

CAPÍTULO 2.3.5.

ANEMIA INFECCIOSA DEL SALMÓN

1. Ámbito de aplicación

La anemia infecciosa del salmón (AIS) es una enfermedad del salmón del Atlántico (*Salmo salar*) (28) de piscifactoría causada por un ortomixovirus, que induce un trastorno sistémico y letal que se caracteriza por una anemia grave y hemorragias y necrosis variables, y necrosis en varios órganos. El curso de la enfermedad es largo, con una baja mortalidad diaria (del 0,05-0,1%) típicamente solo en unas pocas jaulas, pero la mortalidad acumulada puede llegar a ser muy alta. A efectos de este capítulo, la AIS se considera una enfermedad causada por el virus de la anemia del salmón (VAIS) (12).

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. El virus tiene actividad hemaglutinante, destructora de receptores y con capacidad de adsorción.

Las propiedades morfológicas, fisicoquímicas y genéticas del VAIS coinciden con las de los *Orthomyxoviridae* (5,21), y recientemente se ha clasificado al VAIS como la especie tipo del nuevo género *Isavirus* (12) dentro de esta familia de virus. Se ha descrito la secuencia de nucleótidos de cada uno de los ocho segmentos genómicos. El genoma vírico codifica al menos diez proteínas (1, 14, 24). Se han identificado cuatro proteínas estructurales principales, incluyendo una nucleoproteína de 68 kDa, una proteína de la matriz de 22 kDa, una hemaglutinina-esterasa 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 PB1, PB2 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 no estructural con propiedades de antagonización del interferón, mientras que se ha sugerido que el ORF2 codifica una proteína nuclear de exportación. Se ha establecido la hipótesis de un tercer ORF. 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 (1, 6, 13, 14, 24).

El análisis de la secuencia de distintos segmentos de genes ha puesto de manifiesto diferencias entre cepas tanto dentro como entre zonas geográficas definidas (1, 14, 24). En función de diferencias en la secuencia de la región 5' del gen HE, las cepas del VAIS se han clasificado en dos grupos principales, el europeo y el norteamericano. El grupo europeo puede dividirse, a su vez, en tres grupos principales (1). Se ha identificado una pequeña región altamente polimórfica (HPR) del gen de la hemaglutinina (18). Esta región se caracteriza por la presencia de huecos más que por sustituciones de un solo nucleótido. Sin embargo, en la HPR no existe correlación directa entre grupos filogenéticos y patrones de delección. Se ha sugerido que un gen de longitud total (HPR0) constituye una variante precursora a partir de la cual se originan todas las variantes con delecciones de la región de la HPR. Se ha observado la presencia de variantes del HPR0 tanto en salmón del Atlántico salvaje como en el salmón criado en el mar (1, 14), pero no se ha detectado en peces con enfermedad clínica ni con signos anatomopatológicos compatibles con la AIS. Se ha sugerido que las variaciones en el HPR entre cepas víricas son importantes para la virulencia, dado que todos los peces enfermos contienen delecciones en esta región. Sin embargo, no hay duda de que existen otros genes que también son importantes para la virulencia, porque cepas con HPR idénticos presentan considerables variaciones en cuanto al desarrollo y gravedad de la enfermedad (19). Recientemente se ha identificado un posible marcador de virulencia en el segmento 5 que codifica la proteína de adsorción y que afecta al patrón de reconocimiento de la proteasa en el punto de unión de la proteína de adherencia (17). Además, se han aportado pruebas de reagrupamiento y recombinación no homóloga del VAIS (3, 17).

2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

Se ha detectado el ARN del VAIS mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) en agua de mar extraída de lugares de cría con salmones del Atlántico positivos al VAIS (14). 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 fijar o inactivar el virus, radiación UV o la temperatura. La exposición del 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 (5).

2.1.3. Estabilidad del agente (métodos eficaces de inactivación)

El VAIS es sensible a la radiación UV (UVC) y al ozono (1). Se obtuvo una reducción de 3 niveles logarítmicos en la infectividad en agua dulce y en agua de mar estériles con unas dosis de UVC de alrededor de 35 Jm⁻² y de 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. 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 (5). La incubación de homogenado de tejido de peces enfermos por AIS a un pH de 4 o 12 durante 24 horas inactivó la infectividad de la AIS. La incubación en presencia de cloro (100 mg ml⁻¹) durante 15 minutos también inactivó la infectividad del virus (1).

