



PROGRAMA SANITARIO GENERAL LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES DE ANIMALES ACUÁTICOS

NORMA TÉCNICA Nº1

Procedimientos para el muestreo de animales acuáticos.

DEPARTAMENTO DE SALUD ANIMAL
SERVICIO NACIONAL DE PESCA Y ACUICULTURA
CHILE

Contenido

I. OBJETIVOS.....	3
II. ALCANCE.....	3
III. DEFINICIONES	4
IV. PERSONAL.....	5
V. MATERIALES	5
VI. BIOSEGURIDAD	6
VII. PROCEDIMIENTOS DE MUESTREO	7
1. MUESTREO PARA EL PSEV PECES	7
2. MUESTREO PARA EL PSEV MOLUSCOS.....	13
3. MUESTREO PARA EL PSGR	15
4. MUESTREO PARA EL PSEVC ISA.....	19
5. MUESTREO PARA EL PSEVC PISCIRICKETTSIOSIS.....	22
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	25



I. OBJETIVOS

Establecer procedimientos estandarizados para ser aplicados en la extracción, manipulación y obtención de animales acuáticos, órganos o sus fluidos, que serán utilizados como muestras biológicas para el diagnóstico de enfermedades de alto riesgo (EAR), incluyendo las medidas de bioseguridad del lugar en el que se realice el muestreo y del personal, necesarias para obtener una muestra apropiada para análisis.

II. ALCANCE

Las condiciones técnicas y procedimientos estandarizados que se establecen en la presente norma técnica, serán aplicables a los muestreos que se realicen en centros de cultivo de animales acuáticos para el diagnóstico de enfermedades en el marco de los programas sanitarios generales y específicos, establecidos en conformidad con el D.S. N° 319, de 2001, del Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción, actualmente Ministerio de Economía, Fomento y Turismo, esto es, Programa Sanitario Específico de Vigilancia de Enfermedades de Alto Riesgo (PSEV), Programa Sanitario General de Manejo de la Reproducción (PSGR), Programa Sanitario Específico de Vigilancia y Control de ISA (PSEVC ISA). Programa Sanitario de Vigilancia y Control de Piscirickettsiosis (PSEVC Piscirickettsiosis), y demás que se dicten. Asimismo, establece las condiciones y el procedimiento para el envío y traslado de estas muestras a los laboratorios de diagnóstico registrados por el Servicio, en conformidad con el D.S. N°15/2011.

El procedimiento de muestreo que se describe deberá ser aplicado por los certificadores de la condición sanitaria, personal de los laboratorios de diagnóstico registrados y de los centros de cultivo, cuando la normativa así lo considere. De igual manera podrá ser aplicado por los funcionarios del Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura en muestreos oficiales.



III. DEFINICIONES

- a) **Certificador de la condición sanitaria:** médico veterinario incorporado en el registro establecido en conformidad con el artículo 122 letra K de la Ley General de Pesca y Acuicultura, acreditado para certificar la condición sanitaria de las especies hidrobiológicas en el marco del Reglamento y los Programas Sanitarios Generales y Específicos.
- b) **Mortalidad fresca:** mortalidad fresca del día (de menos de 12 horas) que no haya sido tratada con desinfectante o inactivador. Para determinar frescura, se deberá evaluar características organolépticas, las branquias deben tener un color rojo o rosa intenso, y un aspecto limpio y brillante. En caso de que las branquias se encuentren pálidas (se puede dar el caso por enfermedad) se debe complementar el análisis de acuerdo a otras características como la firmeza de la piel y musculatura, ojos no se encuentren hundidos y tengan una coloración negra, no grisácea.
- c) **Reglamento o RESA:** Reglamento de Medidas de Protección, Control y Erradicación de Enfermedades de Alto Riesgo para las Especies Hidrobiológicas, aprobado por el D.S. N° 319, de 2001, del Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción, hoy Ministerio de Economía, Fomento y Turismo.
- d) **Reproductores:** Ejemplares de especies hidrobiológicas que han sido seleccionados o destinados a la obtención de gametos.
- e) **Unidad Epidemiológica, unidad o UE:** designa un grupo de ejemplares en una piscicultura, con una localización definida, que tienen en común el mismo riesgo de exposición a un agente patógeno. Ello puede deberse a que comparten el mismo medio acuático o a que las prácticas de gestión hacen probable que un agente patógeno de un grupo de animales se transmita rápidamente a otros.
- f) **Servicio o Sernapesca:** Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura.



