

INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA ANEMIA INFECCIOSA DEL SALMÓN CON SUPRESIÓN DE HPR O HPR0

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 HPR0 (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 es 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 HPR0 nunca 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 HPR0 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 HPR0 (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

El VAIS es un virus con envoltura, de 100–130 nm de diámetro, con un genoma formado por ocho segmentos de ARN monocatenario con polaridad negativa (Dannevig *et al.*, 1995). El virus tiene actividad hemaglutinante, destructora de receptores y de fusión (Falk *et al.*, 1997; Mjaaland *et al.*, 1997; Rimstad *et al.*, 2011).

Las propiedades morfológicas, fisicoquímicas y genéticas del VAIS coinciden con las de los *Orthomyxoviridae* y se ha clasificado al VAIS como la especie tipo del nuevo género *Isavirus* (Kawaoka *et al.*, 2005) dentro de esta familia de virus. Se ha descrito la secuencia de nucleótidos de cada uno de los ocho segmentos genómicos, 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). Se han identificado cuatro proteínas estructurales principales, incluyendo una nucleoproteína de 68 kDa, una proteína de la matriz de 22 kDa, una hemaglutinina-esterasa (HE) de 42 kDa responsable de la unión a receptor y de la actividad destructora de receptor, y una glucoproteína de superficie de 50 kDa con capacidad potencial de adsorción (F), que están codificadas en los segmentos genómicos 3, 8, 6, y 5, respectivamente. Los segmentos 1, 2 y 4 codifican las polimerasas víricas PB2, PB1 y PA. Los dos segmentos genómicos más pequeños, el 7 y el 8, contienen cada uno dos marcos abiertos de lectura (ORF). El ORF1 del segmento 7 codifica una proteína con propiedades de antagonización del interferón tipo I, mientras que se ha sugerido que el ORF2 codifica una proteína nuclear de exportación (NEP). Todavía no está claro si el producto del gen del ORF1 es un componente no estructural o estructural del virión. El ORF1 más pequeño del segmento 8 codifica la proteína de la matriz, mientras que el ORF2 más grande codifica una proteína estructural de unión al ARN que también tiene propiedades de antagonización del interferón tipo I.

El análisis de la secuencia de distintos segmentos de genes ha puesto de manifiesto diferencias entre cepas tanto dentro como entre zonas geográficas definidas. Se han definido dos grupos en función de diferencias obtenidas en una secuencia parcial del segmento 6: uno se ha designado clado europeo, y el otro, clado norteamericano (Gagné & LeBlanc, 2017). 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 (HPR0) 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 HPR0 no patógeno tanto en salmón del Atlántico salvaje como en el de piscifactoría, ambos aparentemente sanos, pero no se ha detectado en peces con enfermedad clínica ni con signos anatomopatológicos compatibles con una infección por VAIS con supresión de HPR (Christiansen *et al.*, 2011; Cunningham *et al.*, 2002; Lyngstad *et al.*, 2012; Markussen *et al.*, 2008; McBeath *et al.*, 2009; Nylund *et al.*, 2007). Se ha observado una infección mixta por variantes de VAIS con supresión de HPR por variantes de VAIS HRP0 (Cardenas *et al.*, 2014; Kibenge *et al.*, 2009). En estudios recientes se ha observado que las variantes de VAIS HPR0 son frecuentes en el salmón del Atlántico criado en el mar. El VAIS HPR0 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 HPR0 con un posterior brote clínico de AIS. De hecho, el riesgo de que surjan variantes patógenas del VAIS a partir de un reservorio de HPR0 se considera bajo (Christiansen *et al.*, 2011). Hasta la fecha no se han hallado pruebas directas de relación entre la presencia del VAIS HPR0 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 HPR0 se considera bajo pero no insignificante (Cardenas *et al.*, 2014; Christiansen *et al.*, 2011; 2017; EFSA, 2012; Lyngstad *et al.*, 2012).

Además de las variaciones observadas en la HPR del gen HE, otros segmentos génicos podrían ser 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). 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 fuera del hospedador

Se ha detectado VAIS mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) en agua de mar muestreada en lugares de cría con salmones del Atlántico positivos al VAIS (Kibenge *et al.*, 2004). Es difícil realizar una estimación exacta del tiempo que el virus puede permanecer infeccioso en el medio natural, por varios motivos, como la presencia de partículas o sustancias que podrían ligar o inactivar el virus. La exposición de VAIS propagado en cultivo celular a 15°C durante 10 días o a 4°C durante 14 días no ejerció ningún efecto en la infectividad del virus (Falk *et al.*, 1997).

2.1.3. Estabilidad del agente (métodos eficaces de inactivación)

El VAIS es sensible a la radiación UV (UVC) y al ozono. Se obtuvo una reducción de 3 niveles logarítmicos en la infectividad en agua dulce estéril y en agua de mar con una dosis de UVC de alrededor de 35 Jm⁻² y 50 Jm⁻², respectivamente, mientras que el correspondiente valor para el VAIS en aguas residuales de una planta de procesamiento de peces fue de unos 72 Jm⁻². El agua de mar ozonizada (4 minutos con 8 mg/ml, 600–750 mV de potencial redox) podría inactivar el VAIS por completo. La incubación de homogenado de tejido procedente de peces enfermos de AIS a pH 4 o pH 12 durante 24 horas inactivó el VAIS. La incubación en presencia de cloro (100 mg/ml) 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).

