animales afectados clínicamente

Se sospechará la presencia de una infección por el virus de la anemia infecciosa del salmón con supresión de HPR si se cumple al menos uno de los siguientes criterios:

- i) Lesiones anatomopatológicas macroscópicas o signos clínicos asociados a la enfermedad descritos en el presente capítulo, con o sin mortalidad elevada
- ii) Alteraciones histopatológicas o citopatológicas compatibles con la presencia del patógeno o de la enfermedad
- iii) ECP típico del VAIS en un cultivo de células
- iv) Resultado positivo de una RT-PCR en tiempo real
- v) Resultado positivo de una RT-PCR convencional
- vi) Resultado positivo por inmunohistoquímica
- vii) Resultado positivo por IFAT en improntas de tejido

6.2.2. Definición de caso confirmado en animales afectados clínicamente

La presencia de la infección por el virus de la AIS con supresión de HPR se considera confirmada si se cumplen al menos uno o varios de los siguientes criterios:

- i) Aislamiento del virus con el ECP típico del VAIS en cultivo celular e identificación del virus mediante RT-PCR (convencional o en tiempo real) seguida de la secuenciación del amplicón.
- ii) Detección del virus de la anemia infecciosa del salmón en muestras de tejido mediante RT-PCR (convencional o en tiempo real) y detección del virus de la anemia infecciosa del salmón en cortes

histológicos mediante inmunoensayo utilizando anticuerpos específicos contra el virus de la anemia infecciosa del salmón (IFAT o inmunohistoquímica)

- iii) Detección del VAIS en muestras de tejido mediante RT-PCR (convencional o en tiempo real) y RT-PCR convencional del segmento 6 y secuenciación del amplicón para verificar la supresión de HPR

Se deberá contactar con los Laboratorios de Referencia para el envío de muestras cuando los laboratorios analíticos no puedan realizar ninguno de los métodos recomendados y se estén realizando pruebas que den lugar a la notificación a la OIE.

6.3. Sensibilidad y especificidad diagnóstica de las pruebas

Los resultados de diagnóstico de las pruebas recomendadas para la vigilancia o el diagnóstico de la infección por el virus de la anemia infecciosa del salmón se indican en la Tabla 6.3. Esta información puede utilizarse para diseñar estudios sobre la infección por el virus de la anemia infecciosa del salmón, pero debe tenerse en cuenta que el rendimiento diagnóstico es específico de las circunstancias de cada estudio de exactitud diagnóstica (incluyendo el propósito de la prueba, la población de origen, los tipos de muestras de tejido y las especies hospedadoras) y el rendimiento diagnóstico puede variar según las condiciones. Los datos sólo se presentan cuando las pruebas están validadas al menos para el nivel dos de la vía de validación descrita en el Capítulo 1.1.2. y la información está disponible en los estudios de exactitud diagnóstica publicados.

6.3.1. Para el diagnóstico preliminar de animales afectados clínicamente

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

DSe: = sensibilidad diagnóstica, DSp = especificidad diagnóstica, n = número de muestras utilizadas en el estudio.

6.3.2. Para la vigilancia de animales aparentemente sanos

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

DSe: = sensibilidad diagnóstica, DSp = especificidad diagnóstica, n = número de muestras utilizadas en el estudio.

7. Bibliografía

AAMELFOT M., CHRISTIANSEN D.H., DALE O.B., McBEATH A., BENESTAD S.L. & FALK K. (2016) Localised Infection of Atlantic Salmon Epithelial Cells by HPRO Infectious Salmon Anaemia Virus. PLoS ONE, **11**(3): e0151723. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151723> 2015.

AAMELFOT M., DALE O.B., WELI S., KOPPANG E.O. & FALK K. (2012). Expression of 4-O-acetylated sialic acids on Atlantic salmon endothelial cells correlates with cell tropism of Infectious salmon anemia virus. J. Virol., **86**, 10571–10578.

CARDENAS C., CARMONA M., GALLARDO A., LABRA A. & MARSHALL S.H. (2014). Coexistence in field samples of two variants of the infectious salmon anemia virus: a putative shift to pathogenicity. PLoS One, **9**, e87832. doi: 10.1371/journal.pone.0087832.

CARDENAS C., GUZMÁN F., CARMONA M., MUÑOZ C., NILO L., LABRA A. & MARSHALL S.H. (2020). Synthetic Peptides as a Promising Alternative to Control Viral Infections in Atlantic Salmon. Pathogens, **9**, 600.