2.1.4. Ciclo de vida

Es probable que la principal vía de transmisión sean las branquias, pero no puede excluirse la infección por el intestino. Las células endoteliales parecen ser las células diana principales del VAIS, según observaciones realizadas mediante microscopía electrónica (1, 14, 24). Esto se ha confirmado recientemente mediante examen por inmunohistoquímica de varios órganos (*National Veterinary Institute*, Noruega, resultados no publicados) e hibridación *in-situ* (14). También se ha observado replicación del virus en leucocitos, y los macrófagos sinusoides del tejido renal presentan tinción positiva para el VAIS al utilizar inmunohistoquímica (IHC). Dado que las células endoteliales son las células diana, puede producirse replicación vírica en varios órganos. En estudios de hibridación *in situ* se ha observado que la replicación más extensa y prolongada tiene lugar en el tejido cardíaco (14).

La molécula del VAIS con actividad hemaglutinina-esterasa, como la hemaglutinina de otros ortomixovirus, es crucial para la unión del virus a restos de ácido siálico de la superficie celular. En el caso del VAIS, el virus se une a glucoproteínas que contienen ácidos siálicos 4-O-acetilados, que también funcionan como sustrato para la enzima destructora de receptores. La posterior captación y replicación parecen seguir la vía descrita para los virus de la influenza A, como lo indican una adsorción dependiente de un pH bajo, la inhibición de la replicación por la actinomicina D y la α -amanitina, la acumulación temprana de nucleoproteína seguida de la proteína de la matriz en el núcleo y la gemación desde la superficie celular (1, 14, 24).

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

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Solo se han registrado brotes naturales de AIS en salmón del Atlántico de piscifactoría, pero el virus se ha aislado de trucha arco iris en Irlanda (7) y existe un informe de aislamiento del VAIS de salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) en Chile (14). Mediante RT-PCR se han identificado ejemplares de salmones del Atlántico, de trucha marina (*S. trutta*) y trucha común infectados de forma subclínica (14, 23). En peces de mar, la detección del VAIS mediante RT-PCR se ha notificado en tejidos de carbonero (*Pollachius virens*) y de bacalao (*Gadus morhua*), pero solo en peces obtenidos de jaulas con salmón del Atlántico que presentaron AIS (14). En estos estudios, solo se obtuvieron resultados débilmente positivos, y se incluyeron las branquias en las muestras de tejido examinadas. Por tanto, no puede excluirse que las aguas circundantes estuvieran contaminadas con el virus, y se precisan estudios confirmativos para poder identificar estas especies como posibles hospedadores del VAIS.

Tras la infección experimental, se ha observado la replicación del VAIS mediante en varias especies de peces, como la trucha común, la trucha marina, la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), la trucha alpina (*Salvelinus alpinus*), el arenque del Atlántico (*Clupea harengus*) (1, 14, 24) y el bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) (10). Se ha introducido mortalidad y alteraciones histopatológicas en trucha arco iris mediante infección experimental, aunque las características de las lesiones fueron distintas de las del salmón del Atlántico (16). Se han realizado intentos de inducir infección o enfermedad en *P. virens*, pero con resultados negativos (14).

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

En el salmón del Atlántico, 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 (1). Se ha inducido experimentalmente AIS tanto en alevines como en pintos de salmón del Atlántico mantenidos en agua dulce. La genética también puede desempeñar un importante papel en la susceptibilidad del salmón del Atlántico a la AIS, ya que se han observado diferencias de susceptibilidad entre distintos grupos familiares (1). Además, se ha observado una asociación funcional entre la resistencia a la enfermedad y el polimorfismo de las clases I y II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) (9). La utilización de salmón del Atlántico compatible con MHC indicó que la capacidad de generar una respuesta proliferativa fuerte se correlacionaba con la supervivencia y la eliminación del virus, mientras que la inducción de una respuesta humoral fue menos protectora (19).