2.1.4. Ciclo de vida

Es probable que la principal vía de transmisión sean las branquias, tanto en el caso del VAIS HPR0 como en caso del VAIS con supresión de HPR, pero no puede excluirse la infección por el intestino o la piel. El VAIS con supresión de HPR se ha utilizado en los estudios indicados anteriormente. Las células endoteliales que revisten internamente los vasos sanguíneos parecen ser las células diana principales del VAIS, como se ha comprobado mediante inmunohistoquímica con microscopía electrónica y mediante hibridación *in situ*. También se ha demostrado replicación del virus en leucocitos y en macrófagos sinusoidales a partir de resultados positivos para el VAIS en tinción de tejido renal en la que se ha empleado inmunohistoquímica (IHC). Dado que las células endoteliales son las células diana (véase el apartado 2.2.4), el virus puede replicarse en cualquier órgano (Aamelfot *et al.*, 2012; Rimstad *et al.*, 2011).

La molécula hemaglutinina-esterasa (HE) del VAIS, como ocurre con la hemaglutinina (HA) de otros ortomixovirus (virus de la influenza A, B y C), es fundamental para que el virus se una a residuos de ácido siálico de la superficie celular. En el caso del VAIS, la partícula vírica se une a receptores de glucoproteína que contienen residuos de ácido siálico 4-O-acetilados, los cuales también funcionan

como sustrato para la enzima destructora de receptor. Las posteriores captación y replicación parecen seguir la vía que se ha descrito para los virus de la influenza A, teniendo en cuenta que se ha comprobado una fusión dependiente de un pH bajo, inhibición de la replicación mediante actinomicina D y α -amanitina, acumulación temprana de nucleoproteína seguida de proteína matriz en el núcleo y gemación de viriones progenie desde la superficie celular (Cottet *et al.*, 2011; Rimstad *et al.*, 2011).

La excreción del VAIS de peces infectados puede tener lugar por las excreciones/secreciones naturales.

El VAIS HPR0 no se ha aislado en cultivo celular, lo cual obstaculiza los estudios *in vivo* e *in vitro* de las características y del ciclo de vida de esta variante del virus.

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 Acuáticos (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 PCR específica de agente patógeno en los siguientes organismos, aunque no se ha demostrado infección activa: salmón del Pacífico (*Oncorhynchus kisutch*).

2.2.3. Fases susceptibles de la vida del hospedador

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 solo 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. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

Por lo que se sabe, el VAIS con supresión de HPR solo causa enfermedad clínica en el salmón del Atlántico.

2.2.5. Órganos diana y tejidos infectados

En el caso de los peces que han desarrollado VAIS con supresión de HPR, resultan infectadas células endoteliales de todos los órganos (branquias, corazón, hígado, riñón, bazo y otros) (Aamelfot *et al.*, 2012). El VAIS HPR0 parece tener por diana principalmente células epiteliales de las branquias (Aamelfot *et al.*, 2016), pero también se ha detectado en el riñón y en el corazón (Christiansen *et al.*, 2011; Lyngstad *et al.*, 2011).

2.2.6. Infección persistente

En salmón del Atlántico no se ha documentado infección persistente en portadores de por vida, pero a nivel de piscifactoría la infección puede persistir en la población mediante la infección continua de nuevos peces que no desarrollan signos clínicos de la enfermedad. Esto puede incluir infección con las variantes del genotipo HPR0, que parece ser de naturaleza meramente transitoria (Christiansen *et al.*, 2011; Lyngstad *et al.*, 2011). La infección experimental de la trucha arco iris y la trucha marina con VAIS indica que en estas especies podría tener lugar una infección persistente (Rimstad *et al.*, 2011).

2.2.7. Vectores

Se ha observado transmisión del VAIS por los piojos del salmón (*Lepeophtheirus salmonis* y *Caligus rogercresseyi*) (Oelkers *et al.*, 2014). Aunque no se han identificado vectores naturales, otros varios grupos de vectores podrían ser posibles vectores en ciertas condiciones definidas (Rimstad *et al.*, 2011).

2.2.8. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

Tanto el salmón del Atlántico como la trucha común salvajes pueden ser portadores del VAIS (Rimstad *et al.*, 2011). La importancia de los peces marinos (véase el apartado 2.2.1) como portadores del virus debe aclararse. Los resultados de un estudio de las Islas Faroe indica la posible presencia de un reservorio marino desconocido para este virus (Christiansen *et al.*, 2011).

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mecanismos de transmisión

Según estudios de epidemias recurrentes de infección por el VAIS con supresión de HPR en distintas zonas de producción de salmón se llega a la conclusión de que el virus se extiende localmente entre lugares adyacentes. La proximidad a lugares con brotes de la enfermedad conlleva un riesgo muy importante, y el riesgo de una piscifactoría susceptible aumenta cuanto más cerca se encuentra de una piscifactoría infectada. El análisis de la secuencia del VAIS de brotes de Noruega ha mostrado un alto grado de similitud entre virus aislados de lugares cercanos afectados, lo cual respalda aun más la hipótesis de la transmisión del VAIS entre lugares cercanos. El riesgo de transmisión del VAIS depende del nivel de las medidas de bioseguridad de la zona. Las vías de transmisión del VAIS sugeridas son el agua de mar, el envío de peces vivos, la transmisión por piojos de mar, y por los salmónidos salvajes infectados (Aldrin *et al.*; 2011; Gustafson *et al.*; 2007; Lyngstad *et al.*; Mardones *et al.*, 2011; 2011; Rimstad *et al.*, 2011).

Muchos brotes de enfermedad clínica causados por VAIS con supresión de HPR de Noruega parecen estar aislados en el espacio y en el tiempo de otros brotes con fuentes desconocidas de infección (Aldrin *et al.*, 2011). Una de las hipótesis sugeridas es que podría haber una transición ocasional de VAIS HPR0 en VAIS con supresión de HPR HPR delecionada, que causara brotes aislados o epidemias locales mediante transmisión local (Lyngstad *et al.* 2011). El riesgo de aparición del VAIS con supresión de HPR a partir de un VAIS HPR0 se considera bajo pero no insignificante (EFSA, 2012). Todavía no se ha demostrado la existencia de una relación entre VAIS HPR0 y variantes con supresión de HPR (Cardenas *et al.*, 2014; Gagné & Leblanc, 2017).