- CARDENAS C., OJEDA N., LABRA Á. & MARSHALL S.H. (2019). Molecular features associated with the adaptive evolution of Infectious Salmon Anemia Virus (ISAV) in Chile. *Infect. Genet. Evol.*, **68**, 203–211. doi: 10.1016/j.meegid.2018.12.028.
- CHRISTIANSEN D.B., McBEATH A.J.A., AAMELFOT M., MATEJUSOVA I., FOURRIER M., WHITE P., PETERSEN P.E. & FALK K. (2017). First field evidence of the evolution from a non-virulent HPRO to a virulent HPR-deleted infectious salmon anaemia virus. *J. Gen. Virol.*, **98**, 595–606. doi: 10.1099/jgv.0.000741. PMID: 28475029.
- CHRISTIANSEN D.H., ØSTERGAARD P.S., SNOW M., DALE O.B & FALK K. (2011). A low-pathogenic variant of infectious salmon anemia virus (ISAV1 - HPRO) is highly prevalent and causes a non-clinical transient infection in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in the Faroe Islands. *J. Gen. Virol.*, **92**, 909–918.
- COTTET L., RIVAS-ARAVENA A., CORTEZ-SAN MARTIN M., SANDINO A.M. & SPENCER E. (2011). Infectious salmon anemia virus – genetics and pathogenesis. *Virus Res.*, **155**, 10–19.
- CLOUTHIER S.C., RECTOR T., BROWN N.E.C. & ANDERSON E.D. (2002). Genomic organization of infectious salmon anaemia virus. *J. Gen. Virol.*, **83**, 421–428.
- CUNNINGHAM C.O., GREGORY A., BLACK J., SIMPSON I. & RAYNARD R.S. (2002). A novel variant of the infectious salmon anaemia virus (ISAV) haemagglutinin gene suggests mechanisms for virus diversity. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **22**, 366–374.
- DANNEVIG B.H., FALK K. & NAMORK E. (1995). Isolation of the causal virus of infectious salmon anemia (ISA) in a long-term cell line from Atlantic salmon head kidney. *J. Gen. Virol.*, **76**, 1353–1359.
- DITLECADET D., GAUTREAU C., BOSTON L., LISTON R., JOHNSEN E. & GAGNÉ N. (2022). First report of successful isolation of a HPRO-like variant of the infectious salmon anaemia virus (ISAV) using cell culture. *J. Fish Dis.*, **45**, 479–483. doi: 10.1111/jfd.13556. Epub 2021 Nov 29.
- DEVOLD M., KARLSEN M. & NYLUND A. (2006). Sequence analysis of the fusion protein gene from infectious salmon anemia virus isolates: evidence of recombination and reassortment. *J. Gen. Virol.*, **87**, 2031–2040.
- DEVOLD M., KROSSOY B., ASPEHAUG V. & NYLUND A. (2000). Use of RT-PCR for diagnosis of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in carrier sea trout *Salmo trutta* after experimental infection. *Dis. Aquat. Org.*, **40**, 9–18.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2012) EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW); Scientific Opinion on infectious salmon anaemia. *EFSA Journal*, **10**, 2971.
- FALK K., NAMORK E., RIMSTAD E., MJAALAND S. & DANNEVIG B.H. (1997). Characterization of infectious salmon anemia virus, an orthomyxo-like virus isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J. Virol.*, **71**, 9016–9023.
- GAGNE N. & LEBLANC F. (2017). Overview of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in Atlantic Canada and first report of an ISAV North American-HPRO subtype. *J. Fish Dis.*, doi: 10.1111/jfd.12670
- GARCIA-ROSADO E., MARKUSSEN T., KILENG O., BAEKKEVOLD E.S., ROBERTSEN B., MJAALAND S. & RIMSTAD E. (2008). Molecular and functional characterization of two infectious salmon anaemia virus (ISAV) proteins with type I interferon antagonizing activity. *Virus Res.*, **133**, 228–238. doi: 10.1016/j.virusres.2008.01.008.
- GIRAY C., OPITZ H.M., MACLEAN S. & BOUCHARD D. (2005). Comparison of lethal versus non-lethal sample sources for the detection of infectious salmon anemia virus (ISAV). *Dis. Aquat. Org.*, **66**, 181–185.
- GJOEN H.M., REFSTIE T., ULLA O. & GJERDE B. (1997). Genetic correlations between survival of Atlantic salmon in challenge and field tests. *Aquaculture*, **158**, 277–288.
- HAMMELL K.L. & DOHOO I.R. (2005). Mortality patterns in infectious salmon anaemia virus outbreaks in New Brunswick, Canada. *J. Fish Dis.*, **28**, 639–650. doi: 10.1111/j.1365-2761.2005.00667.x.
- KAWAOKA Y., COX N.J., HALLER O., HONGO S., KAVERIN N., KLENK H.D., LAMB R.A., MCCAULEY J., PALESE P., RIMSTAD E. & WEBSTER R.G. (2005). Infectious Salmon Anaemia Virus. In: *Virus Taxonomy – Eight Report of the International*

Committee on Taxonomy Viruses, Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A., eds. Elsevier Academic Press, New York, USA, pp 681–693.