IV. PERSONAL

El laboratorio de diagnóstico será responsable de que el personal que realice los muestreos cumpla con los requisitos profesionales y/o capacitación exigidos por el Servicio en los procedimientos específicos que más adelante se indican, según el programa sanitario al que corresponda el muestro a realizar.

Para efectuar un muestreo, el personal deberá contar con indumentaria adecuada, la que considerará, a lo menos, delantal limpio o desechable, botas limpias y desinfectadas y guantes desechables de primer uso. Tal indumentaria deberá ser proporcionada por la empresa de cultivo; si así no fuere, se utilizará indumentaria propia que cumpla las condiciones antes indicadas.

V. MATERIALES

El muestreador deberá contar con los materiales necesarios para la extracción de las muestras, conforme las exigencias específicas indicadas en los procedimientos de muestreo para los diferentes programas incluidos en este documento. Entre ellos se incluyen:

1. Materiales para disección:

- Pinzas anatómicas y quirúrgicas estériles.
- Tijeras romas y con punta estériles.
- Mangos de bisturí estériles.
- Hojas de bisturí desechables.
- Bolsas de basura para retiro de material orgánico e inorgánico.
- Bolsas plásticas.
- Alcohol 70° u otro que no afecte la condición de las muestras.
- Pipetas plásticas desechables.
- Papel absorbente desechable.
- Depósito con agua limpia.
- Aspersores con desinfectante (viricida).
- Mechero.



2. Materiales para el transporte y mantención de muestras:

- Tubos con preservante de RNA/DNA.
- Tubos con medio de transporte.
- Hielera o caja de polietileno expandido.
- Hielo o Gelpack (previamente congelados y desinfectados).
- Gradillas para tubos o láminas de polietileno expandido.
- Cinta adhesiva.
- Termógrafo o dispositivo para registro de temperatura.
- Bolsas plásticas
- Esponjas (para transporte de los moluscos)

3. Materiales para identificación de las muestras:

- Plumón de tinta indeleble ó lápiz grafito.
- Cinta adhesiva de papel.
- Baja lenguas desechables.

VI. BIOSEGURIDAD

Al momento de realizar un muestreo, el personal responsable deberá respetar todos los filtros sanitarios dispuestos por los centros de cultivo y exigir el cumplimiento de todas las medidas de bioseguridad entre una y otra jaula o unidad epidemiológica, tales como desinfección de quiñes, lances, buzos, quechas, entre otros.

Si en el centro de cultivo se solicita como medida de bioseguridad que en la toma de muestras no se utilicen materiales externos al centro (bolsas, hielera, etc.), se deberá acceder a tal petición, siempre y cuando éste proporcione los materiales adecuados.

Los certificadores que realicen procedimientos en un centro positivo a una enfermedad infecciosa para la cual se haya establecido un programa específico de control, no podrán realizar muestreos en otros centros de cultivo con especies



susceptibles a esta, sino una vez que haya transcurrido un periodo mínimo de 24 horas.

VII. PROCEDIMIENTOS DE MUESTREO

1. MUESTREO PARA EL PSEV PECES

Los procedimientos de muestreo que se describen en este numeral se aplicarán a selección de peces y extracción de órganos para el diagnóstico de las Enfermedades virales de Alto Riesgo (EAR) Lista 1, establecidas en la resolución vigente emitida por la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura.

1.1 MUESTREO PARA LA VIGILANCIA

1.1.1 Personal

El muestreo para el PSEV será realizado por certificadores de la condición sanitaria.

1.1.2 Selección de peces

En la selección de peces a muestrear se considerará proporcionalmente todas las unidades epidemiológicas, estanques o jaulas, según corresponda, así como, las especies y los grupos de peces.

Si existe más de una fuente de agua para la producción, la muestra deberá incluir peces que representen a todas las fuentes.

De preferencia se deberá seleccionar ejemplares enfermos y completar con ejemplares sanos y mortalidad fresca del día (de menos de 12 horas) que no haya sido tratada con desinfectante o inactivador (revisar en definiciones). Para estos efectos, los ejemplares deformes no se considerarán enfermos.

Los criterios de proporcionalidad antes indicados podrán ser modificados si en la inspección se sospecha de la presencia de una EAR de la lista 1. En tal caso, podrá tomarse una proporción mayor de muestras correspondiente a los individuos más



afectados y se deberá dejar un registro claro de las razones que motivaron tal decisión, incluyendo esta información en el informe sanitario correspondiente.