Dado que también se ha notificado infección por VAIS en lugares de producción de esguines con salmón del Atlántico, no puede excluirse la transmisión del VAIS de progenitores a descendencia. Aunque no existen pruebas de una verdadera transmisión vertical, los huevos y los embriones podrían suponer un riesgo de transmisión si no se aplican suficientes medidas de bioseguridad (Mardones *et al.*, 2014; Rimstad *et al.*, 2011).

2.3.2. Prevalencia

En jaulas de red que contengan peces enfermos, la prevalencia de VAIS con supresión de HPR puede variar mucho, mientras que en jaulas de red adyacentes (sin peces enfermos) el VAIS puede ser difícil de detectar, incluso mediante los métodos más sensibles. Por tanto, en los estudios de diagnóstico es importante muestrear de compartimientos de red que contengan peces enfermos.

Cada vez hay más pruebas de que la prevalencia de variantes del VAIS HPR0 podría ser alta en zonas de producción de salmón del Atlántico. El VAIS HPR0 en el salmón del Atlántico parece ser estacional y transitorio (Christiansen *et al.*, 2011). También se ha detectado VAIS HPR0 en salmónidos salvajes (Rimstad *et al.*, 2011).

2.3.3. Distribución geográfica

Notificado por primera vez en Noruega a mediados de los años 1980 (Thorud y Djupvik, 1988), la infección por VAIS se ha notificado desde entonces en salmón del Atlántico de Canadá (New Brunswick en 1996), el Reino Unido (Escocia en 1998), las islas Faroe (2000), EE.UU. (Maine en 2001) y en Chile (2007) (Cottet *et al.*, 2010; Rimstad *et al.*, 2011). En todos los países en que ha tenido lugar infección por VAIS con supresión de HPR se ha documentado la presencia de la variante HPR0, con la excepción de Islandia.

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

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. 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. En los brotes en los que se han infectado esguines en barcos durante el transporte, pueden tener lugar brotes simultáneos.

El VAIS HPR0 no se ha asociado a enfermedad clínica en salmón del Atlántico.

2.3.5. Factores ambientales

En general, los brotes de infección por el VAIS con supresión tienden a ser estacionales, y la mayoría tiene lugar a finales de primavera y a finales de otoño; no obstante, pueden aparecer en cualquier momento del año. La manipulación de peces (como la clasificación o el tratamiento, el tronchado o el movimiento de jaulas) puede iniciar brotes de enfermedad en piscifactorías infectadas, sobre todo si con anterioridad han tenido lugar problemas crónicos no diagnosticados (Lyngstad *et al.*, 2008).

2.4. Control y prevención

2.4.1. Vacunación

La vacunación contra la infección por el VAIS se ha llevado a cabo en Norteamérica desde 1999 y en las islas Faroe desde 2005. En Noruega, la vacunación contra la infección por el VAIS se llevó a cabo por primera vez en 2009 en una zona con una alta frecuencia de brotes de infección por el VAIS con supresión de HPR. Chile empezó la vacunación contra la infección por el VAIS en 2010.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

El fármaco antivírico de amplio espectro ribavirina (1-β-D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-carboxamida) es eficaz para inhibir la replicación del VAIS tanto *in vitro* como *in vivo* (Rivas-Aravena *et al.*, 2011).

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).

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

No es aplicable

2.4.6. Agentes bloqueantes

No son aplicables.

2.4.7. 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*).

2.4.8. 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 experiencia de las Islas Faroe, donde la prevalencia de VAIS HPR0 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.

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

Para la detección del VAIS con supresión de HPR, deben obtenerse ejemplares que presenten signos clínicos o lesiones anatomopatológicas macroscópicas.

Para la detección del VAIS HPR0, deben obtenerse ejemplares elegidos aleatoriamente en distintos momentos a lo largo de todo el ciclo de producción.

3.2. Conservación de las muestras para su envío

Hematología:	Heparina o EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)
Cultivo celular:	Medio de transporte para virus
Histología e inmunohistoquímica:	Fijación en formalina neutra al 10% tamponada con fosfato
Inmunofluorescencia (frotis):	Se envían secados, o secados y fijados en acetona al 10%
Biología molecular (RT-PCR y secuenciación):	Medio adecuado para la conservación del ARN

3.3. Combinación de varias muestras

La combinación de varias muestras puede ser aceptable, pero debe tenerse en cuenta la influencia en la sensibilidad y el diseño de prevalencia.

3.4. Órganos y tejidos de elección

3.4.1. Detección del VAIS con supresión de HPR

La sangre es la muestra de elección para el muestreo no letal. Para las pruebas de diagnóstico deben utilizarse órganos internos que no hayan estado expuestos al medio.

Examen virológico (cultivo celular y PCR en tiempo real o convencional): corazón (siempre se debe incluir) y riñón medio.

Histología (priorizada): riñón medio, hígado, corazón, páncreas/intestino, bazo;

Inmunofluorescencia (frotis): riñón medio;

Inmunohistoquímica: riñón medio, corazón (incluyendo las válvulas y el bulbo arterioso).

3.4.2. Detección del VAIS HPR0

Tejido de branquias.

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

Ninguno conocido.

4. Métodos de diagnóstico

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

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.

4.2. Evaluación anatomopatológica

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

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.

- Líquido amarillento o sanguinolento en las cavidades peritoneal y pericárdica.
- Edema en la vejiga natatoria.
- Pequeñas hemorragias del peritoneo visceral y parietal.
- Hígado focal o difusamente rojo oscuro. En la superficie puede haber una fina capa de fibrina.
- Bazo hinchado y de color rojo oscuro con márgenes redondeados.
- 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.
- Riñón hinchado y de color rojo oscuro con sangre y líquido saliendo de las superficies de los cortes.
- Hemorragias puntuales del músculo esquelético.

