

# COMISIÓN

## DECISIÓN DE LA COMISIÓN

de 13 de junio de 2003

por la que se establecen los criterios para la delimitación de zonas y la adopción de medidas oficiales de vigilancia ante la sospecha o la confirmación de anemia infecciosa del salmón (AIS)

[notificada con el número C(2003) 1831]

(Texto pertinente a efectos del EEE)

(2003/466/CE)

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea,

Vista la Directiva 91/67/CEE del Consejo, de 28 de enero de 1991, relativa a las condiciones de policía sanitaria aplicables a la puesta en el mercado de animales y de productos de la acuicultura <sup>(1)</sup>, cuya última modificación la constituye el Reglamento (CE) n° 806/2003 <sup>(2)</sup>, y, en particular, su artículo 15,

Vista la Directiva 93/53/CEE del Consejo, de 24 de junio de 1993, por la que se establecen medidas comunitarias mínimas de lucha contra determinadas enfermedades de los peces <sup>(3)</sup>, cuya última modificación la constituye la Decisión 2001/288/CE de la Comisión <sup>(4)</sup>, y, en particular, el apartado 2 de su artículo 5 y su artículo 6,

Considerando lo siguiente:

- (1) La Directiva 93/53/CEE establece que las operaciones de muestreo y los análisis de laboratorio para la detección de enfermedades de las listas I y II del anexo A de la Directiva 91/67/CEE deben llevarse a cabo según los métodos fijados de conformidad con el artículo 15 de la Directiva 91/67/CEE.
- (2) Los planes de muestreo y los métodos de diagnóstico para la detección y la confirmación de la septicemia hemorrágica vírica (SHV) y la necrosis hematopoyética infecciosa (NHI), enfermedades de peces de la lista II, se establecen en la Decisión 2001/183/CE de la Comisión <sup>(5)</sup>.
- (3) De acuerdo con el apartado 2 del artículo 5 y el artículo 6 de la Directiva 93/53/CEE, todas las piscifactorías situadas en la misma cuenca hidrográfica o zona costera que otra piscifactoría donde se sospeche o se haya confirmado la infección por el virus de la anemia infecciosa del salmón (AIS) deberán ser colocadas bajo vigi-

lancia oficial. Es preciso por lo tanto establecer los criterios para la delimitación de zonas y la aplicación de las medidas oficiales de vigilancia.

- (4) Se ha consultado a expertos en cuestiones ictiosanitarias y de laboratorio para establecer los planes de muestreo y los métodos de diagnóstico para la detección y la confirmación de AIS, así como para determinar los criterios de delimitación de zonas y aplicación de medidas oficiales de vigilancia ante la sospecha o la confirmación de la AIS. Es preciso tener asimismo en cuenta las directrices para el diagnóstico de la AIS establecidas en la última edición del *Manual de diagnóstico de enfermedades de animales acuáticos* de la Oficina internacional de epizootias (OIE).
- (5) Debe preverse un plazo suficiente para la aplicación de estas nuevas disposiciones.
- (6) Las medidas previstas en la presente Decisión se ajustan al dictamen del Comité permanente de la cadena alimentaria y de sanidad animal.

HA ADOPTADO LA PRESENTE DECISIÓN:

### Artículo 1

Los planes de muestreo y los métodos de diagnóstico para la detección y la confirmación de la anemia infecciosa del salmón (AIS), así como los criterios de delimitación de zonas y aplicación de medidas oficiales de vigilancia ante la sospecha o la confirmación de AIS se establecen en el anexo de la presente Decisión.

### Artículo 2

La presente Decisión se aplicará el 23 de octubre de 2003.

<sup>(1)</sup> DO L 46 de 19.2.1991, p. 1.

<sup>(2)</sup> DO L 122 de 16.5.2003, p. 1.

<sup>(3)</sup> DO L 175 de 19.7.1993, p. 23.

<sup>(4)</sup> DO L 99 de 10.4.2001, p. 11.

<sup>(5)</sup> DO L 67 de 9.3.2001, p. 65.

*Artículo 3*

Los destinatarios de la presente Decisión serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 13 de junio de 2003.

*Por la Comisión*  
David BYRNE  
*Miembro de la Comisión*

---

## ANEXO

**planes de muestreo y métodos de diagnóstico para la detección y la confirmación de la anemia infecciosa del salmón (AIS) y criterios de delimitación de zonas y aplicación de medidas oficiales de vigilancia ante la sospecha o la confirmación de AIS**

## INTRODUCCIÓN Y DEFINICIONES

El presente anexo:

- a) establece las directrices y los requisitos mínimos de los planes de muestreo y los métodos de diagnóstico para la detección y la confirmación de la AIS;
- b) integra las disposiciones y definiciones de las Directivas 91/67/CEE y 93/53/CEE;
- c) establece disposiciones para el diagnóstico adecuado, el control y la vigilancia de la AIS, en caso de sospecha o confirmación de esa enfermedad;
- d) se dirige tanto a las autoridades responsables de la lucha contra la AIS como al personal de laboratorio que lleva a cabo los análisis relacionados con esta enfermedad. Para ello, hace especial hincapié en los procedimientos de muestreo, los principios y la aplicación de los análisis de laboratorio, la evaluación de los resultados de éstos y las técnicas de laboratorio detalladas. No obstante, cuando lo consideren apropiado, los laboratorios podrán introducir modificaciones en los análisis que se describen en el presente anexo, e incluso efectuar análisis diferentes, siempre que puedan demostrar que éstos son de igual o superior sensibilidad y especificidad. Además, se establecen los criterios para la delimitación de zonas y la adopción de medidas de vigilancia ante la sospecha o la confirmación de AIS.

A efectos del presente anexo, se entenderá por:

«Cuenca hidrográfica»: la totalidad de la cuenca hidrográfica, desde el nacimiento de las vías fluviales hasta el mar, o una parte de una cuenca hidrográfica, desde el nacimiento de las vías fluviales hasta una barrera natural o artificial que impida la migración de los peces a partir de esa barrera.

«Zona costera»: parte de la costa, de las aguas marítimas o de un estuario con una delimitación geográfica precisa, consistente en un sistema hidrodinámico homogéneo o una serie de sistemas de tales características.

En la parte I se establecen los principios generales y los criterios para el diagnóstico y la confirmación de la AIS, así como los criterios para la delimitación de zonas y la aplicación de medidas oficiales de vigilancia ante la sospecha o la confirmación de AIS.

En la parte II se establecen las inspecciones y operaciones de muestreo que deben llevarse a cabo para detectar la AIS.