1.1.3 Extracción de órganos

Preferentemente se deben enviar peces vivos o enteros; si no es posible, las muestras de órganos o tejidos serán extraídas y deberán cumplir, de acuerdo al tamaño de los peces, las siguientes especificaciones, siendo obligatorio durante todo el proceso el uso de guantes.

- Alevines y alevines con saco: pez entero removiendo el saco. En el evento que éstos se depositen en preservante o medio de mantención, se deberá abrir la cavidad abdominal y cortar opérculos.
- Peces de 4-6 cm: todas las vísceras, incluyendo el riñón. Una porción de encéfalo puede ser obtenida después de separar la cabeza a nivel del margen posterior del opérculo y presionando éste lateralmente.
- Peces de más de 6 cm y reproductores: corazón, riñón y bazo.

En primer lugar, se deberá depositar el pescado sobre un papel absorbente desechable, limpio, seco y antideslizante. A continuación, utilizando un bisturí, se realizará un corte en la zona lateral, paralela a la línea media ventral desde craneal a caudal, y luego, un segundo corte desde las branquias hacia la línea media ventral.

Una vez expuestos los órganos por remoción de la pared lateral se extraerán trozos de mínimo 5 mm³ de los órganos blancos corazón, riñón y bazo

Entre muestras de distintas unidades epidemiológicas o jaulas se deberá cambiar todo el material desechable (papel absorbente, guantes, hoja de bisturí, etc.) y limpiar y desinfectar la superficie y el material reutilizable (pinzas, mango de bisturí, etc.).

Finalmente, los restos de peces que queden de la toma de muestra, se adicionarán al tratamiento de mortalidad del centro o se dispondrán como desecho biológico en el laboratorio.



1.1.4. Número de muestras a extraer

Se deberá extraer el número de muestras establecido en el PSVE, considerando el tipo de centro, la cantidad de peces en cultivo y los diferentes estadios, de acuerdo a lo señalado por la OIE en el capítulo 1.4 del Código Sanitario para los Animales Acuáticos (en su versión vigente), considerando como norma general una prevalencia asumida del 5% con un límite de confianza del 95%, salvo en el caso de peces planos, en que la prevalencia asumida será del 10%.

Las muestras podrán conformar pools para análisis considerando un máximo de 5 peces por pool, provenientes de una misma unidad epidemiológica o jaula.

1.1.5. Contramuestras

Simultáneamente a la extracción de las muestras de tejido para análisis, deberá extraerse una contramuestra, la que deberá ser conservada debidamente rotulada a -20°C por cada pool analizado, y por un periodo no inferior a 15 días a menos que el Servicio disponga lo contrario.

Mientras las muestras se encuentren en análisis, exista un resultado sospechoso o positivo la contramuestra deberá mantenerse debidamente congelada. Alternativamente, la contramuestra podrá ser separada una vez que las muestras hayan sido trasladadas al laboratorio de diagnóstico en que se realizarán los análisis. Se podrá conservar como contramuestra homogeneizado de los órganos de los peces que constituyen la muestra.

La contramuestra sólo podrá ser utilizada por Sernapesca o por el laboratorio con autorización expresa del Servicio.

1.1.6. Conservación y traslado de las muestras al laboratorio

El transporte de las muestras deberá realizarse en condiciones que garanticen su integridad, embalados de modo que cualquier contaminación exterior resulte imposible (recipientes sólidos y perfectamente sellados, cajas o contenedores protectores sólidos y perfectamente cerrados), material absorbente en cantidad suficiente y etiquetados con al menos la siguiente información: código del centro de cultivo, fecha de muestreo y números o códigos que identifiquen los grupos muestreados.



Cuando el tiempo que medie entre la toma de muestra y el inicio de los análisis supere las 24 horas, ya sea en el laboratorio, centro de cultivo o bien en un lugar especialmente habilitado por el laboratorio para ello, se extraerán los órganos, con instrumental de disección, y se introducirán en recipientes con preservante de RNA comercial o etanol PA en una proporción 1:10. Las muestras deberán ser mantenidas en condiciones de refrigeración ($4-10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$), agregando una cantidad suficiente de hielo o de bloques refrigerantes, en contenedores adecuados que cuenten con un sistema de registro de temperatura, que permita garantizar la mantención de la cadena de frío hasta la llegada al laboratorio, lo que deberá ser chequeado al ingreso. En los casos en que se utilice preservante de RNA que no requieran refrigeración se deberá cumplir con las indicaciones del fabricante. Los análisis correspondientes deberán ser realizados en un plazo no mayor a 72 horas y, en caso de que por razones de fuerza mayor se requiera un plazo mayor, esto debe ser informado al Servicio.