4.2.2. Bioquímica clínica

- Hematocrito <10 en casos terminales (a menudo se observa 25–30 en casos menos avanzados). En los casos de salmón del Atlántico criado en agua de mar con un hematocrito <10 siempre deben realizarse pruebas para descartar la infección por el VAIS con supresión de HPR.
- Frotis de sangre con eritrocitos degenerados y vacuolizados y la presencia de eritroblastos con forma nuclear irregular. Los recuentos diferenciales presentan una reducción de la proporción de leucocitos respecto a los eritrocitos, en la cual la principal reducción es la de linfocitos y trombocitos.

La hepatopatía conllevará un aumento de las concentraciones de enzimas hepáticas en la sangre.

4.2.3. Anatomopatología microscópica

Las alteraciones histológicas en salmón del Atlántico clínicamente enfermo son variables, pero pueden consistir en las siguientes:

- Gran cantidad de eritrocitos en el seno venoso central y capilares de las lamelas, donde también se forman trombos de eritrocitos en las branquias.
- Hemorragias multifocales a confluentes y/o necrosis de hepatocitos a cierta distancia de vasos más grandes del hígado. Acumulaciones focales de eritrocitos en sinusoides hepáticos dilatados.
- Acumulación de eritrocitos en vasos sanguíneos de la lámina propia intestinal y finalmente hemorragia hacia el interior de la lámina propia.
- Estroma esplénico distendido por acumulación de eritrocitos.
- Ligera hemorragia intersticial difusa multifocal a extensa con necrosis tubular en las zonas hemorrágicas, acumulación de eritrocitos en los glomérulos renales.
- Eritrofagocitosis en el bazo y hemorragias secundarias en el hígado y el riñón.

4.2.4. Preparaciones húmedas

No son aplicables.

4.2.5. Frotis

Véase el apartado 4.3.1.1.2.

4.2.6 Cortes fijados

Véase el apartado 4.3.1.1.3.

4.2.7. Microscopía electrónica/citopatología

Se ha observado virus en células endoteliales y leucocitos mediante microscopía electrónica de preparaciones de tejido, pero este método no se ha utilizado con fines de diagnóstico.

4.3. Métodos de detección e identificación del agente

4.3.1. Métodos directos de detección

A excepción de las técnicas moleculares (véase el apartado 4.3.1.2.3), estos métodos directos de detección solo se recomiendan para peces con signos clínicos de infección por VAIS con supresión de HPR.

4.3.1.1. Métodos microscópicos

4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

No son aplicables.

4.3.1.1.2. Frotis

4.3.1.1.2.1 Prueba de inmunofluorescencia indirecta

Una prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFAT) en la que se han utilizado anticuerpos monoclonales (MAbs) validados contra la hemaglutinina-esterasa (HE) del VAIS en frotis (por impronta) de riñón o en cortes de tejido congelado de riñón, corazón o hígado ha dado reacciones positivas en salmón del Atlántico infectado tanto experimentalmente como de forma natural. Los casos sospechosos (véase el apartado 7.1) se pueden confirmar con una IFAT positiva.

i) Preparaciones de frotis (por impronta) de tejidos

Se seca brevemente un trozo pequeño del riñón medio con papel absorbente para eliminar el exceso de líquido, y varias improntas en una zona del tamaño de la uña del dedo pulgar se fijan sobre portaobjetos recubiertos de poli-L-lisina. Las improntas se secan al aire, se fijan en acetona fría al 100% 10 minutos y se guardan a 4°C si son solos unos días o a -80°C hasta que se utilicen.

ii) Procedimiento de la tinción

Tras bloquear con leche desnatada en polvo al 5% con solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 30 minutos, las preparaciones se incuban 1 hora con una dilución adecuada de MAb anti-VAIS, y a continuación se lavan tres veces. Para la detección de anticuerpos unidos, las preparaciones se incuban con anticuerpos anti-Ig de ratón conjugados con isotiocianato de fluoresceína (ITCF) durante 1 hora. Para el lavado se utiliza PBS con Tween 20 al 0,1%. Todas las incubaciones se realizan a temperatura ambiente.

4.3.1.1.3. Cortes fijados

4.3.1.1.3.1 Inmunohistoquímica (IHC)

Se utiliza nucleoproteína de anticuerpos policlonales contra el VAIS con supresión de HPR en cortes incluidos en parafina de tejido fijado en formalina. Esta tinción mediante IHC ha dado reacciones positivas en salmón del Atlántico infectado tanto experimentalmente como de forma natural. Los órganos de elección son el riñón medio y el corazón (la zona de transición incluidas las tres cámaras y válvulas). Los casos sospechosos por signos anatomopatológicos se verifican con una IHC positiva. Los cortes histológicos se preparan según los métodos estándar.

i) Preparación de cortes histológicos

Los tejidos se fijan en formalina neutra al 10% tamponada con fosfato durante al menos 1 día, se deshidratan en diluciones seriadas de etanol, se aclaran en xileno y se incluyen en parafina, según los protocolos estándar. Se calientan cortes de unos 5 µm de espesor (para la IHC se colocan sobre portas recubiertos de poli-L-lisina) a 56–58°C (máximo de 60°C) durante 20 minutos, se desparafinan en xileno, se rehidratan pasándolos por diluciones seriadas de etanol, y se tiñen con hematoxilina y eosina para la observar las lesiones anatomopatológicas y la IHC según se describe a continuación.

ii) *Procedimiento de tinción para IHC*

Todas las incubaciones se llevan a cabo a temperatura ambiente sobre una plataforma oscilante, a no ser que se indique lo contrario:

- a) La recuperación del antígeno se realiza hirviendo los cortes en tampón citrato 0,1 M pH 6,0 durante 2 x 6 minutos y bloqueándolos a continuación con una dilución de leche en polvo desnatada al 5% y un 2% de suero de cabra en TBS 50 mM (TBS; Tris/HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6) durante 20 minutos.
- b) A continuación, se incuban los cortes toda la noche con anticuerpo primario (anticuerpo de conejo mono específico contra la nucleoproteína del VAIS) diluido con un 1% de leche en polvo desnatada, y después se lavan tres veces con TBS con Tween 20 al 0,1%.
- c) Para la detección de anticuerpos unidos, los cortes se incuban con anticuerpos anti IgG de conejo conjugados con fosfatasa alcalina durante 60 minutos. Tras un lavado final, se añade Fast Red (1 mg/ml) y Naphtol AS-MX fosfato (0,2 mg/ml) con Levamisole 1 mM en TBS 0,1 M (pH 8,2) para el revelado durante 20 minutos. Después, los cortes se lavan en agua de grifo antes de aplicar la tinción de contraste con hematoxilina de Harris y se montan en medio de montaje acuoso. Se incluyen cortes de tejido positivos y negativos al VAIS como controles en cada realización.

iii) *Interpretación*

Los cortes control negativos no deben presentar ninguna reacción de color importante. Los cortes control positivos deben presentar una clara y visible tinción roja citoplasmática e intranuclear de las células endoteliales en los vasos sanguíneos o el endocardio del corazón. Un corte problema solo debe considerarse positivo si se observa una clara tinción roja intranuclear en las células endoteliales. La localización intranuclear es propia de la nucleoproteína del ortomixovirus durante una fase de la replicación del virus. A menudo domina una tinción citoplasmática simultánea. Las tinciones citoplasmáticas y otros patrones de tinción sin localización intranuclear deben considerarse inespecíficos o inconcluyentes.

Las reacciones de tinción positivas más fuertes se suelen obtener en células endoteliales del corazón y el riñón. Las reacciones de tinción endotelial en el interior de lesiones hemorrágicas muy extensas pueden ser ligeras o estar ausentes, posiblemente debido a una lisis de las células endoteliales infectadas.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

4.3.1.2.1. Cultivo celular

Las células ASK (Devold *et al.*, 2000) se recomiendan para el aislamiento primario del VAIS con supresión de HPR, pero también pueden usarse otras líneas celulares susceptibles, como SHK-1 (Dannevig *et al.*, 1995), aunque debe tenerse en cuenta la variabilidad de la cepa y la capacidad de replicación en distintas líneas celulares. Estas células parecen permitir el aislamiento y el crecimiento de las cepas víricas conocidas hasta ahora. En células ASK puede aparecer un efecto citopático (ECP) más característico. Tanto la línea celular SHK-1 como la SK parecen perder susceptibilidad al VAIS con supresión de HPR a medida que aumenta el número de pases.

Las células SHK-1 y ASK se cultivan a 20°C en medio de cultivo celular L15 de Leibovitz suplementado con suero fetal bovino (al 5% o 10%), L-glutamina (4 mM), gentamicina (50 µg ml⁻¹) y 2-mercaptoetanol (40 µM) (este último se puede omitir).

Para el aislamiento del virus se pueden utilizar células cultivadas en frascos de cultivo de tejido de 25 cm² o en placas de cultivo celular multipocillo, que pueden sellarse con plástico autosellante o con un sellador de placas para estabilizar el pH del medio. Las células cultivadas en placas de 24 pocillos pueden no crecer demasiado bien en monocapas, pero este rasgo puede variar entre laboratorios según el tipo de placas de cultivo celular utilizadas. Deben inocularse diluciones seriadas de controles positivos del VAIS con supresión de HPR al mismo tiempo que las muestras de tejido, como prueba de susceptibilidad de las células al VAIS (esto debe realizarse en un lugar distinto del que se utilice para las muestras problema).

i) *Inoculación de monocapas celulares*

Se prepara una suspensión al 2% de homogenado de tejido utilizando medio L-15 sin suero u otro medio de probada idoneidad. Se retira el medio de crecimiento de las monocapas en crecimiento activo (cultivos de 1–3 días de edad o con un 70–80% de confluencia) cultivadas en frascos de cultivo de tejido de 25 cm² o en placas de cultivo celular multipocillo (véase arriba). Se inoculan las monocapas (frascos de cultivo tisular de 25 cm²) con 1,5 ml del homogenado de tejido. Se ajusta el volumen a la respectiva superficie utilizada. Se dejan

incubar 3 a 4 horas a 15°C y después se retira el inóculo y se añade medio de crecimiento L-15 fresco suplementado con FCS al 2–5%. Como alternativa puede utilizarse una dilución a 1/1000 e inoculación directa sin sustitución del medio.

Cuando las muestras de peces proceden de lugares de producción en los que el virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI) se considera endémico, el sobrenadante del homogenado tisular debe incubarse (durante un mínimo de 1 hora a 15°C) con un conjunto de antisueros contra los serotipos enzoóticos del VNPI antes de la inoculación para neutralizar los VNHI que pueda haber.

ii) Seguimiento de la incubación

A intervalos periódicos (al menos cada 7 días) se comprueba si los cultivos celulares inoculados (mantenidos a 15°C) presentan ECP. El ECP característico del VAIS con supresión de HPR es la presencia de células vacuolizadas que a continuación se redondean y se desprenden de la superficie del cultivo. Si aparece un ECP compatible con el descrito para el VAIS con supresión de HPR o el VNPI, debe recogerse una alícuota del medio para la identificación del virus, como se describe abajo. En el caso de una infección por el VNPI, se reinoculan células con sobrenadante de homogenado tisular que haya sido incubado con una dilución menor de antisueros anti VNPI. Si no ha aparecido ECP pasados 14 días, se subcultiva en cultivos celulares frescos.

iii) Procedimiento del subcultivo

Se recogen alícuotas de medio (sobrenadante) de los cultivos primarios 14 días (o antes, si aparece ECP obvio) después de la inoculación. A efectos de vigilancia, se pueden combinar sobrenadantes de pocillos inoculados con distintas diluciones de muestras idénticas.