En la parte III se establecen los métodos que deben utilizarse para el examen virológico.

En la parte IV se describe el procedimiento de examen de las muestras mediante RT-PCR para la detección de la AIS.

En la Parte V se describe el protocolo que debe utilizarse para el examen de las improntas de riñón mediante IFAT (prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes) con vistas a la detección de la AIS.

La Parte VI incluye la metodología para la histología.

En la Parte VII se presenta una lista de las siglas y acrónimos utilizados.

**I. Criterios para el diagnóstico de la AIS, la delimitación de zonas y el establecimiento de ciertas medidas de lucha contra la enfermedad y de las medidas oficiales de vigilancia****I.1. Principios generales para el diagnóstico de la AIS**

En la parte I.2 del presente anexo se señalan los criterios que pueden dar lugar a sospechas fundadas de infección de los peces por el virus de la AIS. Los Estados miembros se asegurarán de que, ante la sospecha de que algún pez o piscifactoría están infectados por el virus de la AIS, se lleva a cabo lo más pronto posible una investigación oficial para confirmar o descartar la presencia de la enfermedad, mediante inspecciones, exámenes clínicos, toma y selección de muestras y aplicación de los métodos de análisis de laboratorio establecidos en las partes III a VI del presente anexo. Para confirmar oficialmente la presencia de la AIS, deberá cumplirse cualquiera de las tres series de criterios fijados en la parte I.3 del presente anexo.

**I.2. Sospecha de infección con AIS**

I.2.1. Deberá sospecharse la presencia de la AIS cuando se cumpla al menos uno de los criterios siguientes:

- a) observaciones en la autopsia coherentes con la presencia de la AIS, con o sin signos clínicos de la misma. Esas observaciones y los signos clínicos de la enfermedad deberán coincidir con los descritos en la última edición del *Manual de diagnóstico de enfermedades de animales acuáticos* de la OIE;
- b) aislamiento e identificación del virus de la AIS en un cultivo celular a partir de una sola muestra de cualquiera de los peces de la piscifactoría, según lo descrito en la parte III,

- c) datos que indiquen con fiabilidad suficiente la presencia del virus de la AIS, obtenidos como resultado de dos pruebas de laboratorio independientes, como RT-PCR (parte IV) e IFAT (parte V);
- d) transferencia de peces vivos a una piscifactoría donde existan motivos fundados para sospechar la presencia de la AIS en el momento de la transferencia de los peces;
- e) revelación, a raíz de una investigación, de vínculos epidemiológicos importantes con piscifactorías en las que se sospeche o se haya confirmado la presencia de la AIS.

I.2.2. Podrá descartarse toda sospecha de AIS cuando mediante investigaciones complementarias consistentes al menos en un examen clínico mensual durante un periodo de seis meses no se hayan revelado más pruebas significativas de la presencia de la AIS.

### I.3. Confirmación de la AIS

Se considerará confirmada la presencia de AIS cuando se cumplan los criterios indicados en las letras a), b) o c):

- a) observación de signos clínicos y resultados de la autopsia coherentes con la presencia de la AIS, con arreglo a la última edición del *Manual de diagnóstico de enfermedades de animales acuáticos* de la OIE, incluida la presencia de peces muertos, débiles o con comportamientos anómalos o signos de anemia, o de otros resultados de la autopsia y cambios patológicos, y detección de la AIS mediante uno o más de los métodos siguientes:
  - i) aislamiento e identificación del virus de la AIS en un cultivo celular a partir al menos de una muestra procedente de cualquier pez de la piscifactoría, según se describe en la parte III;
  - ii) detección del virus de la AIS mediante RT-PCR con arreglo a los métodos descritos en la parte IV,
  - iii) detección del virus de la AIS en tejidos o preparaciones tisulares mediante anticuerpos específicos frente al mismo (por ejemplo, mediante la prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes con improntas de riñón según lo descrito en la parte V);
- b) aislamiento e identificación del virus de la AIS en dos muestras procedentes de uno o más peces de la piscifactoría, analizadas en ocasiones separadas con el método descrito en la parte III;
- c) aislamiento e identificación del virus de la AIS al menos en una muestra procedente de cualquier pez de la piscifactoría con el método descrito en la parte III, y pruebas que confirmen la presencia del virus de la AIS en preparaciones tisulares obtenidas a partir de cualquier pez de la piscifactoría mediante RT-PCR (parte IV) o IFAT (parte V).

### I.4. Criterio para el establecimiento y la revocación de las zonas de control y de vigilancia oficial ante la sospecha y la confirmación de la AIS

I.4.1. Con el fin de establecer un programa oficial de vigilancia basado en el riesgo, los Estados miembros establecerán, en las inmediaciones de toda piscifactoría donde se sospeche o se haya confirmado oficialmente la infección con AIS, las zonas de control y de vigilancia apropiadas.

I.4.2. Las zonas por establecer se delimitarán mediante un análisis casuístico de los riesgos de propagación posterior de la enfermedad. En función de la situación epizootiológica, la cuenca hidrográfica o la zona costera afectadas:

- se declararán zonas de control, o
- podrán, en las cuencas hidrográficas o las zonas costeras extensas, dividirse en una zona de control y otra de vigilancia, siempre que ello no ponga en peligro la prevención de la propagación de la AIS.

Además, podrán establecerse cuantas zonas de vigilancia adicionales se consideren necesarias fuera de la cuenca hidrográfica o la zona costera.

I.4.3. Los principales factores que deberán tomarse en consideración para el establecimiento de las zonas antes mencionadas son aquéllos capaces de influir en los riesgos de propagación de la enfermedad entre los peces salvajes y de piscifactoría, como los siguientes: las cifras, tasa y distribución de la mortalidad de peces en la piscifactoría en la que se sospeche o se haya confirmado la presencia del virus de la AIS, las causas de la mortalidad en la piscifactoría afectada, la distancia a las piscifactorías cercanas y la densidad de las mismas, las piscifactorías que se hallen en contacto, las especies existentes en las piscifactorías, los métodos de gestión aplicados en las piscifactorías afectadas y cercanas, las condiciones hidrodinámicas y otros factores de significación epidemiológica determinados en el contexto de la investigación epizootica efectuada de acuerdo con el apartado 2 del artículo 5 y el artículo 8 de la Directiva 93/53/CEE.