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

La AIS es principalmente una enfermedad del salmón del Atlántico.

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

Células endoteliales de muchos órganos (corazón, hígado, riñón, bazo y otros).

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

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 causan ningún problema patológico reconocible. La infección experimental de la trucha arco iris y la trucha común indica que en estas especies podrían tener lugar una infección persistente (1, 14, 24). En el apartado 2.4.1 se explica la posible creación de portadores del virus mediante vacunación.

2.2.6. Vectores

En condiciones experimentales se ha observado la transferencia pasiva de la AIS por los piojos del salmón (*Lepeophtheirus salmonis*). Aunque no se han identificado vectores naturales, otros varios grupos de vectores podrían ser posibles vectores en ciertas condiciones definidas.

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

Tanto el salmón del Atlántico como la trucha común o la trucha marina (*S. trutta*) pueden ser portadores del VAIS (1, 23). La importancia de los peces marinos (véase el apartado 2.2.1) como portadores del virus todavía debe aclararse.

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mecanismos de transmisión

La enfermedad se disemina horizontalmente mediante transmisión por el agua, como se ha observado en estudios de infecciones experimentales. No existen pruebas sólidas de una transmisión vertical por los productos gonadales infectados. Se ha sugerido que el VAIS se disemina a los largo de grandes distancias por el transporte de murgones, o bien infectados antes del envío o bien por contenedores contaminados con el VAIS. La contaminación de contenedores puede deberse a un transporte previos de peces infectados o a la toma de agua procedente de zonas en las que haya piscifactorías que alberguen peces con la enfermedad.

En estudios epidemiológicos se ha observado que el riesgo de transmisión de la AIS está estrechamente relacionado con las prácticas de manejo en acuicultura y con la transmisión horizontal. Se consideran factores importantes de riesgo la proximidad geográfica e hidrológica (por corrientes prevalentes) (<5 km) a piscifactorías con brotes de AIS o plantas de sacrificio o procesado que liberen agua contaminada, las numerosas entregas de peces en fase de murgón y el uso de contenedores de transporte, así como el compartir personal y equipamiento (1, 11, 15, 25).

También se han sugerido otras vías horizontales, como la transmisión por piojos de mar, peces salvajes infectados y distintos métodos de recolección (14, 24). Según Nylund *et al.* (22), puede producirse transmisión vertical o transgeneracional. El arrastre o acumulación de grupos de varias edades en un lugar determinado, o dentro de una zona conectada hidrológicamente, también puede influir en la aparición de la AIS (11).

2.3.2. Prevalencia

En una jaula de red que contenga peces enfermos, la prevalencia puede variar mucho, mientras que en jaulas de red adyacentes 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.

2.3.3. Distribución geográfica

Notificada por primera vez en Noruega a mediados de los años 1980, la AIS se ha notificado desde entonces en Canadá (New Brunswick en 1996 y Nueva Escocia en 2000), el Reino Unido (Escocia en 1998), las Islas Faroe (2000, notificación a la OIE), EE.UU. (Maine en 2001) y en Chile (1, 8, 14, 24). Se notificó la presencia de virus en trucha arco iris de Irlanda en 2002 (7) y en salmón Coho de Chile (14).

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

La morbilidad y la mortalidad pueden variar en gran medida dentro de una misma jaula de red y entre distintas jaulas de una piscifactoría de agua marina, así como entre distintas 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 parece alcanzar el pico a primeros de verano y en invierno. El intervalo de mortalidades acumuladas durante un brote va de insignificantes a moderadas, pero en los casos graves puede tener lugar una mortalidad acumulada superior al 90% durante un periodo de, por ejemplo, 3 meses. Inicialmente, un brote de AIS puede limitarse a una o dos jaulas de red a lo largo de un periodo largo, y la transmisión a otras jaulas de red puede tardar meses, pero se ralentiza mediante la detección y despoblación precoces de las jaulas infectadas. En los brotes en los que se han infectado murgones en contenedores durante el transporte, pueden tener lugar brotes simultáneos.

2.3.5. Factores ambientales

En general, se han registrado brotes de AIS en distintos momentos 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 (15).

