

INFECCIÓN POR EL ALFAVIRUS DE LOS SALMÓNIDOS

1. Ámbito de aplicación

La infección por el alfavirus de los salmónidos (AVS) designa la infección por cualquier genotipo del agente patógeno AVS, perteneciente al género *Alphavirus* y a la familia *Togaviridae*.

2. Información sobre la enfermedad

2.1. Factores del agente

2.1.1. Agente etiológico

El SVA es un virus de ARN dextrógiro, esférico, monocatenario, de aproximadamente 60–70 nm de diámetro, con un genoma de ~12 kb. El genoma codifica ocho proteínas: cuatro glicoproteínas de la cápside (E1, E2, E3 y 6K) y cuatro proteínas no estructurales (nsP1-4). Se considera que la glicoproteína E2 es el lugar donde se encuentra la mayoría de los epítomos neutralizantes, mientras que la E1 contiene más epítomos conservados de reacción cruzada (McLoughlin y Graham, 2007). Se considera que el SVA pertenece al género *Alphavirus* de la familia *Togaviridae*, según los estudios de la secuencia de nucleótidos de las cepas del SVA, y teniendo en cuenta las propiedades biológicas del virus, así como los ensayos de infección cruzada y neutralización. Además, cuatro elementos de secuencia de nucleótidos conservados (CSE) y un motivo conservado (GDD), característicos de los alfavirus, están presentes en el genoma del AVS (McLoughlin y Graham, 2007).

El AVS se ha dividido en seis genotipos (AVS 1-AVS 6) en base únicamente a las secuencias de ácido nucleico de las proteínas E2 y nsP3 (Fringuelli *et al.*, 2008). El nivel de variación antigénica entre los genotipos se considera bajo, ya que los anticuerpos monoclonales (MAbs) generados contra un genotipo específico de AVS probablemente reaccionen de forma cruzada con otras cepas de AVS (Graham *et al.*, 2014; Jewhurst *et al.*, 2004).

La infección por el SVA causa enfermedad del páncreas (EP) o enfermedad del sueño (ED) en el salmón del Atlántico (*Salmo salar* L.), la limanda común (*Limanda limanda*), la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (McLoughlin y Graham, 2007) y el salvelino del Ártico (*Salvelinus alpinus*) (Lewis *et al.*, 2018). Los genotipos AVS 1 y AVS 2 causan enfermedad en peces tanto de agua dulce como de agua de mar, mientras que los cuatro genotipos AVS 3 - AVS 6 solo se han notificado en brotes de la enfermedad en agua de mar.

2.1.2. Supervivencia y estabilidad en muestras procesadas o conservadas

No hay datos científicos publicados específicos sobre la supervivencia y la estabilidad del SVA en muestras procesadas o conservadas. El Laboratorio de Referencia de la OIE ha comprobado que el SVA en muestras de suero/plasma y el virus aislado de un cultivo celular pueden conservarse durante muchos años a –80°C sin que el título del virus disminuya de forma significativa. Esta observación es compatible con las investigaciones sobre otros alfavirus.

2.1.3. Supervivencia y estabilidad fuera del hospedador

Las pruebas de laboratorio sugieren que el SVA podría sobrevivir durante largos periodos en el medio acuático. En estas pruebas, el virus pudo detectarse al final del periodo de prueba de 65 días en la mayoría de los ensayos. La supervivencia del virus estuvo inversamente asociada a la temperatura; a 20°C el virus no era detectable más allá de 35 días, y a 4°C seguía presente después de 65 días.

Se ha comprobado que la vida media del SVA en el suero está inversamente asociada a la temperatura, siendo hasta 7 veces más larga a 4°C que a 20°C, lo cual subraya la necesidad de enviar rápidamente las muestras a 4°C a los laboratorios para el aislamiento del virus. Para la conservación a largo plazo de las muestras positivas al SVA y del virus cultivado, se recomienda la conservación a –80°C (Graham *et al.*, 2007b).

Pueden consultarse los métodos de inactivación en la sección 2.4.5.

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

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

Familia	Nombre científico	Nombre común	Genotipo
<i>Pleuronectidae</i>	<i>Limanda limanda</i>	Lenguadina	AVS 5
<i>Salmonidae</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Trucha arcoiris	AVS 1, 2, 3
	<i>Salmo salar</i>	Salmón del Atlántico	AVS 1, 2, 3, 4, 5, 6
	<i>Salvelinus alpinus</i>	Trucha alpina	AVS 2

2.2.2. Especies con datos ambiguos sobre su susceptibilidad

Las especies para las que existen datos ambiguos sobre su susceptibilidad según el Capítulo 1.5. del *Código Acuático* son las siguientes: la platija americana (*Hippoglossoides platessoides*), la solla europea (*Pleuronectes platessa*) y la maragota wrasse (*Labrus bergylta*).

Además, se han notificado resultados positivos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específica del agente patógeno en las siguientes especies, pero no se ha demostrado una infección activa:

Familia	Nombre científico	Nombre común
<i>Clupeidae</i>	<i>Clupea harengus</i>	Arenque del Atlántico
<i>Cottidae</i>	<i>Myoxocephalus octodecemspinosus</i>	Escualo de cuerno largo
<i>Gadidae</i>	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	Eglefino
	<i>Trisopterus esmarkii</i>	Faneca noruega
	<i>Pollachius virens</i>	Carbonero
	<i>Merlangius merlangus</i>	Pescadilla
	<i>Gadus morhua</i>	Bacalao del Atlántico
<i>Merlucciidae</i>	<i>Merluccius hubbsi</i>	Merluza argentina
<i>Pleuronectidae</i>	<i>Platichthys flesus</i>	Platija europea
<i>Salmonidae</i>	<i>Salmo trutta</i>	Trucha marrón

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

El salmón del Atlántico y la trucha arcoiris son las especies con mayor probabilidad de infección por SVA. Los estudios experimentales han demostrado que todas las etapas de la vida son susceptibles de infección (Taksdal y Sindre, 2016). Se han detectado AVS1 - AVS6 en el salmón del Atlántico. Se han detectado AVS 1, AVS 2 y AVS 3 en la trucha arcoiris.

A los efectos de la Tabla 4.1, los alevines y los pintos de salmón del Atlántico (por ejemplo, hasta aproximadamente 1 g de peso) pueden considerarse etapas de vida tempranas, los preesguines y los esguines pueden considerarse como juveniles y todos los peces posteriores a la esmoltificación como adultos.

2.2.4. Distribución del agente patógeno en el hospedador

El corazón y el páncreas son los principales órganos diana de la infección por el SVA. La necrosis y la pérdida de tejido pancreático exocrino, la miocarditis y la miositis esquelética son hallazgos histopatológicos característicos. Durante la fase virémica, también se encuentran cantidades sustanciales de virus en el suero, y durante la infección, el virus también puede encontrarse en el encéfalo, el riñón, el bazo, las branquias, las mucosas y las heces (Taksdal y Sindre, 2016).

2.2.5. Animales acuáticos reservorios de la infección

Hay pruebas de que algunos supervivientes de los brotes se convertirán en portadores del virus a largo plazo (Graham *et al.*, 2010) y, por tanto, el salmón atlántico y la trucha arcoiris de piscifactoría pueden considerarse el principal reservorio del SVA (Taksdal y Sindre, 2016). Se ha detectado la infección por el SVA en algunas especies de peces planos silvestres en Escocia (Bruno *et al.*, 2014; Snow *et al.*, 2010) que también podrían actuar como reservorio de la infección.