I.4.4. Para el establecimiento de zonas se emplearán los criterios mínimos siguientes:

I.4.4.1. Los Estados miembros establecerán las siguientes «zonas de control» a inmediata proximidad de las piscifactorías donde se haya confirmado la infección por el virus de la AIS:

- en las zonas costeras: la zona incluida en un círculo de un radio de al menos una amplitud de marea, o 5 km, centrado en la piscifactoría donde se haya confirmado la infección por el virus de la AIS, o una zona equivalente según los datos hidrodinámicos o epidemiológicos apropiados, o
- en las zonas interiores: toda la cuenca hidrográfica de la piscifactoría donde se haya confirmado la infección por el virus de la AIS; en las cuencas amplias, el Estado miembro podrá limitar la extensión de la zona a ciertas partes de la cuenca hidrográfica, siempre que ello no ponga en peligro la prevención de la propagación de la AIS.

I.4.4.2. Se establecerá una «zona temporal de control» cuando se sospeche la presencia de AIS, con arreglo a los criterios ya indicados para la «zona de control».

I.4.4.3. Cuando así lo juzguen necesario, los Estados miembros establecerán «zonas de vigilancia» fuera de las zonas de control, en los lugares donde se considere suficiente una vigilancia menos intensiva:

- en las zonas costeras: una zona circundante a la zona de control donde se superpongan varias amplitudes de marea; o una zona circundante a la zona de control, incluida en un círculo de un radio de 10 km. desde el centro de la zona de control; o una zona equivalente determinada según los datos hidrodinámicos o epidemiológicos adecuados, o
- en las zonas continentales: si se considera necesario, una zona ampliada situada fuera de la zona de control establecida.

I.5. *Período de reposo y revocación de las zonas establecidas*

I.5.1. Las autoridades competentes de los Estados miembros deberán asegurarse de que todas las piscifactorías situadas en la zona de control cumplen un período adecuado de reposo tras haber sido vaciadas de peces y desinfectadas de la forma necesaria. La duración de este período en las piscifactorías donde se haya confirmado la infección con AIS no deberá ser inferior a seis meses; su duración en las demás piscifactorías de las zonas de control será determinada por la autoridad competente tras una evaluación caso por caso. Cuando todas las piscifactorías de la zona de control hayan sido vaciadas, se aplicará un período de al menos seis semanas de reposo sincronizada.

Además, la autoridad competente podrá disponer el reposo de las piscifactorías de las zonas de vigilancia establecidas.

I.5.2. Las zonas de control establecidas no podrán ser revocadas ni repobladas hasta que todas las piscifactorías de esas zonas hayan sido vaciadas de peces, desinfectadas del modo necesario y sometidas a un período de reposo de conformidad con el punto I.5.1. Durante su repoblación, las zonas de control se convertirán en zonas de vigilancia según lo establecido en el punto I.4.4.3.

I.5.3. Las zonas temporales de control establecidas no podrán revocarse hasta que no se haya despejado la sospecha de AIS con arreglo a lo dispuesto en la parte I.2.2. En caso de que se confirme la AIS de acuerdo con la parte I.3, las zonas temporales de control se convertirán en zonas de control.

I.5.4. Las zonas de vigilancia establecidas no podrán revocarse hasta que hayan transcurrido dos años desde la revocación de la zona de control.

I.6. *Vigilancia oficial ante la sospecha o la confirmación de AIS*

I.6.1. En relación con el apartado 2 del artículo 5 y el artículo 6 de la Directiva 93/53/CEE, y con el fin de determinar la distribución y la evolución de la enfermedad tras la sospecha o la confirmación de AIS en una piscifactoría, la autoridad competente o los servicios especializados en cuestiones ictosanitarias, en permanente consulta con la autoridad competente y bajo el control de la misma, deberán aplicar a todas las piscifactorías situadas en las zonas establecidas un programa oficial de vigilancia basado en el riesgo.

I.6.2. Con vistas a la aplicación de este programa oficial de vigilancia y, en caso necesario, mediante inspecciones sobre el terreno, la autoridad competente deberá identificar todas las piscifactorías de las zonas establecidas y compilar un censo oficial de las especies, categorías y cantidades de peces criados en dichas piscifactorías, incluyendo en el mismo las cifras de mortalidad.

- I.6.3. Tras ese censo oficial inicial, las piscifactorías situadas dentro de las zonas temporales de control que se dediquen a la cría de salmón atlántico (*Salmo salar*), o cualquier otra especie que, según la última edición del *Código sanitario para los animales acuáticos* de la OIE, sea sensible a la AIS o portadora potencial de esa enfermedad, presentarán cada 14 días a la autoridad competente una declaración sobre la mortalidad en la piscifactoría. El incremento de la mortalidad se declarará por día y jaula. La autoridad competente procederá a investigar todo incremento significativo de la mortalidad en una piscifactoría.

Si se confirma la sospecha, todas las piscifactorías de la zona de control establecida presentarán a la autoridad competente una declaración semanal de mortalidad, desglosada por jaula y día.

Las explotaciones de las zonas de vigilancia deberán presentar una declaración de mortalidad cada 14 días a las autoridades competentes.

Además, a lo largo del año se llevarán a cabo inspecciones periódicas en las zonas establecidas, con la frecuencia que se indica en el cuadro 1. No obstante, en las épocas del año cuyas condiciones climatológicas impidan la ejecución de esas inspecciones, los Estados miembros podrán determinar otras frecuencias en sus planes de emergencia.

Cuadro 1

## Programa oficial de vigilancia

Ubicación de la piscifactoría	Número mínimo de inspecciones anuales	Número mínimo de inspecciones anuales tras la revocación de la zona de control
Zona de control	12	
Zona de vigilancia	6	6
Zona temporal de control	6	

El programa de vigilancia se ejecutará hasta que se revoquen las zonas.

- I.6.4. Las inspecciones y las operaciones de selección, recogida, preparación y envío de las muestras se efectuarán conforme a lo descrito en las partes II.1 a II.4. El examen de las muestras se realizará de acuerdo con las partes III a VI.