KIBENGE F.S.B., GODOY M.G., WANG Y., KIBENGE M.J.T., GHERARDELLI V., MANSILLA S., LISPERGER A., JARPA M., LARROQUETE G., AVENDAÑO F., LARA M. & GALLARDO A. (2009). Infectious salmon anaemia virus (ISAV) isolated from the ISA disease outbreaks in Chile diverged from ISAV isolates from Norway around 1996 and was disseminated around 2005, based on surface glycoprotein gene sequences. *Viol. J.*, **6**, 88.

KIBENGE F.S.B., KIBENGE M.J.T., WANG Y., QIAN B., HARIHARAN S. & MCGEACHY S. (2007). Mapping of putative virulence motifs on infectious salmon anaemia virus surface glycoprotein genes. *J. Gen. Virol.*, **88**, 3100–3111.

KULSHRESHTHA V., KIBENGE M., SALONIUS K., SIMARD N., RIVEROLL A. & KIBENGE F. (2010). Identification of the 3' and 5' terminal sequences of the 8 RNA genome segments of European and North American genotypes of infectious salmon anaemia virus (an orthomyxovirus) and evidence for quasispecies based on the non-coding sequences of transcripts. *Viol. J.*, **7**, 338.

LOVDAL T. & ENGER O. (2002). Detection of infectious salmon anaemia virus in seawater by nested RT-PCR. *Dis. Aquat. Org.*, **49**, 123–128.

LYNGSTAD T.M., HJORTAAS M.J., KRISTOFFERSEN A.B., MARKUSSEN T., KARLSEN E.T., JONASSEN C.M. & JANSEN P.A. (2011). Use of molecular epidemiology to trace transmission pathways for infectious salmon anaemia virus (ISAV) in Norwegian salmon farming. *Epidemics*, **3**, 1–11.

LYNGSTAD T.M., JANSEN P.A., SINDRE H., JONASSEN C.M., HJORTAAS M.J., JOHNSEN S. & BRUN E. (2008). Epidemiological investigation of infectious salmon anaemia (ISA) outbreaks in Norway 2003–2005. *Prev. Vet. Med.*, **84**, 213–227.

MARKUSSEN T., JONASSEN C.M., NUMANOVIC S., BRAAEN S., HJORTAAS M., NILSEN H. & MJAALAND S. (2008). Evolutionary mechanisms involved in the virulence of infectious salmon anaemia virus (ISAV), a piscine orthomyxovirus. *Virology*, **374**, 515–527.

MCBEATH A., AAMELFOT M., CHRISTIANSEN D.H., MATEJUSOVA I., MARKUSSEN T., KALDHUSDAL M., DALE O.B., WELI S.C. & FALK K. (2015). Immersion challenge with low and highly virulent infectious salmon anaemia virus reveals different pathogenesis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.*, **38**, 3–15.

MARSHALL S.H., RAMÍREZ R., LABRA A., CARMONA M. & MUÑOZ C. (2014). Bona Fide Evidence for Natural Vertical Transmission of Infectious Salmon Anemia Virus in Freshwater Brood Stocks of Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar*) in Southern Chile. *J. Virol.*, **88**, 6012–6018. doi: 10.1128/JVI.03670-13.

MJAALAND S., HUNGNES O., TEIG A., DANNEVIG B.H., THORUD K. & RIMSTAD E. (2002). Polymorphism in the infectious salmon anemia virus hemagglutinin gene; importance and possible implications for evolution and ecology of infectious salmon anemia disease. *Virology*, **302**, 379–391.

MJAALAND S., MARKUSSEN T., SINDRE H., KJOGLUM S., DANNEVIG B.H., LARSEN S. & GRIMHOLT U. (2005). Susceptibility and immune responses following experimental infection of MHC compatible Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with different infectious salmon anaemia virus isolates. *Arch. Virol.*, **150**, 2195–2216.

MJAALAND S., RIMSTAD E., FALK K. & DANNEVIG B.H. (1997). Genomic characterisation of the virus causing infectious salmon anemia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L): an orthomyxo-like virus in a teleost. *J. Virol.*, **71**, 7681–7686.