2.2.6. Vectores

Aunque la mayoría de los alfavirus se transmiten por vectores artrópodos, aún no se ha demostrado la transmisión vectorial del SVA. El SVA se ha detectado mediante PCR de transcripción inversa (RT) en piojos del salmón (*Lepeophtheirus salmonis*) recogidos durante brotes agudos de la enfermedad del páncreas en el salmón del Atlántico, pero no se ha notificado la transferencia a especies de peces susceptibles (Petterson *et al.*, 2009).

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mortalidad, morbilidad y prevalencia

Las tasas de mortalidad debidas a la infección por AVS pueden variar en función del genotipo, la estación, el año, el uso de las medidas de bioseguridad y las especies de peces (Bang Jensen *et al.*, 2012; Graham *et al.*, 2011; Rodger & Mitchell, 2007; Stormoen *et al.*, 2013). La mortalidad acumulada en las piscifactorías oscila entre un valor insignificante y más del 50% en los casos graves (Bang Jensen *et al.*, 2012; Graham *et al.*, 2003; Rodger & Mitchell, 2007; Ruane *et al.*, 2008; Stene *et al.*, 2014). Los estudios experimentales han demostrado que la infección por el SVA2 en los peces marinos causa una mortalidad menor que el SVA3 (Taksdal *et al.*, 2015).

La duración de los brotes de la enfermedad, definida como el periodo con mayor mortalidad, puede variar de 1 a 32 semanas (Jansen *et al.* 2010a; 2014; Ruane *et al.*, 2008).

La prevalencia de la infección por AVS es variable. Durante los brotes de la enfermedad, la prevalencia suele ser alta; se han notificado prevalencias del 70-100% en lugares de cría de salmón del Atlántico (Graham *et al.*, 2010). Las prevalencias en los peces salvajes son en gran medida desconocidas. El SVA se ha detectado mediante RT-PCR en algunas especies de peces planos marinos en aguas escocesas con prevalencias que van del 0% al 18%, dependiendo de la especie y la ubicación (Snow *et al.*, 2010). Un estudio serológico de salmónidos salvajes en sistemas fluviales de agua dulce en Irlanda del Norte no detectó anticuerpos neutralizantes del AVS en ninguno de los 188 sueros analizados, mientras que la mayoría de los sueros de salmón de piscifactoría en agua de mar en la misma zona dieron positivo (Graham *et al.*, 2003).

2.3.2. Signos clínicos, incluidos cambios conductuales

Puede observarse una disminución repentina del apetito entre 1 y 2 semanas antes de la detección de una mortalidad elevada. Los peces clínicamente enfermos pueden observarse nadando lentamente en la superficie del agua. En algunos casos, pueden encontrarse peces extremadamente débiles ("dormidos") en el fondo de los tanques o en las jaulas de red. También puede observarse un mayor número de deposiciones fecales. Sin embargo, es importante señalar que los signos clínicos no son patognomónicos.

Inicialmente, el estado nutricional suele ser normal, pero en los meses posteriores a un brote o en las últimas fases de la enfermedad, suelen observarse peces largos y delgados ("runts") con una mala condición corporal. Sin embargo, la presentación de peces largos y delgados puede estar causada por factores distintos del AVS.

2.3.3. Signos anatomopatológicos macroscópicos

El contenido intestinal amarillo mucoso es un hallazgo post-mortem habitual, que suele observarse en peces inapetentes. Ocasionalmente, pueden observarse signos de trastornos circulatorios, como hemorragias petequiales, ascitis leve o enrojecimiento de la región pancreática entre los ciegos pilóricos. Algunos peces enfermos pueden tener el corazón pálido o roto. Es importante señalar que los hallazgos post mortem no son patognomónicos.

2.3.4. Modos de transmisión y ciclo de vida

La transmisión horizontal del AVS está demostrada por una serie de pruebas que incluyen: estudios filogenéticos, transmisión probada entre peces que cohabitan, transmisión probada entre sitios de

cultivo, estudios sobre la supervivencia del AVS en el agua de mar y la propagación a través de las corrientes de agua (Graham *et al.*, 2011; Jansen *et al.*, 2010a; Kristoffersen *et al.*, 2009; Stene *et al.*, 2013; Viljugrein *et al.*, 2009).

La transmisión a larga distancia del AVS a una zona previamente no infectada se debe probablemente al desplazamiento de peces vivos infectados (Kristoffersen *et al.*, 2009; Rodger & Mitchell, 2007). El AVS se ha detectado en la grasa que se filtra de los peces muertos y que se acumula en la superficie del agua del mar, lo que contribuye a la propagación del virus por las corrientes de agua (Stene *et al.*, 2016). Una vez que el AVS se ha introducido en una zona, la proximidad de la piscifactoría y las corrientes de agua influyen en la transmisión local (Aldrin *et al.*, 2010; Kristoffersen *et al.*, 2009; Viljugrein *et al.*, 2009).

Se ha sugerido la transmisión vertical del AVS (Bratland y Nylund, 2009), pero no se ha demostrado (Kongtorp *et al.*, 2010; McLoughlin & Graham, 2007). El Comité Científico Noruego para la Seguridad Alimentaria, (2010), llevó a cabo una evaluación del riesgo y concluyó que el riesgo de transmisión vertical del AVS es insignificante.

2.3.5. Factores medioambientales

Los brotes clínicos y la mortalidad están influidos por la temperatura del agua y por la estación del año (McLoughlin & Graham, 2007; Rodger & Mitchell, 2007; Stene *et al.*, 2014; Stormoen *et al.*, 2013).

2.3.6. Distribución geográfica

Se han notificado casos de infección por AVS en varios países de Europa. Para obtener información reciente sobre la distribución a nivel de país, consulte la interfaz de WAHIS (<https://wahis.oie.int/#/home>).

2.4. Estrategias de bioseguridad y de control de la enfermedad

2.4.1. Vacunación

Se comercializan vacunas contra el AVS de virus inactivado basadas tanto de ADN como en cultivo celular.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas, incluidos agentes bloqueantes

No se dispone de quimioterapia.

2.4.3. Inmunoestimulación

No se dispone de inmunoestimulación.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

Se han observado diferencias de susceptibilidad entre los distintos grupos familiares del salmón del Atlántico en estudios de desafío y en condiciones de campo, lo que indica el potencial de la cría para la resistencia (Norris *et al.*, 2008; Gonen *et al.*, 2015). Los programas de cría en Irlanda y Noruega han producido con éxito peces con mayor resistencia a la enfermedad causada por el AVS, que ahora se comercializan.

2.4.5. Métodos de inactivación

El AVS se inactiva rápidamente a pH 4 y pH 12, y después de someterlo a 60°C (Graham *et al.*, 2007b). El virus también se inactiva fácilmente con luz ultravioleta (Anon). Se ha comprobado la eficacia de una serie de desinfectantes disponibles en el mercado contra el alfavirus de los salmónidos en diferentes condiciones, y todos ellos han resultado eficaces al menos en algunas de ellas. Se ha demostrado que la presencia de materia orgánica disminuye la eficacia de los desinfectantes en algunos casos (Graham *et al.* 2007a).