## II. Inspección y toma de muestras

### II.1. Inspección, selección y recogida de muestras en las piscifactorías donde se sospeche la presencia de AIS

- II.1.1. Durante las inspecciones corrientes llevadas a cabo en el marco del programa oficial de vigilancia indicado en la parte I.6, y en las piscifactorías donde se sospeche la infección con AIS, todas las instalaciones de la piscifactoría (jaulas, tanques o estanques) se inspeccionarán en busca de peces muertos, débiles o con comportamientos anómalos. Siempre que sea posible, se procederá al examen de los peces recientemente muertos (no descompuestos), débiles o con comportamientos anómalos con vistas a la detección de signos clínicos o de observaciones de autopsia de AIS, según lo descrito en la última edición del *Manual de diagnóstico de enfermedades de animales acuáticos* de la OIE.
- II.1.2. Cuando se observen signos clínicos recientes que correspondan a la AIS, o algún inspector o veterinario tenga algún otro motivo para sospechar que los peces pueden estar infectados, se tomarán muestras de un mínimo de diez peces. En la medida de lo posible, estas muestras procederán de peces recién muertos, débiles o que presenten un comportamiento anómalo. Si no existe un número suficiente de peces clínicamente afectados, la muestra se completará con peces sanos extraídos de las jaulas, tanques o estanques que presenten las mayores tasas de mortalidad o con peces que presenten signos clínicos de la enfermedad.
- II.1.3. Si se han registrado muertes recientes o se observa la existencia de peces débiles o con comportamientos anómalos, pero los signos clínicos y las observaciones de la autopsia no corresponden a la AIS, la toma de muestras no será obligatoria, aunque, a discreción del inspector o el veterinario, podrá procederse a la misma con el fin de realizar un diagnóstico diferencial.

II.1.4. Cuando se sospeche que hay peces salvajes infectados con la AIS, los Estados miembros se asegurarán de que se procede a la oportuna toma de muestras y al análisis de éstas con los métodos clínicos y de laboratorio apropiados que se establecen en las partes II y III a VI con el fin de descartar o confirmar la presencia de la enfermedad y determinar si ésta entraña un riesgo significativo para los peces de piscifactoría.

## II.2. Preparación de las muestras

II.2.1. Las muestras destinadas a su examen histológico se tomarán exclusivamente de peces recién muertos que presenten signos clínicos o den lugar a observaciones de autopsia correspondientes a la enfermedad. Mediante un escalpelo, deberán tomarse muestras de toda lesión externa o interna y, en todo caso, del hígado, el riñón medio, el corazón y el bazo, y transferirse a una solución salina amortiguada con formol al 8-10 % (vol/vol). La relación fijador tejidos deberá ser al menos de 20:1 para asegurar la adecuada conservación de los tejidos.

II.2.2. Deberán extraerse, de todos los peces seleccionados, tejidos destinados al examen virológico. Las muestras deberán tomarse por duplicado con vistas a la corroboración de los resultados. Los fragmentos de hígado, riñón anterior, corazón y bazo se extraerán del pez mediante un instrumento estéril y se transferirán a tubos de plástico que contengan nueve ml de solución de transporte, es decir, un medio de cultivo celular con antibióticos. Se considera adecuada a tal efecto una combinación de 12,5 µg/ml<sup>-1</sup> de fungizona, 200 UI/ml<sup>-1</sup> de polimixina B y 200 µg/ml<sup>-1</sup> de kanamicina, pero también pueden emplearse otras combinaciones de demostrada eficacia. Cada tubo con solución de transporte podrá contener tejidos de hasta cinco peces, lo que constituirá una muestra conjunta. El peso del tejido de cada muestra será aproximadamente de 1,0 ± 0,5 g.

II.2.3. Para su examen mediante IFAT, se tomarán improntas de riñón exclusivamente de peces recién muertos, es decir, en un plazo de dos horas desde su muerte. Mediante instrumentos estériles, se extraerá del pez un fragmento de riñón medio. El tejido se secará con papel absorbente para eliminar restos de sangre y se colocará, ejerciendo presión repetidas veces, en un portaobjetos de vidrio cubierto de poli-L-lisina. Las improntas deberán estar juntas pero no superponerse, con el fin de obtener una única capa continua de células. La sangre y los líquidos tisulares no se consideran material pertinente para esta prueba. Se evitará dejar que la muestra de riñón se escurra totalmente en el papel absorbente, ya que ello puede provocar la coagulación de la sangre y, como consecuencia, el depósito de grandes cantidades de proteínas de suero en el portaobjetos. Las improntas se secarán al aire y se mantendrán en un ambiente fresco y seco cuando no vayan a fijarse inmediatamente. La fijación de las improntas se llevará a cabo en las 72 horas siguientes a la extracción de la muestra del pez. Las improntas también podrán congelarse, una vez secadas al aire, y almacenarse durante un mes a una temperatura de -20 °C antes de su fijación.

II.2.4. Los peces que presenten signos de anemia podrán ser aturdidos para la inmediata extracción de muestras de sangre heparinizada destinada a su examen hematológico, como la medición del hematocrito.

II.2.5. Se extraerán, de todos los peces que configuren la muestra, tejidos destinados al análisis RT-PCR. Mediante un instrumento estéril, se extraerá de cada pez un fragmento de riñón anterior o medio que se transferirá a un tubo para microcentrifugadora con 1 ml de solución conservante del ARN de demostrada eficacia. En cada tubo de solución conservante podrán recogerse muestras de hasta cinco peces, lo que constituirá una muestra conjunta. El peso del tejido de cada muestra se situará en torno a 0,5 g. Cuando los peces sean demasiado pequeños para obtener una muestra del peso requerido, podrán tomarse fragmentos de riñón, corazón, bazo, hígado o ciegos pilóricos, por ese orden de preferencia, hasta alcanzar los 0,5 g.

## II.3. Envío de las muestras de los peces

II.3.1. Las muestras de sangre y los tubos con tejidos de peces para su examen virológico o su análisis RT-PCR se colocarán en contenedores aislados (por ejemplo, cajas gruesas de poliestireno), con la cantidad suficiente de hielo o bloques de congelación para asegurar que las muestras se mantienen frescas durante su transporte al laboratorio. Deberá evitarse la congelación, pero, en el momento de la recepción, la caja de transporte deberá seguir conteniendo hielo, o uno o más de los bloques de congelación deberán seguir total o parcialmente congelados. En circunstancias excepcionales, las muestras destinadas al análisis RT-PCR y al examen virológico podrán ser congeladas instantáneamente y transportadas al laboratorio a una temperatura igual o inferior a -20 °C.

II.3.2. Los portaobjetos destinados a la IFAT se enviarán en cajas de portaobjetos con un desecante en cantidades suficientes para mantener las improntas secas y refrigeradas según lo antes indicado.

II.3.3. Si los tejidos de los peces se transportan en fijador para su examen histológico, deberán ser enviados en tubos estancos colocados en contenedores resistentes al impacto, como cajas gruesas de poliestireno.