2.4. Control y prevención

2.4.1. Vacunación

En Norteamérica y en las islas Faroe se ha realizado vacunación contra la AIS durante los últimos 5 años, pero las vacunas de las que se dispone actualmente no parecen ofrecer una protección completa en el salmón del Atlántico. Las vacunas, que son inactivadas y contienen el virus entero, no dan lugar a la eliminación del virus en los peces inmunizados, lo cuales, por tanto, pueden convertirse en portadores (14).

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

No es aplicable.

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.

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.

2.4.8. Prácticas generales de manejo

La incidencia de la AIS 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.

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

A continuación se describe principalmente la verificación de casos que son sospechosos por los signos clínicos y las lesiones macroscópicas o por resultados positivos en la RT-PCR para el VAIS.

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
Inmunocitoquímica (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

Para la verificación del VAIS no se recomienda la combinación de varias muestras, puesto que suele ser interesante comparar los resultados de los distintos exámenes realizados en cada individuo. A efectos de vigilancia, puede ser aceptable la combinación de varias muestras para el examen virológico (PCR y/o cultivo celular). Sin embargo, el número de peces a combinar puede depender de la prevalencia sugerida del VAIS en la población y del método utilizado.

3.4. Órganos y tejidos de elección

Sangre para muestreo no letal;
Examen virológico (cultivo celular y PCR): corazón (siempre se debe incluirse) y riñón medio. A efectos de vigilancia mediante PCR, también deben incluirse las branquias.
Histología (priorizada): riñón medio, hígado, corazón, páncreas/intestino, bazo, branquias, piel/músculo;
Inmunocitoquímica (frotis): riñón medio;
Inmunohistoquímica: riñón medio, corazón (incluyendo las válvulas y el bulbo arterioso).

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

Para el aislamiento del virus, no se recomiendan las branquias, puesto que es bastante difícil evitar la contaminación microbiana de cultivos celulares inoculados con homogenado de branquias, incluso tras una adecuada filtración.

4. Métodos de diagnóstico

Inicialmente, el diagnóstico de la AIS se basaba solo en los hallazgos clínicos y anatomopatológicos (14, 24). Tras el aislamiento del agente causal, se han establecido varios métodos directos para la detección del virus y la confirmación del diagnóstico. Estos son el aislamiento del virus en cultivo celular seguido de la identificación inmunológica, la demostración inmunológica del antígeno del VAIS en tejidos y técnicas de PCR. Los diagnósticos diferenciales son: otros trastornos anémicos y hemorrágicos, y la úlcera de invierno y septicemias causadas por infecciones por *Moritella viscosa*

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

Los signos externos más llamativos 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 cutáneas, sobre todo en el abdomen, así como edema en la bolsa de las escamas.

El estado nutricional suele ser bastante normal, pero los peces enfermos no tienen alimento en el tracto digestivo.

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

En general, el salmón del Atlántico infectado de forma natural por la AIS está aletargado y tal vez se mantenga cerca de la pared de la jaula de red.

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

Los peces infectados con el VAIS 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 AIS, pero siempre hay anemia y perturbaciones circulatorias. Se ha descrito que los siguientes hallazgos son compatibles con la AIS.

- 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 por las superficies de los cortes.
- Hemorragias petequiales 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 AIS.
- 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.

Un hematocrito inferior a 10 no es un hallazgo exclusivo de la AIS. Los peces con trastornos patológicos como úlceras y el síndrome de los cuerpos de inclusión eritrocitarios podrían presentar con frecuencia valores de hematocrito igual de bajos.