2.4.6. Desinfección de huevos y larvas

Los procedimientos estándar de desinfección se consideran suficientes para evitar la contaminación de la superficie de los huevos por AVS (Graham *et al.*, 2007a).

2.4.7. Prácticas generales de manejo

El estrés de los peces por el movimiento, el hacinamiento o el tratamiento puede iniciar brotes de la enfermedad en las piscifactorías infectadas. Entre los factores de riesgo de que se produzcan brotes en un lugar de cría se encuentran los antecedentes de infección por el AVS, una elevada tasa de alimentación, una alta carga de piojos de mar, el uso de esguines de otoño y brotes previos de necrosis pancreática infecciosa (Bang Jensen *et al.*, 2012; Kristoffersen *et al.*, 2009; Rodger & Mitchell, 2007).

Para evitar la infección por AVS, deben aplicarse buenas prácticas de cría, como el uso de lugares adecuados para la cría, la segregación de las generaciones, la repoblación con peces de calidad, la eliminación de los peces muertos, la limpieza periódica de los tanques y compartimentos, el control de los parásitos y otros agentes patógenos, así como una manipulación cuidadosa de los peces. Una vez iniciado el brote, la mortalidad puede reducirse reduciendo al mínimo la manipulación y suspendiendo la alimentación.

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

3.1. Selección de las poblaciones y de los ejemplares

Todas las unidades de producción (estanques, tanques, jaulas de red, etc.) deben ser inspeccionadas para detectar la presencia de peces muertos, débiles o con un comportamiento anormal. Los peces extremadamente débiles (“dormidos”) pueden encontrarse en el fondo de un tanque o de las jaulas de red. Si el número de peces clínicamente enfermos es bajo, pueden añadirse muestras de peces largos y delgados (“runts”). Si se toman muestras de peces moribundos o delgados, la probabilidad de detectar el AVS es mayor que si se toman muestras de peces aparentemente sanos seleccionados al azar (Jansen *et al.*, 2010b).

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

- i) Las especies susceptibles deben ser muestreadas proporcionalmente o siguiendo criterios basados en el riesgo para la selección dirigida de lotes o poblaciones con un historial de mortalidad anormal o posible exposición (por ejemplo, a través de aguas superficiales no tratadas, recogida de ejemplares salvajes o reemplazo con poblaciones de estado sanitario desconocido).
- ii) Si se utiliza más de una fuente de agua para la producción de peces, se incluirán en la muestra peces de todas las fuentes de agua.
- iii) Se seleccionarán los peces débiles, de comportamiento anormal o recién muertos (no descompuestos). Si no hay peces de este tipo, se seleccionarán peces aparentemente sanos recogidos de manera que todas las partes de la explotación, así como todas las clases de año, estén proporcionalmente representadas en la muestra.

3.2. Selección de órganos y tejidos

El corazón y el riñón medio son los órganos recomendados para la detección del AVS, ya sea por métodos biológicos moleculares o por cultivo celular. Durante un brote, el corazón suele contener más AVS que otros tejidos y siempre debería tomarse una muestra del mismo. Después de los brotes de la enfermedad, el tejido de las branquias y del corazón (Graham *et al.*, 2010) y las combinaciones de tejido del corazón y del riñón medio (Jansen *et al.*, 2010b) siguieron siendo positivos por RT-PCR en tiempo real durante meses después de la detección inicial.

En el caso de los peces vacunados, debe tomarse una muestra del corazón, y no del riñón medio, el bazo u otros órganos internos, porque la apertura de la cavidad abdominal puede causar la contaminación por ARN/ADN vírico de la vacuna (véase la sección 2.4).

Durante la fase virémica inicial, las muestras de suero también son adecuadas para la detección del AVS, ya sea por métodos biológicos moleculares o por cultivo celular, lo que puede proporcionar una alerta temprana de los brotes de la enfermedad (Graham *et al.*, 2010). A partir de aproximadamente 3 semanas después de la infección por el AVS, el suero o el plasma sanguíneo son adecuados para una prueba de neutralización del virus (Graham *et al.*, 2003).

Los tejidos adecuados para los exámenes histológicos incluyen las branquias, el corazón, los ciegos pilóricos con tejido pancreático adherido, el hígado, el riñón, el bazo y el músculo esquelético, que contiene tanto músculo rojo (aeróbico) como blanco (anaeróbico). La piel con músculo esquelético adherido debe muestrearse a nivel de la línea lateral y a una profundidad suficiente como para incluir tanto músculo rojo como blanco.

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

El páncreas, aunque es un órgano diana para la detección del virus, no es adecuado para la detección del AVS mediante RT-PCR, ya que es imposible separar este órgano del intestino del pez durante el muestreo y, además, la pérdida de páncreas es común en los peces infectados. Los órganos distintos de los recomendados en la sección 3.2 no deben utilizarse para la detección del AVS, ya que la sensibilidad de los métodos de diagnóstico podría verse reducida.

3.4. Muestreo no letal

Se está investigando el uso de métodos de muestreo no letales para la vigilancia del AVS en las piscifactorías, incluida la detección del virus en el agua (Bernhard *et al.*, 2021). Sin embargo, actualmente no se dispone de métodos validados. Las muestras de suero pueden recogerse mediante métodos de muestreo no letales y considerarse adecuadas para algunos métodos de detección del AVS, como se describe en la sección 3.2.

3.5. Conservación de muestras para el envío

En el Capítulo 2.3.0 se puede consultar cómo conservar las muestras destinadas al análisis.

3.5.1. Muestras para el aislamiento del agente patógeno

Se pueden consultar las recomendaciones sobre el transporte al laboratorio de muestras para el aislamiento de virus en la sección B.2.4 del Capítulo 2.3.0 *Información general* (enfermedades de los peces).

3.5.2. Conservación de muestras para la detección molecular

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

Como alternativa, las muestras de tejido para las RT-PCR deben conservarse en un medio apropiado para la preservación del ARN. Las muestras en reactivos estabilizadores de ARN pueden enviarse sobre hielo o a temperatura ambiente si el tiempo de transporte no supera las 24 horas.

Para la conservación posterior, las muestras deben mantenerse a menos de -20°C .

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

Las muestras de tejido para histopatología deben fijarse en formalina neutro tamponada al 10% inmediatamente después de su recogida. La proporción recomendada de fijador respecto a tejido es de 10:1.

3.5.4. Muestras para otras pruebas

Las muestras de sangre deben centrifugarse para la recogida de suero o plasma lo antes posible tras la toma de las mismas, para evitar la lisis de los glóbulos rojos. Las muestras de suero o plasma deben enviarse sobre hielo al laboratorio para garantizar la viabilidad del virus.

3.6. Combinación de varias muestras

No se ha evaluado a fondo la fiabilidad de un aislamiento del virus y de la RT-PCR en tiempo real para detectar el AVS en muestras combinadas de poblaciones aparentemente sanas y clínicamente enfermas de salmón del Atlántico. Los resultados sugieren que el uso de muestras individuales, en lugar de grupos, es más apropiado cuando se trata de pruebas destinadas a detectar la ausencia del virus o el diagnóstico confirmativo de la infección por el AVS (Hall *et al.*, 2014).