- II.3.4. Salvo cuando las muestras hayan sido congeladas, el examen virológico deberá comenzar lo antes posible y, en todo caso, antes de que hayan transcurrido 72 horas desde la recogida de las muestras. La muestra destinada al análisis corroborativo deberá almacenarse a una temperatura igual o inferior a  $-20^{\circ}\text{C}$  en el momento de su llegada al laboratorio.
- II.3.5. Los peces podrán transportarse enteros al laboratorio si se cumplen durante su transporte los requisitos de temperatura descritos en el punto II.3.1. Los peces enteros deberán envolverse en papel absorbente y enviarse en una bolsa de plástico, refrigerados de la forma antes mencionada.
- II.3.6. También podrán enviarse peces vivos, pero exclusivamente bajo la supervisión del servicio oficial.
- II.3.7. Para el análisis RT-PCR de los tejidos conservados en RNA $later$ , la extracción de ARN deberá llevarse a cabo dentro de determinados plazos, en función de las distintas temperaturas de almacenamiento. Esos plazos se indican a continuación:
- |                         |                  |
|-------------------------|------------------|
| — $37^{\circ}\text{C}$  | un día,          |
| — $25^{\circ}\text{C}$  | una semana,      |
| — $4^{\circ}\text{C}$   | un mes,          |
| — $-20^{\circ}\text{C}$ | indefinidamente. |
- II.3.8. Todas las operaciones de envasado y etiquetado deberán efectuarse adecuadamente con arreglo a la normativa de transporte nacional e internacional vigente.

#### II.4. *Extracción del material de diagnóstico suplementario*

Con la autorización del laboratorio de diagnóstico, podrán extraerse otros tejidos de los peces y prepararse para la realización de exámenes suplementarios.

### III. Examen virológico

#### III.1. *Preparación de las muestras*

III.1.1. Cuando surjan dificultades prácticas que imposibiliten la inoculación de las células en un plazo de 72 horas a partir de la recogida de las muestras tisulares, se aceptará la congelación de los tejidos a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  durante un período de hasta 28 días. Antes de su examen, los tejidos deberán haber sido congelados y descongelados una sola vez.

III.1.2. Cada muestra (conjunto de tejidos en solución de transporte) deberá homogeneizarse completamente mediante una trituradora, una batidora o un mortero y centrifugarse entre 2000 y 4000 x g durante 15 minutos a una temperatura comprendida entre 0 y  $6^{\circ}\text{C}$ ; el sobrenadante deberá filtrarse ( $0,45\ \mu\text{m}$ ) e incubarse con un volumen igual de una mezcla adecuadamente diluida de antiseros frente a los serotipos autóctonos del virus de la NPI (necrosis pancreática infecciosa). El título del antisuero deberá ser al menos de 1:2000 en una prueba de neutralización en placa del 50 %. La mezcla deberá incubarse durante una hora a  $15^{\circ}\text{C}$ . Esto constituye el inóculo.

El tratamiento de todos los inóculos con antisuero frente al virus de la NPI (en algunas partes de Europa, este virus se encuentra en el 50 % de las muestras de peces) tiene por objeto impedir que se desarrollen efectos citopáticos (ECP) debidos al virus de la NPI en los cultivos celulares inoculados. Semejante procedimiento acortará los exámenes virológicos y reducirá el número de casos donde la presencia de ECP tendría que considerarse un indicio potencial del virus de la AIS.

Cuando las muestras procedan de unidades de producción consideradas libres de NPI, podrá omitirse el tratamiento de los inóculos con antisuero frente al virus de la NPI.

#### III.2. *Inoculación de los cultivos celulares*

III.2.1. Se cultivarán células SHK-1 (80 pases o menos) o TO en un medio L-15 que contenga un 5 % de suero fetal bovino, un 2 % (v/v) de L-glutamina 200 mM y un 0,08 % (v/v) de 2-mercaptoetanol 50 mM en placas de 12 o 24 pocillos. Podrán utilizarse otras líneas celulares de demostrada eficacia y sensibilidad para el aislamiento del virus de la AIS, teniendo en cuenta la variabilidad de las cepas y la capacidad de éstas para replicarse en distintas líneas celulares. La suspensión de órganos tratada con antisuero se inoculará en cultivos de células jóvenes en fase de crecimiento activo para obtener una dilución final de material tisular en el medio de cultivo de 1:1000. De cada suspensión de órganos, se añadirán 40  $\mu\text{l}$  de inóculo a un pocillo que contenga 2 ml de medio de cultivo. Para minimizar el riesgo de contaminación cruzada, se recomienda la utilización de diferentes placas de 12 o 24 pocillos para las muestras procedentes de distintas piscifactorias.



III.2.2. Una de las placas se dejará sin inocular para utilizarla como control negativo. Otra placa se inoculará con una cepa de referencia del virus de la AIS, como control positivo, de la manera que se indica a continuación: 100 µl de preparación madre del virus de la AIS (título mínimo  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/ml<sup>-1</sup>) se inoculará en el primer pocillo y se mezclará bien. Cierta volumen de este material se transferirá del primer pocillo al segundo pocillo, para obtener una dilución 1:10, y se mezclará bien. Esta operación se repetirá en toda la placa hasta obtener seis diluciones decimales. La preparación madre del virus de la AIS podrá almacenarse a una temperatura de -80 °C durante al menos dos años, pero, una vez descongelada, deberá utilizarse en un plazo de tres días. Nota: deberán tomarse las precauciones necesarias para evitar la contaminación cruzada de las placas de prueba con el material de control positivo; para evitar semejante riesgo, los controles positivos se prepararán y manipularán por separado de las placas de prueba.

III.2.3. Las muestras se incubarán a  $14 \pm 2$  °C hasta un máximo de 15 días.

### III.3. *Microscopia*

Los cultivos celulares se examinarán al microscopio para observar los ECP en dos ocasiones: la primera, entre el quinto y el séptimo día, y la segunda, entre el duodécimo y el decimocuarto día tras la inoculación. Si alguna muestra conjunta presenta ECP, se iniciarán inmediatamente los procedimientos de identificación del virus (III.6). Si, llegado el decimocuarto día, siguen sin observarse ECP, se procederá a la prueba de hemadsorción (III.4).

### III.4. *Hemadsorción*

La replicación del virus de la AIS en los cultivos celulares no siempre produce ECP. Por lo tanto, cada pocillo deberá ser sometido a una prueba de hemadsorción, según se describe a continuación, o bien a una prueba de inmunofluorescencia, según se describe en el punto III.6.1.