Se inoculan sobrenadantes en cultivos celulares frescos como se ha descrito para la inoculación primaria: se retira el medio de cultivo, se inoculan monocapas con un pequeño volumen de sobrenadante diluido (1/5 y diluciones más altas) durante 3–4 horas antes de añadir el medio fresco. Como alternativa, se pueden añadir sobrenadantes (diluciones finales de 1/10 o superiores) directamente a los cultivos celulares con medio de cultivo.

Los cultivos celulares inoculados se incuban durante al menos 14 días y se examinan a intervalos periódicos, como se ha descrito para la inoculación primaria. Al final del periodo de incubación, o antes si aparece ECP obvio, el medio se recoge para la identificación del virus, como se describe abajo. En los cultivos celulares sin ECP siempre debe comprobarse si hay VAIS con supresión de HPR mediante inmunofluorescencia (IFAT), hemadsorción o PCR, puesto que puede producirse replicación del virus sin que se observe ECP.

El procedimiento descrito abajo ha resultado útil para el aislamiento del VAIS con supresión de HPR a partir de peces con signos clínicos o de casos sospechosos. Hasta ahora no se ha aislado VAIS HPR0 en cultivos celulares.

4.3.1.2.2. Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos

4.3.1.2.2.1 Identificación del virus mediante IFAT

Todas las incubaciones se llevan a cabo a temperatura ambiente a no ser que se indique lo contrario.

- i) Se preparan monocapas de células en placas de cultivo tisular adecuadas (por ejemplo, placas de 96 o de 24 pocillos), en frascos portaobjetos o en cubreobjetos en función del tipo de microscopio del que se disponga (para las monocapas cultivadas sobre placas de cultivo tisular es necesario un microscopio invertido equipado con luz UV). Las células SHK-1 crecen bastante peor sobre cubreobjetos de vidrio. Deben incluirse las monocapas necesarias como controles negativos y positivos.
- ii) Se inoculan las monocapas con las suspensiones de virus a identificar en diluciones decimales, dos monocapas para cada dilución. Se añade un control de virus positivo en diluciones que se sepa que dan una buena reacción de tinción. Se incuban cultivos celulares inoculados a 15°C durante 7 días o, si aparece ECP, durante un periodo más corto.
- iii) Se fijan en acetona al 80% durante 20 minutos tras retirar el medio de cultivo celular y lavarlos una vez con acetona al 80%. Se retira el fijador y se secan al aire durante 1 hora. Los cultivos celulares fijados pueden guardarse secos durante menos de 1 semana a 4°C o a –20°C durante periodos más largos.
- iv) Se incuban las monocapas celulares con MAb anti VAIS con supresión de HPR en una dilución adecuada en PBS durante 1 hora, y se lavan dos veces con PBS/Tween 20 al 0,05%.

Si se observa unión inespecífica, se incuban con PBS que contenga leche en polvo desnatada al 0,5%

- v) Se incuban durante 1 hora con anticuerpos de cabra anti Ig de ratón y conjugados con ITCF, (o, en el caso de anticuerpos generados en conejos como anticuerpo primario, se utilizarán anticuerpos anti Ig de conejo conjugados con ITCF), según las instrucciones del proveedor. Para aumentar la sensibilidad, los anticuerpos de cabra anti Ig de ratón conjugados con ITCF pueden sustituirse por anticuerpos anti Ig de ratón marcados con biotina y estreptavidina marcada con ITCF con el lavado descrito antes del paso adicional. Se lava una vez con PBS/Tween20 al 0,05%, como se ha descrito anteriormente. Los núcleos se pueden teñir con yoduro de propidio a una concentración de 100 µg ml⁻¹ en agua destilada estéril). Se añade PBS (sin Tween 20) y se examina con luz UV. Para evitar la decoloración, las placas teñidas deben guardarse en la oscuridad hasta que se examinen. Si es necesario guardarlas durante un largo periodo de tiempo (más de 2–3 semanas), puede añadirse una solución de 1,4-diazabicyclo octano (DABCO al 2,5% en PBS, pH 8,2) o un reactivo similar, como solución anti-decoloración.

4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

4.3.1.2.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR)

Los cebadores descritos abajo para la RT-PCR y la PCR en tiempo real detectarán tanto el VAIS con supresión de HPR europeo como el americano, y el VAIS HPR0.

La RT-PCR se puede utilizar para la detección del VAIS a partir de ARN total (o ácido nucleico total) extraído de los órganos/tejidos recomendados (véase el apartado 3.4). La RT-PCR en tiempo real para la detección del VAIS se recomienda porque aumenta la especificidad y, probablemente, también la sensibilidad de la prueba. Aunque se han notificado varios conjuntos de cebadores para la RT-PCR en tiempo real de detección del VAIS, los conjuntos de cebadores recomendados son los que se indican en la tabla. Los conjuntos de cebadores derivados de los segmentos genómicos 8 y 7 se han utilizado en varios laboratorios y se ha observado que resultan útiles para la detección del VAIS durante brotes de la enfermedad y en peces portadores aparentemente sanos.

Con la aparición generalizada de variantes del VAIS HPR0, es fundamental realizar un seguimiento de los resultados positivos en la PCR basada en conjuntos de cebadores del segmento 7 u 8 mediante secuenciación de la HPR del segmento 6 para determinar si la cepa es de VAIS con supresión de HPR, HPR0 o de ambos. En la siguiente tabla se indican los cebadores adecuados, diseñados y validados por el Laboratorio de Referencia de la OIE. La validación del conjunto de cebadores del HPR para las cepas aisladas en Norteamérica HPR0 presenta la limitación de que en el Genbank se dispone de pocos datos relativos al extremo 3' del segmento 6 del VAIS.