4. Métodos de diagnóstico

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

Clave:

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

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

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

Método	A. Vigilancia de animales aparentemente sanos				B. Diagnóstico preliminar de animales afectados clínicamente				C. Diagnóstico confirmativo 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												
Histopatología ³					++	++	++	2				
Citopatología ³												
Cultivo celular					+	+	+	2	+	+	+	2
PCR en tiempo real	+++	+++	+++	2	+++	+++	+++	2				
PCR convencional					++	++	++	1	++	++	++	1
Secuenciación del amplicón ⁴									+++	+++	+++	1
Hibridación <i>in situ</i>												
Bioensayo												
LAMP												
Ab ELISA												
Ag ELISA												
Inmunohistoquímica										+	+	2
Prueba de neutralización en suero		+	++	1	++	++	++	2				

LV = nivel de validación, relativo a la fase de validación en la vía de la OIE (Capítulo 1.1.2); RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa; LAMP = amplificación isotérmica mediada por bucle. 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 anatomopatológicas que se encuentran con mayor frecuencia en los peces clínicamente enfermos son la pérdida grave de tejido pancreático exocrino, la necrosis e inflamación cardiomiocítica, la inflamación del músculo esquelético rojo (aeróbico) y la degeneración o inflamación del músculo esquelético blanco (anaeróbico). Un hallazgo menos frecuente, pero que sirve de apoyo, es la detección de células con muchos gránulos eosinófilos citoplasmáticos a lo largo de los sinusoides renales.

A medida que la enfermedad avanza, la aparición de estas alteraciones no es simultánea en todos los órganos: en una fase inicial muy breve, las únicas lesiones presentes pueden ser la necrosis del tejido pancreático exocrino y una reacción inflamatoria variable en la grasa peripancreática. Poco después, la degeneración y la necrosis de las células del músculo cardíaco aparecen antes de que la respuesta inflamatoria en el corazón sea más pronunciada. Los restos necróticos del páncreas parecen desaparecer, y el cuadro característico de pérdida intensa de tejido pancreático exocrino aparecerá pronto, simultáneamente con el aumento de la inflamación en el corazón. Posteriormente, aparecen la degeneración del músculo esquelético, la inflamación y la fibrosis. En cierto porcentaje de peces, puede producirse una fibrosis severa del tejido peri-acinar, y en estos casos, el páncreas no se recupera (“*runts*”) (Christie *et al.*, 2007; Kerbart Boscher *et al.*, 2006; McLoughlin & Graham, 2007; Taksdal *et al.*, 2007).

La citopatología no es relevante para el diagnóstico.

4.3. Cultivo celular para el aislamiento

El aislamiento de cepas naturales del AVS en cultivo celular puede resultar difícil (Christie *et al.*, 1998; Graham *et al.*, 2007b; Petterson *et al.*, 2013).

Los cultivos celulares CHSE-214 se utilizan habitualmente para el aislamiento primario de AVS. Sin embargo, se ha descrito la variación en la susceptibilidad de la línea celular entre diferentes cepas naturales del AVS (Graham *et al.*, 2008; Herath *et al.*, 2009). Por lo tanto, deberían probarse otras líneas celulares susceptibles, como BF-2, FHM, SHK-1, EPC o CHH-1 para el aislamiento inicial del AVS en cultivos celulares. Las líneas celulares deben ser monitorizadas para asegurar que la susceptibilidad a los agentes patógenos diana no ha cambiado.

Las células CHSE-214 se cultivan a 20°C en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) con aminoácidos no esenciales y tampón HEPES (ácido N-2-hidroxi-etil-piperazina-N-2-etanosulfónico) 0,01 M, o en medio de cultivo celular L-15 de Leibovitz, ambos complementados con suero fetal bovino (FBS) (al 5% o 10%) y L-glutamina 4 mM.

Para el aislamiento del virus, las células se cultivan en frascos de cultivo tisular o en placas de cultivo celular de varios pocillos. El control positivo para el AVS se inoculan en paralelo con las muestras de tejido como prueba de la susceptibilidad de las células al AVS. Cuando se incluyen controles positivos, deben tomarse medidas para evitar la contaminación.

Se utiliza el procedimiento de preparación de muestras e inoculación descrito en el capítulo 2.3.0 *Información general* (sobre enfermedades de los peces), sección A.2.2.2.

Los cultivos celulares inoculados se incuban a 15°C durante al menos 14 días y se examinan a intervalos regulares para detectar la posible aparición del efecto citopático (ECP). El ECP característico debido al AVS aparece como placas de células vacuoladas y picnóticas. Sin embargo, las cepas noruegas del AVS halladas en condiciones de campo (tanto el AVS 3 como el AVS 2) no suelen producir el ECP en pasajes bajos, y esto también se ha descrito para otros genotipos del AVS (Graham *et al.*, 2008; Petterson *et al.*, 2013). Si no se ha desarrollado un ECP después de 14 días, se subcultiva en cultivos celulares frescos. Al final del periodo de incubación, o antes si aparece un ECP evidente, se recoge el medio para la identificación del virus, como se describe a continuación. Los cultivos celulares deben examinarse siempre para detectar la posible presencia del AVS mediante inmunofluorescencia (prueba de inmunofluorescencia indirecta [IFAT]) o RT-PCR convencional o RT-PCR en tiempo real, ya que puede haberse producido la replicación del virus sin que haya aparecido un ECP aparente.

4.4. Amplificación de ácido nucleico

4.4.1. RT-PCR en tiempo real

Los cebadores descritos a continuación para la RT-PCR en tiempo real y la RT-PCR con secuenciación detectarán todos los genotipos conocidos del AVS.

La RT-PCR puede utilizarse para la detección del AVS a partir del ARN total (o de los ácidos nucleicos totales) extraído de los órganos o tejidos recomendados (véase la sección 3.4). Se recomienda la RT-PCR en tiempo real para la detección del AVS, ya que aumenta la especificidad y la sensibilidad de la prueba.

Para el genotipado, se recomienda la RT-PCR con posterior secuenciación de fragmentos del gen E2.

Las secuencias de los cebadores y las sondas para la RT-PCR en tiempo real del gen nsP1, así como los cebadores para la genotipificación, figuran en la Tabla 4.4.1.1. Para la extracción de ARN, pueden utilizarse extractores de ácido nucleico automáticos y semiautomáticos. Además, también pueden utilizarse con éxito diversos kits manuales de extracción de ARN para extraer el ARN del AVS. Pueden utilizarse diversos kits de RT-PCR y máquinas de PCR en tiempo real. El programa de PCR depende del kit y del equipo de PCR en tiempo real utilizado en el laboratorio. Las condiciones para realizar la RT-PCR en tiempo real en el Laboratorio de Referencia de la OIE son las siguientes: 50°C durante 10 minutos, 95°C durante 3 minutos y 40 ciclos de (95°C durante 10 segundos, 60°C durante 20 segundos).

Tabla 4.4.1.1. Secuencias de cebador y sonda para la RT-PCR y la RT-PCR en tiempo real

Secuencias de cebador y sonda	Tipo de prueba	Segmento genómico	Tamaño del producto	Referencia
QnsP1F: 5'-CCG-GCC-CTG-AAC-CAG-TT-3' QnsP1R: 5'-GTA-GCC-AAG-TGG-GAG-AAA-GCT-3' QnsP1probe: 5'FAM-CTG-GCC-ACC-ACT-TCG-A-MGB3' (Taqman@probe)	RT-PCR en tiempo real	QnsP1	107 bp	Hodneland <i>et al.</i> , 2006
E2F: 5'-CCG-TTG-CGG-CCA-CAC-TGG-ATG-3' E2R: 5'-CCT-CAT-AGG-TGA-TCG-ACG-GCA-G-3'	RT-PCR	E2	516 107 bp	Fringuelli <i>et al.</i> , 2008

Los siguientes controles deben incluirse en cada ensayo: control negativo de extracción; control positivo con molde; control sin molde.