III.4.1. El medio de cultivo celular, incluido el de los controles positivos y negativos, se extraerá de cada pocillo y se colocará en tubos estériles debidamente etiquetados. Se añadirán a cada pocillo 500 µl de una suspensión al 0,2 % (v/v) de eritrocitos lavados de conejo o de caballo, o de una suspensión al 0,05 % (v/v) de eritrocitos lavados de trucha arco iris o de salmón atlántico, tras lo que se incubarán a temperatura ambiente durante 45 minutos. Se extraerán los eritrocitos y los pocillos se lavarán dos veces con medio L-15. Cada pocillo se examinará al microscopio.

III.4.2. La presencia de agregados de eritrocitos adheridos a la superficie de las células SHK-1 o TO se considerará un indicio de presunta infección por un ortomixovirus. Si las pruebas de hemadsorción arrojan resultados positivos, se procederá inmediatamente a la realización de pruebas de identificación de los virus (III.6).

### III.5. *Subcultivo o pase*

III.5.1. El subcultivo se llevará a cabo entre los días decimotercero y decimoquinto. Se añadirán 225 µl de sobrenadante del cultivo a pocillos que contengan células SHK-1 jóvenes en fase de crecimiento activo en placas de 12 pocillos, y se incubarán a  $14 \pm 2$  °C durante un periodo máximo de 18 días. Con un microscopio, se examinarán los cultivos celulares para observar los ECP en dos ocasiones, la primera entre los días quinto y séptimo y la segunda entre los días decimocuarto y decimoctavo. Si alguna muestra conjunta presenta ECP, se iniciarán inmediatamente los procedimientos de identificación del virus (III.6). Si no se observan ECP entre los días decimocuarto y decimoctavo, se realizará una prueba de hemadsorción (III.4).

III.5.2. Si se produce citotoxicidad en los siete primeros días de incubación, se procederá en esa fase al subcultivo, y las células deberán ser incubadas durante un periodo de 14 a 18 días, y nuevamente subcultivadas con otro periodo de incubación de 14 a 18 días. Si la citotoxicidad se produce después de 7 días, el subcultivo se efectuará una sola vez, y las células se incubarán para alcanzar el plazo total de 28 a 36 días desde la inoculación primaria.

III.5.3. Si se produce contaminación bacteriana en el cultivo primario, deberá volver a prepararse la prueba empleando la muestra homogeneizada de tejido almacenada a -80 °C. Antes de la inoculación, la muestra homogeneizada de tejido se centrifugará a 4 000 x g durante 30 minutos a una temperatura comprendida entre 0 y 6 °C y el sobrenadante se filtrará a 0,22 µm. Si se produce contaminación bacteriana durante la fase de subcultivo, el sobrenadante se filtrará a 0,22 µm, se inoculará en células jóvenes y se incubará durante otro periodo de 14 a 18 días.

### III.6. Pruebas de identificación del virus

Si se observan indicios de ECP en cualquiera de las fases, o si la prueba de hemadsorción arroja resultados positivos, se procederá a la identificación del virus. Los métodos idóneos para la identificación del virus de la AIS son IF (III.6.1) y RT-PCR (Parte IV). Si se considera posible la presencia de otros virus, se recomienda la realización de pruebas suplementarias para la identificación de los mismos. Si estas pruebas no permiten la identificación definitiva del virus en una semana, el sobrenadante deberá enviarse a un laboratorio nacional de referencia o al laboratorio comunitario de referencia para enfermedades ictiológicas con vistas a su inmediata identificación.

#### III.6.1. IF (Inmunofluorescencia)

III.6.1.1. Se cultivarán células SHK-1 (80 pases o menos) o To en un medio L-15 que contenga un 5 % de suero fetal bovino, un 2 % (v/v) de L-glutamina 200 mM, y un 0,08 % (v/v) de 2-mercaptoetanol 50 mM, en placas de 24 o 96 pocillos, y con una confluencia superior al 50 %. También podrán utilizarse otras líneas celulares o medios de cultivo de demostrada eficacia. Se añadirán a dos pocillos 225 µl de sobrenadante de un cultivo supuestamente infectado, se mezclará el conjunto y se transferirán 225 µl a otros dos pocillos, es decir, una dilución 1:5. Otros dos pocillos se dejarán sin inocular para que sirvan de controles. Las muestras procedentes de distintas piscifactorías se manipularán en placas separadas, lo mismo que el virus de control. Éste se obtendrá mediante una cepa de referencia del virus de la AIS.

III.6.1.2. Las placas se incubarán a  $14 \pm 2$  °C y se examinarán al microscopio durante un período de siete días como máximo. Cuando se observen ECP al inicio, o no se observen tales efectos en el plazo de siete días, la fase siguiente será la fijación. Para ello, los pocillos se lavarán con PBS y se fijarán mediante incubación con acetona al 80 % durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las placas deberán secarse al aire y teñirse inmediatamente o almacenarse a una temperatura comprendida entre 0 y 6 °C durante un período no superior a 24 horas antes de la tinción.

III.6.1.3. Los pocillos duplicados se teñirán con anticuerpo monoclonal 3H6F8 frente al virus de la AIS, u otro anticuerpo monoclonal de demostrada eficacia y especificidad, diluido en PBS e incubado a  $37 \pm 4$  °C durante 30 minutos. Se extraerá el anticuerpo monoclonal y las placas se lavarán tres veces con Tween 20 al 0,05 % en PBS. Se añadirá a cada pocillo conjugado FITC con anti-IgG de ratón diluido en PBS y se incubará a  $37 \pm 4$  °C durante 30 minutos. Nota: las diluciones de los distintos lotes de anticuerpo monoclonal y conjugado de FITC se optimizarán en cada laboratorio. Se extraerá el anticuerpo y las placas se lavarán tres veces con Tween 20 al 0,05 % en PBS.

III.6.1.4. Los pocillos se examinarán inmediatamente mediante un microscopio invertido preparado para microscopía de fluorescencia con un filtro adecuado para la excitación de FITC. La prueba se considerará positiva si se observan células fluorescentes. Para que la prueba sea válida, los controles positivos deberán dar resultados positivos y los controles negativos resultados negativos.