Los cebadores de los segmentos 7 y 8, así como los cebadores de secuenciación del segmento 6 HPR se indican a continuación y también pueden utilizarse para un RT-PCR convencional en caso necesario.

RT-PCR en tiempo real y convencional: Secuencias del cebador y de la sonda	Denominación	Segmento genómico	Tamaño del producto	Referencia
5'-CAG-GGT-TGT-ATC-CAT-GGT-TGA-AAT-G-3' 5'-GTC-CAG-CCC-TAA-GCT-CAA-CTC-3' 5'-6FAM-CTC-TCT-CAT-TGT-GAT-CCC-MGBNFQ-3'	Debador directo Cebador inverso Taqman@probe	7	155 nt	Snow <i>et al.</i> , 2006
5'-CTA-CAC-AGC-AGG-ATG-CAG-ATG-T-3' 5'-CAG-GAT-GCC-GGA-AGT-CGA-T-3' 5'-6FAM-CAT-CGT-CGC-TGC-AGT-TC-MGBNFQ-3'	Debador directo Cebador inverso Taqman@probe	8	104 nt	Snow <i>et al.</i> , 2006
5'-GAC-CAG-ACA-AGC-TTA-GGT-AAC-ACA-GA-3' 5'-GAT-GGT-GGA-ATT-CTA-CCT-CTA-GAC-TTG-TA-3'	Debador directo Cebador inverso	6 (HPR)	304 nt if HPR0	Designed by OIE Ref. Lab.

4.3.1.2.4. Purificación del agente

El VAIS propagado en cultivo celular puede purificarse mediante centrifugación con gradiente de sacarosa (Falk *et al.*, 1997) o mediante purificación por afinidad utilizando perlas inmunomagnéticas recubiertas con MAb anti VAIS.

4.3.2. Métodos serológicos

Ninguno publicado ni validado.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

Los métodos actualmente disponibles para la vigilancia dirigida de la infección por el VAIS con supresión de HPR y para el diagnóstico de infección por el VAIS con supresión de HPR se detallan en la Tabla 5.1. Para la vigilancia del VAIS HPR0, una RT-PCR en tiempo real seguida de una RT-PCR convencional y de secuenciación son los únicos métodos recomendados (no se incluyen en la tabla). Las denominaciones utilizadas en la Tabla indican: a = el método es el recomendado por razones de disponibilidad, utilidad y especificidad y sensibilidad de diagnóstico; b = el método es estándar, con buena sensibilidad y especificidad de diagnóstico; c = el método tiene aplicación en algunas situaciones, pero el coste, la precisión u otros factores limitan seriamente su aplicación; y d = el método no se recomienda actualmente para este fin. Esta clasificación es de alguna forma subjetiva ya que la idoneidad implica cuestiones de fiabilidad, sensibilidad, especificidad y utilidad. Aunque no todas las pruebas incluidas en las categorías a o b se han sometido a estandarización y validación formales, su naturaleza sistemática y el hecho de que se hayan usado generalmente sin resultados dudosos las hace aceptables.

*Tabla 5.1. Métodos de vigilancia dirigida y diagnóstico**

Método	Vigilancia dirigida de la infección por el VAIS con supresión de HPR				Diagnóstico provisional de la AIS	Diagnóstico confirmativo de la AIS
	Alevines	Pintos	Esguines	Adultos		
Signos macroscópicos	d	d	d	d	c	b
Histopatología	d	d	d	d	b	b
IFAT en improntas de riñón	c	c	c	c	b	a
Inmunohistoquímica	c	c	c	c	b	a
Aislamiento en cultivo celular con identificación del virus	b	b	b	b	b	a
RT-PCR	c	c	c	c	b	c
RT-PCR en tiempo real	a	a	a	a	a	b
Secuenciación	d	d	d	d	d	a

*Dado que el diagnóstico de la infección por el VAIS con supresión de HPR no se basa en los resultados de una sola prueba, la información de esta Tabla debe utilizarse con cautela. En el apartado 7 se indican los criterios de diagnóstico de la infección por el VAIS con supresión de HPR.

IFAT = prueba de inmunofluorescencia indirecta; ME = microscopía electrónica;
RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa.

6. Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de infección por el VAIS

La prueba de vigilancia recomendada para la infección por el VAIS es la RT-PCR en tiempo real.

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

A continuación se indican motivos razonables de sospecha de que los peces estén infectados por el VAIS (con supresión de HPR o HPR0. Las autoridades competentes deben asegurarse de que, ante la sospecha de peces infectados por el VAIS en una piscifactoría, debe llevarse a cabo una investigación oficial para confirmar o descartar la presencia de la enfermedad cuanto antes, aplicando inspección y exploración física, así como obteniendo y escogiendo muestras y aplicando los métodos de examen de laboratorio descritos en el apartado 4.

7.1. Definición de caso sospechoso (HPR deletada)

Debe sospecharse de infección por el VAIS HPR0 o con supresión de HPR si se cumple el siguiente criterio:

- i) Resultado positivo en una RT-PCR convencional o en tiempo real

Además, debe sospecharse de infección por el VAIS con supresión de HPR si se cumple al menos uno de los siguientes criterios:

- i) Signos clínicos o alteraciones anatomopatológicas compatibles con la AIS;
- ii) ECP característico del VAIS en cultivos celulares;
- iii) Resultado positivo en la IFAT realizada con impresiones tisulares.