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. Microscopía electrónica/citopatología

Se ha observado virus en células endoteliales de todo el cuerpo 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

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) Preparaciones de cortes congelados

Se toman muestras de tejido de riñón, hígado y corazón de peces moribundos, se congelan en isopentano, se refrigeran en nitrógeno líquido y se guardan a -80°C. Se realizan cortes con un criostato, se sitúan sobre portaobjetos recubiertos de poli-L-lisina, se fijan en acetona fría al 100% 10 minutos y se guardan a -80°C hasta que se utilicen.

iii) 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 utilizan anticuerpos policlonales contra la nucleoproteína del VAIS en cortes de tejido incluidos en parafina y fijados 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 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 suero de cabra al 2% en TBS 50 mM (TBS; Tris/HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6) durante 20 minutos.
- b) A continuación, se incuban los cortes toda la noche con anticuerpo primario (anticuerpo de conejo mono específico contra la nucleoproteína del VAIS) diluido en TBS 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 tinción roja citoplasmática e intranuclear de las células endoteliales en los vasos sanguíneos o el endocardio del corazón claramente visible. 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 del 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

Pueden emplearse SHK-1 (2), ASK (4) u otras líneas celulares susceptibles, como TO y CHSE-214 (14), pero debe tenerse en cuenta la variabilidad de la cepa y la capacidad de replicación en distintas líneas celulares. Las células SHK-1 y ASK parecen permitir 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 ASK parecen perder susceptibilidad al VAIS 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 y según el tipo de placas de cultivo celular utilizadas. Deben inocularse controles positivos con diluciones seriadas del VAIS 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 ni 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 de 24 pocillos. Se inoculan las monocapas con 0,1 ml del homogenado de tejido al 2%. Se dejan incubar 3 a 4 horas a 15°C y después se retira el inóculo y se añade medio de crecimiento fresco totalmente suplementado. 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 antiseros contra los serotipos correspondientes del VNPI antes de la inoculación.

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 es la presencia de células vacuolizadas que a continuación se redondean y se desprenden de la superficie de cultivo. Si aparece un ECP compatible con el descrito para el VAIS 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 antiseros 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 mediante inmunofluorescencia (IFAT), hemadsorción o PCR, puesto que puede producirse replicación del virus sin que se observe ECP.

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 sobre una plataforma mecedora 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 de plástico 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 en una dilución adecuada en PBS que contenga leche desnatada en polvo al 0,5% durante 1 hora, y se lavan dos veces con PBS/Tween 20 al 0,05%.
- v) Se incuban con anticuerpos de cabra anti Ig de ratón y conjugados con ITCF durante 1 hora, (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). Si las placas no pueden examinarse de inmediato, se añade una solución de 1,4-diazabicyclo octano (DABCO al 2,5% en PBS, pH 8,2) o un reactivo similar, como solución anti-decoloración. Se examinan bajo luz UV.

4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

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

Para la detección del VAIS en muestras de tejido o en muestras de cultivos celulares puede utilizarse RT-PCR. Debe tenerse cuidado al interpretar los resultados del cultivo celular, puesto que la detección de virus no necesariamente indica que se haya producido replicación del mismo, sino que puede tratarse de virus que queda en el cultivo celular tras la inoculación con una muestra de tejido.

Se extrae ARN total (o ácido nucleico total) de tejidos, homogenados tisulares o capas celulares infectadas. La concentración y la pureza del ácido nucleico extraído se pueden estimar midiendo la densidad óptica a 260 nm y a 280 nm. Un sistema alternativo es incluir controles internos dirigidos contra ARN del hospedador. Para la detección de ácidos nucleicos víricos en tejido de pez, se han utilizado con éxito cebadores contra ARNr 18s, factor de elongación 1 alfa (ELF-1A) o ARN polimerasa 1 como controles internos.

Desde que en 1997 se comunicó la primera RT-PCR realizada para el VAIS, se han realizado varios intentos de optimizar el método (en la referencia 20 se ofrece una revisión). Puede realizarse una RT-PCR de dos pasos en la que la RT y la PCR se ejecutan en tubos independientes. La introducción de procedimientos de un solo paso, en los que se ejecutan las dos reacciones en un solo tubo, ha funcionado en cuanto a sensibilidad de la prueba. No obstante, en este caso no queda ADNc para utilizarlo en otras amplificaciones, lo cual podría ser un inconveniente si en el examen tienen que incluirse varios conjuntos de cebadores.