OELCKERS K., VIKE S., DUESUND H., GONZALEZ J., WADSWORTH S. & NYLUND A. (2014). *Caligus rogercresseyi* as a potential vector for transmission of Infectious Salmon Anaemia (ISA) virus in Chile. *Aquaculture*, **420–421**, 126–132.

RAMIREZ R. & MARSHALL S.H. (2018). Identification and isolation of infective filamentous particles in Infectious Salmon Anemia Virus (ISAV). *Microb. Pathogenesis*, **117**, 219–224. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.029>

RAMLY R.B., OLSEN C.M., BRAAEN S. & RIMSTAD E. (2013). Infectious salmon anemia virus nuclear export protein is encoded by a spliced gene product of genomic segment 7. *Virus Res.*, **177**, 1–10. doi: 10.1016/j.virusres. 2013.07.001.

RIMSTAD E., DALE O.B., DANNEVIG B.H. & FALK K. (2011). Infectious Salmon Anaemia. In: Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections, Woo P.T.K. & Bruno D., eds. CAB International, Oxfordshire, UK, 143–165.

RIVAS-ARAVENA A., VALLEJOS-VIDAL E., MARTIN M.C., REYES-LOPEZ F., TELLO M., MORA P., SANDINO A.M., SPENCER E. (2011). Inhibitory effect of a nucleotide analog on ISAV infection. *J. Virol.*, **85**, 8037–8045.

SANDVIK T., RIMSTAD E. & MJAALAND S. (2000). The viral mRNA transcription and the structure of the 3'- and 5'-ends of viral RNA of infectious salmon anaemia virus resemble that of influenza viruses. *Arch. Virol.*, **145**, 1659–1669.

SMAIL D.A. & GRANT R. (2012). The stability of infectious salmon anaemia virus infectivity at –80°C in tissue homogenate and dry-stored tissue from clinically diseased Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.*, **35**, 789–792. doi.org/10.1111/j.1365-2761.2012.01402.x

SNOW M., MCKAY P., McBEATH A. J. A., BLACK J., DOIG F., KERR R., CUNNINGHAM C. O., NYLUND A. & DEVOLD M. (2006). Development, application and validation of a taqman® real-time RT-PCR assay for the detection of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in Atlantic salmon (*Salmo salar*), Vannier P. & Espeseth D., eds. *New Diagnostic Technology: Applications in Animal Health and Biologics Controls*. Dev. Biol., Basel, Karger. **126**, 133–145.

THORUD K.E. & DJUPVIK H.O. (1988). Infectious salmon anaemia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **8**, 109–111.

THUKRAL V., VARSHNEY B., RAMLY R., PONIA S., KARJEE S., OLSEN C., BANERJEA A., MUKHERJEE S., ZAIDI R., RIMSTAD E. & LAL S.K. (2018). s8ORF2 protein of ISAV is an RNAi Suppressor and interacts with SsMov10 of host RNAi machinery. *Virus Genes*, **54**, 199–214 doi: 10.1007/s11262-017-1526-z

TORO-ASCUY D., TAMBLEY C., BELTRAN C., MASCAYANO C., SANDOVAL N., OLIVARES E., MEDINA R.A., SPENCER E. & CORTEZ-SAN MARTÍN M. (2015). Development of a reverse genetic system for infectious salmon anemia virus: rescue of recombinant fluorescent virus by using salmon internal transcribed spacer region 1 as a novel promoter. *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 1210–1224. <https://doi.org/10.1128/AEM.03153-14>.

TOTLAND G.K., HJELTNES B. & FLOOD P.R. (1996). Transmission of infectious salmon anaemia (ISA) through natural secretions and excretions from infected smolts of Atlantic salmon *Salmo salar* during their presymptomatic phase. *Dis. Aquat. Org.*, **26**, 25–31.

VIKE S., OELCKERS K., DUESUND H., ERGA S.R., GONZALEZ J., HAMRE B., FRETTE O. & NYLUND A. (2014). Infectious salmon anemia (ISA) virus: infectivity in seawater under different physical conditions. *J. Aquat. Anim. Health*, **26**, 33–42. doi: 10.1080/08997659.2013.864720.

*
* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la infección por el virus de la anemia infecciosa del salmón (puede consultarse la página web de la OIE:

<https://www.woah.org/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>).

Para más información sobre la anemia infecciosa del salmón, por favor contactar con los Laboratorios de Referencia de la OIE.

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1995 COMO ANEMIA INFECCIOSA DEL SALMÓN.
ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2022.