4.4.2. RT-PCR convencional

En la sección 4.4.1 se pueden consultar los comentarios sobre los kits de PCR convencional y las máquinas de PCR.

Los cebadores E2 indicados en la Tabla 4.2 pueden utilizarse para la detección convencional del AVS por RT-PCR, si es necesario.

Para la RT-PCR convencional, se utiliza el siguiente programa: 50°C durante 30 minutos, 95°C durante 15 minutos y 45 ciclos de (94°C durante 60 segundos, 55°C durante 45 segundos, 72°C durante 60 segundos).

Con cada RT-PCR deben incluirse los siguientes controles: control negativo de extracción; control positivo con molde; control sin molde.

4.4.3. Otros métodos de amplificación de ácido nucleico

No es aplicable.

4.5. Secuenciación del amplicón

Se recomienda el análisis de la secuencia de nucleótidos del amplicón de la RT-PCR (Sección 4.4.2) como uno de los pasos finales para confirmar el diagnóstico. Las secuencias específicas del AVS compartirán un mayor grado de similitud nucleotídica con una de las secuencias de referencia publicadas para el AVS.

4.6. Hibridación *in situ*

No es aplicable.

4.7. Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica (Taksdal *et al.*, 2007) solo se recomienda para muestras tomadas de peces con necrosis aguda del tejido pancreático exocrino.

4.7.1. Preparación de cortes histológicos

Los tejidos se fijan en formalina neutra tamponada con fosfato al 10% durante al menos 1 día, se deshidratan en etanol graduado, se aclaran en xileno y se incrustan en parafina, según los protocolos estándar. Los cortes, de aproximadamente 3 μm de grosor (para la inmunohistoquímica se toman en portaobjetos recubiertos de poli-L-lisina), se calientan a 56-58°C (máximo 60°C) durante 20 minutos, se desparafinan en xileno, se rehidratan mediante etanol graduado y se tiñen con hematoxilina y eosina para la histopatología y la inmunohistoquímica, como se describe a continuación.

4.7.2. Procedimiento de la tinción para inmunohistoquímica

Todas las incubaciones se llevan a cabo a temperatura ambiente y todos los pasos de lavado se realizan con solución salina tamponada con Tris (TBS).

- i) Los sitios de unión de anticuerpos no específicos se bloquean primero en albúmina de suero bovino (BSA) al 5% en TBS durante 20 minutos. A continuación, se vierte la solución sin lavarla.
- ii) Los cortes se incuban con el anticuerpo primario (anticuerpo monoclonal de ratón 4H1 contra la glicoproteína E1 del AVS [Todd *et al.*, 2001]), diluido a 1/3000 en BSA al 2,5% en TBS y se incuban durante toda la noche, y a continuación se llevan a cabo dos baños de lavado de un mínimo de 5 minutos.
- iii) Los cortes se incuban con el anticuerpo secundario (anticuerpo biotinilado de conejo anti Ig de ratón) diluido a 1/300 durante 30 minutos, seguido de baños de lavado como en el paso ii anterior.
- iv) Los cortes se incuban con el conjugado de fosfatasa alcalina de estreptavidina (1/500) durante 30 minutos, seguido de baños de lavado como en el paso ii anterior.
- v) Para la detección de los anticuerpos unidos, los cortes se incuban con Fast Red (1 mg ml⁻¹) y fosfato de Naftol AS-MX (0,2 mg ml⁻¹) con Levamisol 1 mM en TBS 0,1 M (pH 8,2) y se dejan revelar durante 20 minutos, y a continuación se lleva a cabo un lavado en agua del grifo antes de la contratinción con hematoxilina de Mayer y el montaje en medio de montaje acuoso.

En cada determinación se incluyen un corte de tejido positivo para AVS y uno negativo para AVS a modo de controles (Taksdal *et al.*, 2007).

4.8. Bioensayo

No es aplicable.

4.9. Métodos de detección basados en anticuerpos o antígenos

4.9.1. Verificación del crecimiento de AVS en cultivo celular mediante anticuerpos

Esta técnica no debe utilizarse como método de selección. Todas las incubaciones que se indican a continuación se realizan a temperatura ambiente, a menos que se indique lo contrario.

- i) Se preparan monocapas de células en placas de cultivo de tejidos adecuadas (por ejemplo, placas de 96 pocillos) o en cubreobjetos, según el tipo de microscopio disponible (es necesario un microscopio de fluorescencia invertido para las monocapas cultivadas en placas de cultivo tisular). Deben incluirse las monocapas necesarias para los controles negativo y positivo.
- ii) Se inoculan las monocapas con las suspensiones de virus que deben identificarse a diluciones decimales, dos monocapas por cada dilución. Se añade el control positivo a diluciones que se sepa

que dan una buena reacción de tinción. Se incuban los cultivos celulares inoculados a 15°C durante 9–11 días.

- iii) Se fijan en acetona al 80% durante 20 minutos después de retirar 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. Si es necesario, los cultivos celulares fijados pueden conservarse en seco durante 14 días a 4°C hasta la tinción.
- iv) Se incuban las monocapas celulares con anticuerpos anti-AVS a una dilución adecuada en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 1 hora y se enjuagan tres veces con PBS con Tween 20 al 0,05%.
- v) Se incuban con el anticuerpo (inmunoglobulina) específico de la especie conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) durante 1 hora, según las instrucciones del proveedor. Para aumentar la sensibilidad de la prueba, el anticuerpo anti Ig de ratón conjugado con FITC puede sustituirse por un anticuerpo anti Ig de ratón marcado con biotina y estreptavidina marcada con FITC, incluyendo un aclarado como el del paso d) entre pasos. 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 bajo el microscopio de fluorescencia. Para evitar la pérdida de tinción, 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 para impedir la pérdida de tinción.

4.10. Otros métodos

4.10.1. Prueba de neutralización en suero

Los estudios experimentales han puesto de manifiesto que los anticuerpos neutralizantes pueden detectarse por primera vez entre 10 y 16 días después de la infección (Graham *et al.*, 2003), y los ensayos de neutralización en suero (SN) pueden utilizarse como herramienta de diagnóstico para la detección de anticuerpos del AVS. Los ensayos de SN se basan en la presencia o ausencia de crecimiento detectable del virus en células cultivadas tras la incubación con un suero que pueda contener anticuerpos neutralizantes. Además, este ensayo permite la detección del virus en suero o plasma, si lo hay, ya que siempre se incluyen en el ensayo pozos control con muestras sin AVS añadido, con el fin de determinar la posible presencia del virus en las muestras.

Las células CHSE-214 se cultivan como se describe en la sección 4.3.1. Se prepara una suspensión de células tripsinizadas, diluida a 1/3 en medio de crecimiento (10% FBS) para el ensayo SN.