Se han estudiado varios conjuntos de cebadores para la RT-PCR del VAIS, y algunos se indican en la siguiente tabla. Los conjuntos de cebadores que derivan del segmento genómico 8 (ILA1/ILA2) se han utilizado en varios laboratorios y se ha observado que son adecuados para la detección del VAIS durante brotes de la enfermedad y en peces portadores. El cebador inverso ILA2 no sirve para cepas de Norteamérica, de modo que deben utilizarse otros conjuntos de cebadores. En estos casos, puede emplearse un cebador FA3 modificado junto con un RA3. Los cebadores del segmento 6 pueden ser útiles para verificar resultados de la PCR basados en cebadores del segmento 8, como alternativa a la secuenciación del producto de la PCR.

RT-PCR: Secuencias de los cebadores	Denominación	Segmento genómico	Tamaño del producto	Referencia
5'-GGC-TAT-CTA-CCA-TGA-ACG-AAT-C-3'	ILA1	8	155	(20)

5'-GCC-AAG-TGT-AAG-TAG-CAC-TCC-3'	ILA2			
5'-GAA-GAG-TCA-GGA-TGC-CAA-GAC-G-3' 5'-GAA-GTC-GAT-GAA-CTG-CAG-CGA-3'	FA3 RA3	8	211	(4)
5'-GGA-ATC-TAC-AAG-GTC-TGC-ATT-G-3' 5'-CTT-CAA-AGG-TGT-CTG-ACA-CGT-A-3'	Seg6U Seg6L	6	130	Diseñado por el Lab. De Ref. de la OIE

La utilización de RT-PCR en tiempo real puede aumentar la especificidad y, probablemente, también la sensibilidad de la prueba, sobre todo cuando se incluye una sonda específica de secuencia (23, 36, 27). Este método es más rápido que la RT-PCR convencional de un solo tubo, se puede reducir el riesgo de contaminación y permite estimar la cantidad relativa de ARN vírico de la muestra. En la siguiente tabla se indican las secuencias de cebador y de sonda utilizadas para detectar el VAIS mediante RT-PCR en tiempo real. Tanto los cebadores como las sondas indicados en esta tabla tienen por diana regiones conservadas de todas las cepas del VAIS, y garantizan la detección de todas las cepas documentadas (26).

RT-PCR en tiempo real: Secuencias de cebadores y sondas	Denominación	Segmento genómico	Referencia
5'- CAGGGTTGTATCCATGGTTGAAATG -3' 5'- GTCCAGCCCTAAGCTCAACTC -3' 5'-6FAM- CTCTCTCATTGTGATCCC-MGB MGBNFQ-3'	Cebador directo Cebador indirecto Sonda Taqman®	7	(26)
5'- CTACACAGCAGGATGCAGATGT -3' 5'- CAGGATGCCGGAAGTCGAT -3' 5'-6FAM- CATCGTCGCTGCAGTTC -TAMRA-3'	Cebador directo Cebador indirecto Sonda Taqman®	8	(26)

Como alternativa, puede utilizarse la sonda ILAS7 de la lista de la tabla siguiente, que se ha comprobado que es eficaz para la detección de cepas europeas del VAIS.

RT-PCR en tiempo real: Secuencias de cebadores y sondas	Denominación	Segmento genómico	Referencia
5'-TGG-GAT-CAT-GTG-TTT-CCT-GCT-A-3' 5'-GAA-AAT-CCA-TGT-TCT-CAG-ATG-CAA-3' 5'-6FAM-CACATGACCCCTCGTC-MGBNFQ-3'	ILAS7-F1 ILAS7-R1 Sonda ILAS7	7	(23)

4.3.1.2.4. Purificación del agente

El VAIS propagado en cultivo celular puede purificarse mediante centrifugación con gradiente de sacarosa (5) o mediante purificación por afinidad utilizando perlas inmunomagnéticas recubiertas con MAb anti VAIS.