### IV. Examen de las muestras mediante RT-PCR

IV.1. *En esta sección se describen los métodos necesarios para la amplificación por PCR de parte del segmento 8 del genoma del virus de la AIS que puede realizarse con tejidos de peces con virus de la AIS en cultivos*

#### IV.1.1. Extracción del ARN

- a) Se extraerá el RNA later de cada muestra. Se añadirá un ml de agua destilada (dH<sub>2</sub>O) tratada con DEPC a cada tubo; los tubos se centrifugarán a 13 000 rpm durante cinco minutos a una temperatura comprendida entre 0 y 6 °C;
- b) se extraerá el sobrenadante de cada muestra y se añadirán 800 µl de TRIzol (Invitrogen), u otro reactivo de igual o mayor eficacia, a cada muestra y a un tubo de control que contenga material de control adecuado (400 µl de dH<sub>2</sub>O o una muestra homogeneizada de riñones de peces libres de patógenos específicos). En caso necesario, los tejidos se disgregarán mediante un repetido pipeteado. Los tubos se incubarán a temperatura ambiente durante cinco minutos. Se añadirán 160 µl de cloroformo a los tubos, los cuales deberán agitarse vigorosamente durante tres minutos y después centrifugarse a 13 000 rpm durante 15 minutos, a una temperatura comprendida entre 0 y 6 °C;
- c) la capa acuosa superior se transvasará a un tubo para microcentrifugadora etiquetado de 1,5 ml con 500 µl de isopropanol; los tubos se incubarán durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugarán a 6 500 rpm durante 15 minutos a una temperatura comprendida entre 0 y 6 °C;

- d) se retirará el sobrenadante y se añadirá un ml de etanol al 75 % al precipitado de ARN. A continuación, los tubos se centrifugarán a 6 500 rpm durante cinco minutos a una temperatura comprendida entre 0 y 6 °C;
- e) se retirará el sobrenadante y los tubos se dejarán abiertos durante aproximadamente tres minutos para dejar que se evapore el etanol restante. Se añadirán 15 µl de dH<sub>2</sub>O tratada con DEPC para volver a suspender el precipitado, agitándolo brevemente en caso necesario;
- f) se utilizará un espectrofotómetro para calcular la concentración de ARN y la pureza de las muestras. Las densidades ópticas se medirán a 260 y 280 nm;
- g) el ARN que vaya a utilizarse inmediatamente (ese mismo día) podrá almacenarse temporalmente a una temperatura comprendida entre 0 y 6 °C. El ARN que no se utilice en el momento deberá almacenarse a -80 °C.

#### IV.1.2. RT (Transcriptasa inversa)

- a) Se diluirán dos µg de ARN en dH<sub>2</sub>O tratada con DEPC en tubos para microcentrifugadora de 1,5 ml. Cuando la concentración de ARN de la muestra sea demasiado baja para permitir el uso de dos µg en la reacción RT, se utilizará la máxima cantidad posible de ARN. El ARN diluido se incubará a una temperatura comprendida entre 55 y 60 °C durante 10 minutos;
- b) a continuación, los tubos que contengan el ARN se colocarán en hielo y se les añadirán reactivos RT para obtener concentraciones finales de 1x amortiguador, 1mM de dNTP, 100 ng de hexámeros al azar, 20 U de inhibidor de la RNasa y 200 U de MMLV-RT en un volumen total de 20 µl;
- c) los tubos se incubarán a 37 °C durante una hora;
- d) el ADN complementario se almacenará a una temperatura comprendida entre 0 y 6 °C hasta el momento necesario y se utilizará para la PCR lo antes posible.

#### IV.1.3. PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

- a) Se añadirán cinco µl de ADN complementario a 45 µl de mezcla PCR para obtener concentraciones finales de 1x amortiguador, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 25 pmol de cada cebador y 1U de polimerasa Taq. Los cebadores son AIS+ (5'-GGC-TAT-CTA-CCA-TGA-ACG-AAT-C-3') (cebador directo) y AIS- (5'-GCC-AAG-TGT-AAG-TAG-CAC-TCC-3') (cebador reverso). Se incluirán controles negativos para las fases de extracción, RT y PCR;
- b) los tubos se colocarán en una estufa termostática programada a 94 °C durante cinco minutos, a lo que seguirán 35 ciclos de 94 °C durante un minuto, 55 °C durante un minuto y 72 °C durante un minuto con una incubación final a 72 °C durante cinco minutos.
- c) los resultados de la PCR se evaluarán por electroforesis en un gel de agarosa al 2 % con bromuro de etidio e incluyendo marcadores de tamaño junto a las muestras y los controles negativos de las fases RT y PCR. Un solo producto de PCR de 155 bp se considerará indicativo de la presencia de ARN del virus de la AIS. Se considerará también que las muestras que presenten un producto adicional de 310 bp pueden contener ese virus. Las muestras que generen múltiples productos de la PCR, incluido por lo menos uno de aproximadamente 155 bp, pueden contener ARN del virus de la AIS. Estas muestras podrán ser objeto de nuevas investigaciones mediante sondas de ADN o secuenciación de nucleótidos.

#### IV.1.4. Confirmación por PCR del aislamiento del virus de la AIS en los cultivos tisulares

Si se han observado ECP plenos durante el examen virológico de las muestras de tejidos en las células SHK-1, se retirarán del pocillo 400 µl de sobrenadante y se colocarán en un tubo estéril de 1,5 ml. Se extraerá de esta muestra el ARN con arreglo a lo indicado en el punto III.1 y se procederá a la prueba RT-PCR. Si se utilizan cultivos sin efectos citopáticos plenos, se retirará el sobrenadante, se rasparán las células de la superficie del pocillo o el matraz y se colocarán en un tubo estéril de 1,5 ml para la extracción del ARN y la RT-PCR.

#### IV.1.5. Confirmación de los productos de la PCR mediante sonda del ADN

- a) La especificidad de un producto de la PCR de 155 bp puede determinarse mediante sondeo con un oligonucleótido que se hibride en una región del producto de la PCR, más allá de los cebadores. Los productos de la PCR se someterán a electroforesis en un gel de agarosa al 1 % junto con los marcadores de tamaño y los controles negativos de las fases RT y PCR;

- b) el ADN se transferirá mediante la técnica de borrones de Southern a una membrana y el oligonucleótido marcado (5'-CGGGAGTTGATCAGACATGCACTGA AGGTG-3') se incubará con la membrana una vez realizados los pasos de prehibridación apropiados;
- c) la sonda no unida y unida de forma inespecífica se lavará de la membrana y se visualizará la sonda unida;
- d) la unión de la sonda a un fragmento de 155 bp (y de 310 bp, si está presente) constituirá una prueba de la especificidad de la PCR e indicará la presencia de ARN del virus de la AIS en la muestra.

#### IV.1.6. Secuenciación de nucleótidos de productos de la PCR

La especificidad de la PCR puede determinarse mediante el examen de la secuencia de nucleótidos del producto de la PCR de 155 bp.