- i) Se preparan diluciones a 1/20 y 1/40 de cada suero problema en medio de mantenimiento (2% FBS), y se transfieren a dos pocillos duplicados (15 µl por pocillo) en una placa de microtitulación de fondo plano para cultivo tisular. Se añade un volumen igual de virus (100 DICT50 [dosis infectiva en el 50% de los tejidos expuestos]) y la placa se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente.
- ii) Se añaden 70 µl de medio de mantenimiento y 50 µl de la suspensión celular CHSE-214 a cada pocillo y se incuban las placas durante 3 días a 15°C.
- iii) A continuación, se fija y tiñe la monocapa celular como se describe en el apartado 4.9.1 *Verificación del crecimiento de los SVA en cultivo celular mediante anticuerpos*, o mediante el siguiente procedimiento: se fijan las monocapas de células CHSE-214 durante 30 minutos a temperatura ambiente en formalina neutra tamponada al 10%. Tras dos lavados con PBS 0,01 M, se añade a las monocapas un MAb contra el AVS a una dilución adecuada. El MAb unido se visualiza utilizando un sistema de estreptavidina-biotina marcado según las instrucciones del fabricante.
- iv) Los títulos obtenidos en la SN (ND50) se calculan según el método de Karber (1931), considerándose positivos los títulos $\geq 1:20$. Para garantizar la validez de los resultados, deben incluirse siempre en el ensayo tanto controles de suero negativo (sueros que se sepa que son negativos) como un control para cada muestra (sin adición de virus) y un control de virus (sin adición de suero). Durante la viremia (indicada por la detección de AVS en los pocillos control de la muestra) no se puede evaluar un título de SN.

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

La prueba que se recomienda utilizar en la vigilancia de las poblaciones de peces susceptibles para declararlas libres de AVS es la RT-PCR en tiempo real, tal como se describe en la sección 4.4.1

6. Criterios de diagnóstico confirmativo

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

Las definiciones de caso sospechoso y confirmado se han elaborado para apoyar la toma de decisiones relacionadas con el comercio y la confirmación de la situación respecto a la enfermedad a nivel de país, zona o compartimento. Las definiciones de caso confirmado de la enfermedad en áreas endémicamente afectadas pueden ser menos estrictas. Se recomienda que todas las muestras que arrojen resultados positivos sospechosos en un país, zona o compartimento por lo demás libre de agentes patógenos se remitan inmediatamente al Laboratorio de Referencia de la OIE para su confirmación, independientemente de que los signos clínicos estén o no 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 de estado sanitario desconocido¹

Las poblaciones aparentemente sanas pueden caer bajo sospecha, y por lo tanto ser muestreadas, si existe un vínculo epidemiológico con una población infectada. La proximidad geográfica a una población que se sabe que está infectada, o el desplazamiento de animales o productos animales o equipos, etc. a tal población, equivalen a un vínculo epidemiológico. Por otra parte, se pueden tomar muestras de poblaciones sanas en estudios destinados a demostrar la ausencia de la enfermedad.

6.1.1. Definición de caso sospechoso en animales aparentemente sanos

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

- i) Resultado positivo en una RT-PCR en tiempo real;
- ii) Detección de actividad neutralizante contra el AVS en suero o plasma.

6.1.2. Definición de caso confirmado en animales aparentemente sanos

Se confirmará la presencia de infección por AVS si se cumple al menos uno de los siguientes criterios:

- i) Un resultado positivo en preparaciones de tejidos por RT-PCR convencional y secuenciación del amplicón;
- ii) ECP característico del AVS en cultivo celular seguido de la identificación del virus por RT-PCR convencional y secuenciación del amplicón;
- iii) Un resultado positivo en preparaciones de tejido por inmunohistoquímica, y por RT-PCR convencional y secuenciación del amplicón.

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

6.2 Animales afectados clínicamente

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

6.2.1. Definición de caso sospechoso en animales afectados clínicamente

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

- i) Signos anatomopatológicos macroscópicos o signos clínicos asociados a la infección por AVS;
- ii) Histopatología compatible con la infección por AVS;
- iii) ECP característico del AVS en cultivo celular;
- iv) Resultado positivo por RT-PCR en tiempo real;
- v) Resultado positivo por RT-PCR convencional;
- vi) Detección de actividad neutralizante contra el AVS en suero o plasma.

¹ Por ejemplo, *mercancías* transfronterizas.

6.2.2. Definición de caso confirmado en animales afectados clínicamente

Se confirmará la presencia de infección por Bal si se cumple, además de los criterios de la Sección 6.2.1, al menos uno de los siguientes criterios:

- i) Un resultado positivo en preparaciones de tejidos por RT-PCR convencional y secuenciación del amplicón;
- ii) ECP característico del AVS en cultivo celular seguido de la identificación del virus por RT-PCR convencional y secuenciación del amplicón;
- iii) Un resultado positivo en preparaciones de tejido por inmunohistoquímica, y por RT-PCR convencional y secuenciación del amplicón.

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

6.3. Sensibilidad y especificidad de las pruebas de diagnóstico: en estudio

El rendimiento diagnóstico de las pruebas recomendadas para la vigilancia o el diagnóstico de la infección por AVS figura en la Tabla 6.3.1. Esta información puede utilizarse para el diseño de encuestas sobre la infección por AVS; sin embargo, debe tenerse en cuenta que el rendimiento diagnóstico es específico de las circunstancias de cada estudio de rendimiento diagnóstico (incluidos el propósito de la prueba, la población de origen, los tipos de muestras tisulares y las especies hospedadoras), y que puede variar según las condiciones. Los datos sólo se presentan cuando las pruebas están validadas al menos al nivel dos de la vía de validación descrita en el capítulo 1.1.2 y se dispone de datos en los estudios de precisión diagnóstica publicados.

Tabla 6.3.1. Rendimiento diagnóstico de las pruebas recomendadas para la vigilancia o el diagnóstico

Tipo de prueba	Propósito de la prueba	Poblaciones de origen	Tipo de tejido o muestra	Especie	DSe (n)	DSp (n)	Prueba de referencia	Cita
PCR en tiempo real	Vigilancia Diagnóstico	Infectado	Riñón	Salmón del Atlántico	0.39 (598)	>0.99 (598)	n/a (modelo de probabilidad bayesiano)	Hall <i>et al.</i> , 2014
PCR en tiempo real	Vigilancia Diagnóstico	Infectado vs considerado libre de AVS	Corazón y riñón medio	Salmón del Atlántico	0.978 (268)	0.831 (268)	n/a (Análisis de clase latente bayesiano)	Jansen <i>et al.</i> , 2019
Aislamiento del AVS en cultivo celular	Diagnóstico	Infectado	Ventrículo cardíaco y riñón cefálico	Salmón del Atlántico	0.50 (598)	>0.99 (598)	n/a (modelo de probabilidad bayesiano)	Hall <i>et al.</i> , 2014
Aislamiento del AVS en cultivo celular	Diagnóstico	Infectado vs considerado libre de AVS	Corazón y riñón medio	Salmón del Atlántico	0.950 (268)	0.993 (268)	n/a (Análisis de clase latente bayesiano)	Jansen <i>et al.</i> , 2019
Detección de actividad neutralizante contra el AVS	Vigilancia	Infectado vs considerado libre de AVS	Suero o plasma	Salmón del Atlántico	0.085 (268)	0.744 (268)	n/a (Análisis de clase latente bayesiano)	Jansen <i>et al.</i> , 2019
Histopatología	Diagnóstico	Infectado vs considerado libre de AVS	Corazón y riñón medio	Salmón del Atlántico	0.637 (268)	0.967 (268)	n/a (Análisis de clase latente bayesiano)	Jansen <i>et al.</i> , 2019

DSe = sensibilidad diagnóstica; DSp = especificidad diagnóstica; n = número de muestras utilizadas en el estudio; PCR: = reacción en cadena de la polimerasa.