4.3.2. Métodos serológicos

Tanto el salmón del Atlántico como la trucha arco iris desarrollan una respuesta inmunitaria humoral contra la infección por el VAIS. Se han creado enzimo-inmunoanálisis (ELISA) con virus purificado o lisados de cultivos celulares infectados con el VAIS para la detección de anticuerpos específicos del VAIS. Los títulos de ELISA pueden ser muy altos y parecer bastante específicos de la nucleoproteína en inmuno-electrotransferencias (K. Falk, comunicación personal). La prueba no está estandarizada para la vigilancia ni el diagnóstico, pero puede utilizarse como complemento de la detección directa del virus y la enfermedad en casos ambiguos. Además, el nivel y la distribución de la seroconversión en una población infectada por el VAIS puede dar cierta información sobre la transmisión de la infección, sobre todo en casos en que no se vacuna, y en peces salvajes.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

Como ejemplo, los métodos actualmente disponibles para la vigilancia dirigida y el diagnóstico de la anemia infecciosa del salmón se detallan en la Tabla 5.1. 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 del VAIS				Diagnóstico provisional de la AIS	Diagnóstico confirmativo de la AIS
	Larvas	PL	Juveniles	Adultos		
Signos macroscópicos	d	d	d	d	c	b
Histopatología	d	d	d	b	b	b
IFAT en improntas de riñón	c	c	c	c	b	a
Inmunohistoquímica	c	c	c	c	b	a
ME de transmisión	d	d	d	d	c	d
Aislamiento en cultivo celular con identificación del virus	a	a	a	a	a	a
RT-PCR o RT-PCR en tiempo real (Secuenciación para la genotipificación)	a	a	a	a	b	a

PL = postlarvas; 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 la anemia infecciosa del salmón

Ninguno de los métodos descritos arriba se ha evaluado a efectos de la declaración de ausencia del virus o de la enfermedad, puesto que no se dispone de datos sobre la prevalencia ni la distribución del VAIS en poblaciones de peces infectadas de forma subclínica. Las inspecciones periódicas combinadas con un estudio de la AIS cuando una alta mortalidad se asocia a uno de los signos clínicos y/o alteraciones anatomopatológicas compatibles con la AIS pueden constituir una forma eficaz de obtener datos sobre la prevalencia de la AIS en poblaciones de piscifactoría. Como alternativa, puede llevarse a cabo un análisis de detección del VAIS, preferiblemente mediante PCR, a determinados intervalos de tiempo, además de inspecciones sanitarias periódicas. No obstante, no está claro hasta qué punto un resultado positivo mediante la PCR indica riesgo de aparición de AIS, de tal modo que dichos resultados positivos deberán interpretarse con cautela.

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

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

7.1. Definición de caso sospechoso

Se sospechará de AIS o de infección por el VAIS si se cumple al menos uno de los siguientes criterios:

- i) Signos clínicos compatibles con la AIS o alteraciones anatomopatológicas compatibles con la AIS (apartado 4.2), tanto si las alteraciones anatomopatológicas se asocian a signos clínicos de enfermedad como si no;
- ii) Aislamiento e identificación del VAIS en cultivo celular a partir de una sola muestra (buscada o aleatoria) de cualquier pez de la piscifactoría, como se describe en el apartado 4.3.1.2.1;
- iii) Indicios de la presencia del VAIS en dos pruebas de laboratorio independientes, como la RT-PCR (apartado 4.3.1.2.3) y la IFAT en improntas de tejido (apartado 4.3.1.1.2).
- iv) Detección de anticuerpos contra el VAIS.

7.2. Definición de caso confirmado

Para confirmar la AIS, deben cumplirse los criterios del punto i). Para confirmar la infección por el VAIS, deben cumplirse los criterios de los puntos ii) e iii).

- i) Mortalidad, signos clínicos y alteraciones anatomopatológicas compatibles con la AIS (apartado 4.2), y detección del VAIS en preparaciones de tejido mediante anticuerpos específicos contra el VAIS (IFAT en improntas de tejido [apartado 4.3.1.1.2] o cortes fijados, como se describe en el apartado 4.3.1.1.3) además de:
 - a) aislamiento e identificación del VAIS en cultivo celular a partir de al menos una muestra de cualquier pez de la piscifactoría, como se describe en el apartado 4.3.1.2.1
 - o
 - b) detección del VAIS mediante RT-PCR por los métodos descritos en el apartado 4.3.1.2.3;
- ii) Aislamiento e identificación del VAIS en cultivo celular a partir de al menos dos muestras independientes (buscadas o aleatorias) de cualquier pez de la piscifactoría analizado en ocasiones distintas como se describe en el apartado 4.3.1.2.1;
- iii) Aislamiento e identificación del VAIS en cultivo celular a partir de al menos una muestras de cualquier pez de la piscifactoría con signos confirmativos de VAIS en preparaciones tisulares empleando RT-PCR (apartado 4.3.1.2.3) o IFAT (apartados 4.3.1.1.2 y 4.3.1.1.3).