- a) El producto de la PCR se purificará del gel o la solución de agarosa;
- b) el fragmento se secuenciará utilizando los mismos cebadores utilizados en la PCR, o cebadores vectores si, de forma previa a la secuenciación, han sido clonados en un vector;
- c) la secuencia de nucleótidos se comparará con la del segmento 8 del virus de la AIS disponible en la base de datos de secuencias de nucleótidos del EMBL (números de acceso Y10404, AJ012285 y AJ242016);
- d) la presencia de una secuencia correspondiente a la del segmento 8 del virus de la AIS constituye una prueba de que la muestra contenía ARN del virus de la AIS.

### V. Examen de las improntas de riñón mediante IFAT

V.1. *Se ha establecido el protocolo siguiente para el examen de las improntas de riñón mediante IFAT*

V.2. *Preparación y tinción de las improntas*

V.2.1. Las muestras de los portaobjetos se fijarán en acetona o metanolacetona (1:1) durante tres minutos y se secarán al aire. Antes de la tinción, se examinarán las muestras y las zonas apropiadas de los portaobjetos se circunscribirán con un rotulador ImmEdge™ o similar, y se dejarán secar al aire. A continuación, las muestras se colocarán en una solución bloqueadora (PBS con un 6 % de leche desnatada y un 0,2 % de Tween 20) y se incubarán, agitándolas suavemente durante 30 minutos a temperatura ambiente. Cada muestra se dejará escurrir y se colocará horizontalmente en una caja de portaobjetos que contenga papel de seda mojado para mantener una atmósfera húmeda.

V.2.2. Cada impronta se cubrirá con una solución de anticuerpo monoclonal 3H6F8 frente al virus de la AIS (u otro anticuerpo de especificidad y eficacia demostradas) y la caja de portaobjetos se cerrará e incubará, para lo que se agitará durante 60 minutos a temperatura ambiente. En condiciones normales, el anticuerpo estará diluido entre el 1:10 y el 1:100 en una solución con un 1 % de leche desnatada, pero la dilución real se determinará en cada lote. Los portaobjetos se lavarán tres veces durante dos minutos con Tween 20 al 0,1 % en PBS. Cada impronta se cubrirá con una solución que contenga conjugado de FITC con Ig de cabra anti-ratón diluido al 1:1000 en una solución con un 1 % de leche desnatada y se incubará en medio húmedo durante 60 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavarán tres veces durante dos minutos con Tween 20 al 0,1 % en PBS. Cada muestra se cubrirá con solución Citifluor™ [500 µl de Citifluor™ mezclado con 1,5 ml de Tween 20 al 0,1 % (v/v) en PBS] u otro medio de montaje adecuado durante 10 minutos. Los portaobjetos se lavarán 3 veces en PBS con Tween 20 al 0,1 % en PBS. Si se requiere una tinción de contraste, cada impronta podrá cubrirse con yoduro de propidio (0,01 mg/ml) en PBS con Tween 20 al 0,1 % e incubarse durante tres minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavarán tres veces durante dos minutos en PBS con Tween 20 al 0,1 %. A continuación, se escurrirán y se montarán en Citifluor™ u otro medio de montaje adecuado. Los portaobjetos se almacenarán en lugar oscuro a una temperatura de 4 °C antes de su examen microscópico.

V.3. *Examen mediante microscopia de fluorescencia*

Cada portaobjetos se examinará en un microscopio adecuado para la iluminación epifluorescente que excite el FITC y provoque la emisión la fluorescencia verde característica. Todos los campos situados dentro de las zonas definidas con el rotulador ImmEdge™ se examinarán bajo objetivos x10 y x20, y las zonas sospechosas (aquellas que presenten fluorescencia verde) volverán a ser examinadas bajo un objetivo x40 con una iluminación de fase/fluorescente para asegurar que la tinción fluorescente está asociada a las células. Las coordenadas del emplazamiento de las regiones sospechosas se anotarán para la posterior confirmación de la naturaleza de la fluorescencia por parte de un segundo examinador. Tras el examen por el primer examinador, los portaobjetos positivos o sospechosos serán reexaminados por un segundo examinador, con vistas a la confirmación de los resultados.

V.4. *Controles*

V.4.1. Deberán incluirse tres tipos de controles junto con cada lote de portaobjetos teñidos para IFAT:

- impronta de riñones de salmones atlánticos no infectados (control negativo),
- cultivo de células SHK-1 u otro cultivo de células sensibles no infectadas (control negativo),
- cultivo de células SHK-1 u otro cultivo de células sensibles infectadas por el virus de la AIS (control positivo).

V.4.2. A ser posible, se recomienda disponer de una impronta de riñón de un salmón atlántico infectado por el virus de la AIS como control positivo adicional.

V.4.3. Si se obtiene un resultado positivo con un control negativo, la prueba se considerará inválida para todos los portaobjetos del lote. Si todos los portaobjetos del lote, incluidos los controles positivos, son negativos, la prueba se considerará inválida para todos los portaobjetos del lote. Cuando el fallo de los controles invalide un lote de portaobjetos, éstos serán destruidos y volverá a realizarse una prueba utilizando las improntas duplicadas.

V.5. *Examen de otros tejidos*

Esta técnica puede aplicarse a otros tejidos de peces, como el hígado, el bazo y el corazón, que permitirán colocar en el portaobjetos una cantidad razonable de células endoteliales, leucocitos o linfocitos. El procedimiento de tinción será el mismo para cada tejido, aunque con algunos quizá resulte preferible omitir la tinción con yoduro de propidio y centrarse en la iluminación de fase para identificar los tipos de células presentes en la impronta.

VI. **Histología**

Las secciones fijadas en parafina se cortarán a cinco  $\mu\text{m}$  y se teñirán con hematoxilina y eosina. Los cambios histológicos asociados con la AIS se describen en la última edición del *Manual de diagnóstico de enfermedades de animales acuáticos* de la OIE.

VII. **Acrónimos y siglas**

ADNC	Ácido desoxirribonucleico complementario
ECP	Efectos citopáticos
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
IF	Inmunofluorescencia
IFAT	Prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes
OIE	Oficina Internacional de Epizootias
NPI	Necrosis pancreática infecciosa
AIS	Anemia infecciosa del salmón
PBS	Solución salina amortiguada con fosfato
ARN	Acido ribonucleico
RT-(PCR)	Transcriptasa inversa (reacción en cadena de la polimerasa)
SHK-1	Células de riñón de salmón
TCID <sub>50</sub>	Dosis infecciosa de cultivo tisular 50