7. Bibliografía

ALDRIN M., STORVIK B., FRIGESSI A., VILJUGREIN H. & JANSEN P.A. (2010). A stochastic model for the assessment of the transmission pathways of heart and skeleton muscle inflammation, pancreas disease and infectious salmon anaemia in marine fish farms in Norway. *Prev. Vet. Med.*, **93**, 51–61.

- ANON. Development and optimization of an environmentally friendly water purification system for fish transport water based on UV technology. Project report, Norwegian Institute for Water Research. Project no: 245494/E40. 8pp. (In Norwegian).
- BANG JENSEN B., KRISTOFFERSEN A.B., MYR C. & BRUN E. (2012). Cohort study of effect of vaccination on pancreas disease in Norwegian salmon aquaculture. *Dis. Aquat. Org.*, **102**, 23–31.
- BERNHARD L.-V., MYRMEL M., LILLEHAUG A., QVILLER L. & WELI S.C. (2021). A filtration method for concentration and detection of Salmonid alphavirus in seawater during a post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) cohabitant challenge trial. *Dis. Aquat. Org.*, DOI: <https://doi.org/10.3354/dao03572>
- BRATLAND A. & NYLUND A. (2009). Studies on the possibility of vertical transmission of Norwegian salmonid Alphavirus in production of Atlantic salmon in Norway. *J. Aquat. Anim. Health*, **21**, 73–78.
- BRUNO D.W., NOGUERA P.A., BLACK J., MURRAY W., MACQUEEN D.J. & MATEJUSOVA I. (2014) Identification of a wild reservoir of salmonid alphavirus in common dab *Limanda limanda*, with emphasis on virus culture and sequencing. *Aquacult Environ Interact* 5:89-98. <https://doi.org/10.3354/aei00097>.
- CHRISTIE K.E., FYRAND K., HOLTET L. & ROWLEY H.M. (1998) Isolation of pancreas disease virus from farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Norway. *J. Fish Dis.*, **21**, 391–394.
- CHRISTIE K.E., GRAHAM D.A., MCLOUGHLIN M. F., VILLOING S., TODD D. & KNAPPSKOG D. (2007). Experimental infection of Atlantic salmon *Salmo salar* pre-smolts by i.p. injection of new Irish and Norwegian salmonid alphavirus (AVS) isolates: a comparative study. *Dis. Aquat. Org.*, **75**, 13–22.
- FRINGUELLI E., ROWLEY H.M., WILSON J.C., HUNTER R., RODGER H. & GRAHAM D.A. (2008). Phylogenetic analyses and molecular epidemiology of European salmonid alphaviruses (AVS) based on partial E2 and nsP3 gene nucleotide sequences. *J. Fish Dis.*, **31**, 811–823.
- GONEN S., BARANSKI M., THORLAND I., NORRIS A., GROVE H., ARNESEN P., BAKKE H., LIEN S., BISHOP S.C. & HOUSTON R.D. (2015). Mapping and validation of a major QTL affecting resistance to pancreas disease (salmonid alphavirus) in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Heredity*, **115**, 405–414. <https://doi.org/10.1038/hdy.2015.37>
- GRAHAM D.A., CHERRY K., WILSON C.J. & ROWLEY H.M. (2007a). Susceptibility of salmonid alphavirus to a range of chemical disinfectants. *J. Fish Dis.*, **30**, 269–277.
- GRAHAM D.A., FRINGUELLI E., WILSON C., ROWLEY H.M., BROWN, A., RODGER H., MCLOUGHLIN M.F., MCMANUS C., CASEY E., MCCARTHY L.J. & RUANE N.M. (2010). Prospective longitudinal studies of salmonid alphavirus infections on two Atlantic salmon farms in Ireland; evidence for viral persistence. *J. Fish Dis.*, **33**, 123–135.
- GRAHAM D.A., FROST P., MCLAUGHLIN K., ROWLEY H.M., GABESTAD I., GORDON A. & MCLOUGHLIN M.F. (2011). A comparative study of marine salmonid alphavirus subtypes 1–6 using an experimental cohabitation challenge model. *J. Fish Dis.*, **34**, 273–286.
- GRAHAM D.A., JEWURST V.A., ROWLEY H.M., MCLOUGHLIN M.F. & TODD D. (2003). A rapid immunoperoxidase-based neutralization assay for salmonid alphavirus used for a serological survey in Northern Ireland. *J. Fish Dis.*, **26**, 407–413
- GRAHAM D.A., ROWLEY H.M. & FROST P. (2014). Cross-neutralization studies with salmonid alphavirus subtype 1–6 strains: results with sera from experimental studies and natural infections. *J. Fish Dis.*, **37**, 683–691.
- GRAHAM D.A., STAPLES V., WILSON C.J., JEWURST H., CHERRY K., GORDON A. & ROWLEY H.M. (2007b). Biophysical properties of salmonid alphaviruses: influences of temperature and pH on virus survival. *J. Fish Dis.*, **30**, 533–543.
- GRAHAM D.A., WILSON C., JEWURST H. & ROWLEY H. (2008). Cultural characteristics of salmonid alphaviruses – influences of cell line and temperature. *J. Fish Dis.*, **31**, 859–868.
- HALL L.M., MUNRO L.A., WALLACE I.S., MCINTOSH R., MACNEISH K. & MURRAY, A.G. (2014). An approach to evaluating the reliability of diagnostic tests on pooled groups of infected individuals. *Prev. Vet. Med.* **116**, 305–312. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.01.021>
- HERATH T., COSTA J., THOMPSON K., ADAMS A. & RICHARDS R. (2009). Alternative cell line for the isolation of salmonid alphavirus-1. *Icelandic Agricultural Sci.*, **22**, 19–27.
- HODNELAND K. & ENDRESEN C. (2006). Sensitive and specific detection of salmonid alphavirus using real-time PCR (TaqMan). *J. Virol. Methods*, **131**, 184–192.