7.2. Definición de caso confirmado (VAIS con supresión de HPR)

Debe considerarse confirmada la presencia del VAIS si, además de los criterios del apartado 7.1, se cumple al menos uno de los siguientes:

- i) Aislamiento del VAIS en cultivo celular seguido de identificación del virus mediante una prueba basada en anticuerpos (IFAT) y/o una PCR convencional seguida de secuenciación del amplicón;
- ii) Detección del VAIS en cortes histológicos mediante inmunanálisis empleando anticuerpos anti VAIS específicos;
- iii) Detección del VAIS en preparaciones de tejidos mediante PCR convencional seguida de secuenciación del amplicón.

7.3. Definición de infección por el VAIS HPR0 confirmada

Para confirmar la infección por el VAIS HPR0 deben cumplirse los criterios del apartado i).

- i) Detección del VAIS por RT-PCR seguida de una amplificación y secuenciación de la región HPR del segmento 6 para confirmar la presencia de solo HPR0.

8. Bibliografía

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.

ALDRIN M., LYGSTAD T.M., KRISTOFFERSEN A.B., STORVIK B., BORGAN O. & JANSEN P.A. (2011). Modelling the spread of infectious salmon anaemia among salmon farms based on seaway distances between farms and genetic relationships between infectious salmon anaemia virus isolates. *J.R. Soc. Interface*, **8**, 1346–1356.

BIACCHESI S., LE BERRE M., LE GUILLOU S., BENMANSOUR A., BREMONT M., QUILLET E. & BOUDINOT P. (2007). Fish genotype significantly influences susceptibility of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), to waterborne infection with infectious salmon anaemia virus. *J. Fish Dis.*, **30**, 631–636.

CÁRDENAS 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.

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 HPR0 to a virulent HPR-deleted infectious salmon anaemia virus. *J. Gen. Virol.*, **98**, 595–606.

CHRISTIANSEN D.H., ØSTERGAARD P.S., SNOW M., DALE O.B & FALK K. (2011). A low-pathogenic variant of infectious salmon anemia virus (ISAV1 - HPR0) 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.

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** (11), 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.

GAGNÉ N. & LEBLANC F. (2017). Overview of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in Atlantic Canada and first report of an ISAV North American-HPR0 subtype. *J. Fish Dis.*, DOI: 10.1111/jfd.12670

GJØEN 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.

GUSTAFSON L.L., ELLIS S.K., BEATTIE M.J., CHANG B.D., DICKEY D.A., ROBINSON T.L., MARENGHI F.P., MOFFETT P.J. & PAGE F.H. (2007). Hydrographics and the timing of infectious salmon anemia outbreaks among Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) farms in the Quoddy region of Maine, USA and New Brunswick, Canada. *Prev. Vet. Med.*, **78**, 35–56.

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., GARATE O.N. JOHNSON G., ARRIAGADA K., KIBENGE M.J.T. & WADOWAKA D. (2001). Isolation and identification of infectious salmon anaemia virus (ISAV) from Coho salmon in Chile. *Dis. Aquat. Org.*, **45**, 9–18.

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. *Virol. 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.

KIBENGE F.S.B., MUNIR K., KIBENGE M.J.T., MONEKE T.J. & MONEKE E. (2004). Infectious salmon anemia virus: causative agent, pathogenesis and immunity. *Anim. Health Res. Rev.*, **5**, 65–78.

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. *Virol. J.*, **7**, 338.

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.
- LYNGSTAD T.M., KRISTOFFERSEN A. B., HJORTAAS M. J., DEVOLD, M., ASPEHAUG, V., LARSEN, R. B. & JANSEN, P. A. (2012). Low virulent infectious salmon anaemia virus (ISAV-HPR0) is prevalent and geographically structured in Norwegian salmon farming. *Dis. Aquat. Org.*, **101**, 197–206.
- MACLEAN S.A., BOUCHARD D.A. & ELLIS S.K. (2003). Survey of non-salmonid marine fishes for detection of infectious salmon anemia virus and other salmonid pathogens. *In: Technical Bulletin 1902. International Response to Infectious Salmon Anemia: Prevention, Control and Eradication*, Miller O. & Cipriano R.C., eds. USDA, APHIS; US Dept Interior, US Geological Survey; US Dept Commerce, National Marine Fisheries Service, Washington DC, USA, 135–143.
- MARDONES F.O., MARTINEZ-LOPEZ B., VALDES-DONOSO P., CARPENTER T.E. & PEREZ A.M. (2014). The role of fish movements and the spread of infectious salmon anemia virus (ISAV) in Chile, 2007–2009. *Prev. Vet. Med.*, **114**, 37–46.
- MARDONES F.O., PEREZ A.M., VALDES-DONOSO P. & CARPENTER T.E. (2011). Farm-level reproduction number during an epidemic of infectious salmon anaemia virus in southern Chile in 2007–2009. *Prev. Vet. Med.*, **102**, 175–184.
- 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. J., BAIN N. & SNOW M. (2009). Surveillance for infectious salmon anaemia virus HPR0 in marine Atlantic salmon farms across Scotland. *Dis. Aquat. Org.*, **87**, 161–169.
- 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.
- MULLINS J.E., GROMAN D.B & WADOWSKA D. (1998) Infectious salmon anaemia in salt water Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in New Brunswick, Canada. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **18**, 110–114.
- NYLUND A., PLARRE H., KARLSEN M., FRIDELL F., OTTEM K.F., BRATLAND A., & SAETHER P.A. (2007). Transmission of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in farmed populations of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Arch. Virol.*, **152**, 151–179.
- 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.
- PLARRE H., DEVOLD M., SNOW M. & NYLUND A. (2005). Prevalence of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in wild salmonids in western Norway. *Dis. Aquat. Org.*, **66**, 71–79.
- 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.

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.

*
* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la infección por el virus de la anemia infecciosa del salmón (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 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 2018.