8. Bibliografía

1. ANONYMOUS (2007). Which risk factors relating to spread of Infectious Salmon Anaemia (ISA) require development of management strategies? Norwegian Scientific Committee for Food Safety. <http://www.vkm.no/eway/library/openForm.aspx?param1=17005¶m5=read>
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. GARCIA-ROSADO E., MARKUSSEN T., KILENG Ø., BAEKKEVOLD E.S., ROBERTSEN B., MJAALAND S. & RIMSTAD E. (2008). Molecular and functional characterization of two infectious salmon anaemia virus (ISAV) proteins with type I interferon antagonizing activity. *Virus Res.*, **133**, 228–238.

7. GEOGHEGAN F. (2002). First isolation and identification of ISAV in Ireland. 6th Annual Meeting of EU National Reference Laboratories for Fish Diseases, Brussels, Belgium, 23–24 September 2002.
8. GODOY M.G., AEDO A., KIBENGE M.J.T., GROMAN D.B., YASON C.V., GROTHUSEN H., LISPERGUER A., CALBUCURA M., AVENDAÑO F., IMILÁN M., JARPA M. & KIBENGE F.S.B (2008). First detection, isolation and molecular characterization of ISAV associated with clinical disease in farmed Atlantic salmon in Chile. *BMC Vet. Res.*, **4**, 28.
9. GRIMHOLT U., LARSEN S., NORDMO R., MIDTLING P., KJOEGLUM S., STORSET A., SAEBO S. & STET R.J. (2003). MHC polymorphism and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*); facing pathogens with single expressed major histocompatibility class I and class II loci. *Immunogen.*, **55**, 210–219.
10. GROVE S., HJORTAAS M.J., REITAN L.J. & DANNEVIG B.H. (2007). Infectious salmon anaemia virus (ISAV) in experimentally challenged Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Arch. Virol.*, **152**, 1829–1837.
11. 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.
12. 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.
13. KIBENGE F.S., XU H., KIBENGE M.J., QIAN B. & JOSEPH T. (2007). Characterization of gene expression on genomic segment 7 of infectious salmon anaemia virus. *Viol. J.*, **4**, 34.
14. 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.
15. LYGSTAD 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.
16. MACWILLIAMS C., JOHNSON G., GROMAN D. & KIBENGE F.S. (2007). Morphologic description of infectious salmon anaemia virus (ISAV)-induced lesions in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* compared to Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis. Aquat. Org.*, **78**, 1–12.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. MJAALAND S., RIMSTAD E. & CUNNINGHAM C.O. (2002). Molecular diagnosis of infectious salmon anaemia. *In: Molecular Diagnosis of Salmonid Diseases*, Cunningham C.O., ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1–22.
21. 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.
22. 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.
23. 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.

24. RIMSTAD E. & MJAALAND S. (2002). Infectious salmon anaemia virus. An orthomyxovirus causing an emerging infection in Atlantic salmon. *APMIS*, **110**, 273–282.
25. SCHEEL I., ALDRIN M., FRIGESSI A. & JANSEN P. A. (2007). A stochastic model for infectious salmon anemia (ISA) in Atlantic salmon farming. *J. Royal Soc. Interface*, **4**, 699–706.
26. 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.
27. SNOW M., MCKAY P. & MATEJUSOVA I. (2009). Development of a widely applicable positive control strategy to support detection of infectious salmon anaemia virus (ISAV) using Taqman real-time PCR. *J. Fish Dis.*, **32**, 151–156.
28. 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 Anemia infecciosa del salmón (puede consultarse la lista actualizada en la Tabla del final de este *Manual Acuático* o en la página web de la OIE: www.oie.int).