- JANSEN M.D., GUARRACINO M., CARSON M., MODAHL I., TAKSDAL T., SINDRE H., BRUN E. & TAVORNPANICH S. (2019). Field evaluation of diagnostic test sensitivity and specificity for *Salmonid alphavirus* (AVS) infection and pancreas disease (PD) in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in Norway using Bayesian latent class analysis. *Frontiers Vet. Sci.*, doi: 10.3389/fvets.2019.00419
- JANSEN M.D., TAKSDAL T., WASMUTH M.A., GJERSET B., BRUN E., OLSEN A.B., BRECK O. & SANDBERG M. (2010a). Salmonid alphavirus (AVS) and pancreas disease (PD) in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in freshwater and seawater sites in Norway from 2006 to 2008. *J. Fish Dis.*, **33**, 391–402.
- JANSEN M.D., WASMUTH M.A., OLSEN A.B., GJERSET B., MODAHL I., BRECK O., HALDORSEN R.N., HJELMELAND R. & TAKSDAL T. (2010b). Pancreas disease (PD) in sea-reared Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Norway; a prospective, longitudinal study of disease development and agreement between diagnostic test results. *J. Fish Dis.*, **33**, 723–736.
- JEWHURST V.A., TODD D., ROWLEY H.M., WALKER I.W., WESTON J.H. MCLOUGHLIN M.F & GRAHAM D.A. (2004). Detection and antigenic characterization of salmonid alphavirus isolates from sera obtained from farmed Atlantic salmon, *salmo salar* L., and farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.*, **27**, 143–149.
- KERBART BOSCHER S., MCLOUGHLIN M., LE VEN A., CABON J., BAUD M. & CASTRIC J. (2006). Experimental transmission of sleeping disease in one-year-old rainbow trout *Onchorhynchus mykiss* (Walbaum), induced by sleeping disease virus. *J. Fish Dis.*, **29**, 263–273.
- KONGTORP R.T., STENE A., ANDREASSEN P.A., ASPEHAUG V., GRAHAM D.A., LYGSTAD T.M., OLSEN A.B., OLSEN R.S., SANDBERG M., SANTI N., WALLACE C. & BRECK O. (2010). Lack of evidence for vertical transmission of AVS 3 using gametes of Atlantic salmon, *salmo salar* L., exposed by natural and experimental routes. *J. Fish Dis.*, **33**, 879–888.
- KRISTOFFERSEN A.B., VILJUGREIN H., KONGTORP R.T., BRUN E. & JANSEN P.A. (2009). Risk factors for pancreas disease (PD) outbreaks in farmed Atlantic salmon and rainbow trout in Norway during 2003–2007. *Prev. Vet. Med.*, **90**, 127–136.
- LEWISCH, E., FRANK, T., SOLIMAN, H., SCHACHNER, O., FRIEDL, A., EL-MATBOULI, M., 2018. First confirmation of salmonid alphavirus infection in Arctic char *Salvelinus alpinus* and in Austria. *Diseases of Aquatic Organisms* 130, 71–76.
- MCLOUGHLIN M.F. & GRAHAM D.A. (2007). Alphavirus infections in salmonids – a review. *J. Fish Dis.*, **30**, 511–531. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801573-5.00023-1>
- NORRIS A., FOYLE L., RATCLIFF J. (2008). Heritability of mortality in response to a natural pancreas disease (SPDV) challenge in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts on a West of Ireland sea site. *J. Fish Dis.*, **31**, 913–920.
- PETTERSON E., SANDBERG M. & SANTI N. (2009). Salmonid alphavirus associated with *Lepeoptheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae) from Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.*, **30**, 511–531.
- PETTERSON E., STORMOEN, M., EVENSEN O., MIKALSEN A.B. & HAUGLAND O. (2013). Natural infection of Atlantic salmon (*Salmo salar*) with salmonid alphavirus 3 generates numerous viral deletion mutants. *J. Gen. Virol.*, **94**, 1945–1954.
- RODGER H. & MITCHELL S. (2007). Epidemiological observations of pancreas disease of farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Ireland. *J. Fish Dis.*, **32**, 477–479.
- RUANE N., GRAHAM D. & RODGER H. (2008). Pancreas disease in farmed salmon – health management and investigations at Irish farm sites 2005–2008. Marine Environments and Health Series, No. 34, Marine Institute. Available at <http://oar.marine.ie/handle/10793/267>
- SNOW M., BLACK I., MCINTOSH R., BARETTO E., WALLACE I.S. & BRUNO D.W. (2010). Detection of salmonid alphavirus RNA in wild marine fish: implications for the origin of salmon pancreas disease in aquaculture. *Dis. Aquat. Org.*, **91**, 177–188.
- STENE A., VILJUGREIN H., YNDESTAD H., TAVORNPANICH S. & SKJERVE E. (2013). Transmission dynamics of pancreas disease (PD) in a Norwegian fjord: aspects of water transport, contact networks and infection pressure among salmon farms. *J. Fish Dis.*, **37**, 123–134.
- STENE A., BANG JENSEN B., KNUTSEN Ø., OLSEN A. & VILJUGREIN H. (2014). Seasonal increase in sea temperature triggers pancreas disease in Norwegian salmon farms. *J. Fish Dis.*, **37**, 739–751.

STENE A., HELLEBO A., VILJUGREIN H., SOLEVAG S.E., DEVOLD M. & ASPEHAUG V. (2016). Liquid fat, a potential abiotic vector for horizontal transmission of salmonid alphavirus? *J. Fish Dis.*, **39**, 531-537.

STORMOEN M., KRISTOFFERSEN A.B. & JANSEN P.A. (2013). Mortality related to pancreas disease in Norwegian farmed salmonid fish, *Salmo salar* L. and *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.*, **36**, 639–645.

TAKSDAL T., BANG JENSEN B., BÖCKERMAN I., MCLOUGHLIN M.F., HJORTAAS M.J., RAMSTAD A. & SINDRE H. (2015). Mortality and weight loss of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., experimentally infected with salmonid alphavirus subtype 2 and subtype 3 isolates from Norway. *J. Fish Dis.*, **38**, 1047–1061. <https://doi.org/10.1111/jfd.12312>

TAKSDAL T., OLSEN A.B., BJERKAAS I., HJORTAAS M.J., DANNEVIG B.H., GRAHAM D.A. & MCLOUGHLIN M.F. (2007). Pancreas disease in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in Norway. *J. Fish Dis.*, **30**, 545–558.

TAKSDAL T. & SINDRE H. (2016). Chapter 23 - Togaviruses of Fish. In: Aquaculture Virology. Eds: Kibenge, F. & Godoy, M. Academic Press, San Diego, pp. 357–364. Paperback ISBN: 9780128015735, eBook ISBN: 9780128017548.

THE NORWEGIAN SCIENTIFIC COMMITTEE FOR FOOD SAFETY (VITENSKAPSKOMITEEN FOR MATTRYGGHET) (2010). Risikovurdering - stamfiskovervåking og vertikal smitteoverføring. **01**, 1-44. Available at: [HTTPS://VKM.NO/DOWNLOAD/18.A665C1015C865CC85BDFC47/1500464589864/VURDERING%20AV%20SANNSYNLIGHET%20FOR%20OG%20RISIKO%20VED%20VERTIKAL%20OVERF%3%B8RING%20AV%20SMITTE.PDF](https://vkm.no/download/18.A665C1015C865CC85BDFC47/1500464589864/VURDERING%20AV%20SANNSYNLIGHET%20FOR%20OG%20RISIKO%20VED%20VERTIKAL%20OVERF%3%B8RING%20AV%20SMITTE.PDF)

TODD D., JEWURST V.A., WELSH M.D., BORGHMANS B.J., WESTON J.H., ROWLEY H.M., MACKIE D.P. & MCLOUGHLIN M.F. (2001). Production and characterisation of monoclonal antibodies to salmon pancreas disease virus. *Dis. Aquat. Org.*, **46**, 101–108.

VILJUGREIN H., STAALSTRØM A., MOLVÆR J., URKE H.A. & JANSEN P.A. (2009). Integration of hydrodynamics into a statistical model on the spread of pancreas disease (PD) in salmon farming. *Dis. Aquat. Org.*, **88**, 35–44.

*

* *

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la infección por el alfavirus de los salmónidos (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 infección por el alfavirus de los salmónidos, por favor, contacte con los Laboratorios de Referencia de la OIE.

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 2014. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2021.