1.2 MUESTRO PARA DIAGNÓSTICO PRELIMINAR Y CONFIRMACIÓN DE ENFERMEDADES DE ALTO RIESGO.

1.2.1 Personal

El muestreo será realizado por certificadores de la condición sanitaria, funcionarios del Servicio o personal designado por el Servicio.

1.2.2. Selección peces

Se deberá realizar la selección de los peces, bajo las mismas directrices señaladas para la vigilancia.

1.2.3. Selección de órganos

Se deberá realizar la selección de los peces, bajo las mismas directrices señaladas para la vigilancia, exceptuando toma de muestras en el caso de peces de más de 6 cms. y reproductores. En estos casos, la extracción de los órganos se deberá realizar de acuerdo al patógeno pesquisado. Se detalla en el siguiente recuadro, órgano blanco y técnica de diagnóstico para cada enfermedad:



Enfermedad	órganos blanco confirmación	Técnica
VHS	Riñón anterior, corazón, bazo y encéfalo	Histopatología
		Cultivo celular
		Técnicas moleculares
IHN	Riñón anterior, corazón, bazo y encéfalo	Histopatología
		Cultivo celular
		Técnicas moleculares
EHN	Hígado, riñón anterior, bazo	Histopatología
		Cultivo celular
		Técnicas moleculares
Aphavirus	Corazón y riñón medio	Técnicas moleculares
		Histopatología
Totivirus	Riñón y corazón	Técnicas moleculares

1.2.4 Número de muestras a extraer

El número de ejemplares a muestrear lo estimará el Servicio, considerando la enfermedad, la situación sanitaria y epidemiológica que se presente.

Seleccionarán para efectos del muestreo peces orillados y/o mortalidad fresca del día, y en el evento que no se pueda completar el tamaño muestral, se seleccionarán los ejemplares al azar.

Para el muestreo se debe realizar, en caso de que sea posible, la toma de muestras de todas las unidades epidemiológicas, considerando todas las fuentes de agua y todos los estadios presentes.

Las muestras podrán conformar pools para análisis, con un máximo de 5 ejemplares por pool, provenientes de una misma unidad epidemiológica o estructura. En casos que el Servicio lo requiera el análisis debe realizarse de manera individual.

1.2.5. Contramuestras

El procedimiento para las contramuestras deberá realizarse de igual manera que el numeral 1.5 de vigilancia.

1.2.6. Conservación y traslado de las muestras al laboratorio



El transporte de las muestras deberá realizarse en condiciones que garanticen su integridad, embalados de modo que cualquier contaminación exterior resulte imposible (recipientes sólidos y perfectamente sellados, cajas o contenedores protectores sólidos y perfectamente cerrados), material absorbente en cantidad suficiente y etiquetados con al menos la siguiente información: código del centro de cultivo, fecha de muestreo y números códigos que identifiquen los grupos muestreados.

Cuando el tiempo que medie entre la toma de muestra y el inicio de los análisis supere las 24 horas, ya sea en el laboratorio, centro de cultivo o bien en un lugar especialmente habilitado por el laboratorio para ello, se extraerán los órganos, con instrumental de disección, y se introducirán en recipientes con medios de transporte que preserve las muestras hasta su llegada al laboratorio. Los medios utilizados se detallan a continuación:

Técnica	Medio de transporte
Muestras para técnicas moleculares	Las muestras deben depositarse en recipientes con preservante de RNA comercial o etanol PA en una proporción 1:10. En los casos en que se utilice etanol como preservante de RNA las muestras deberán se mantenidas en condiciones de refrigeración (4 – 10°C 0,5°C o inferior) en contenedores adecuados que cuenten con un sistema de registro de temperatura, que permita garantizar la mantención de la cadena de frío hasta la llegada al laboratorio. En los casos en que se utilice preservante de RNA que no requieran refrigeración se deberá cumplir con las indicaciones del fabricante.
Muestras para cultivo celular	Las muestras deben depositarse en tubos estériles que contengan medio de transporte, es decir, medio de cultivo celular con suero fetal bovino (FBS) al 10% y antibióticos..



Muestras histología	para	Las muestras de tejido para histopatología deben ser de 1cm ³ máximo (puede enviarse más de una), las cuales, deberán fijarse en formalina neutra tamponada al 10% inmediatamente después de su recogida. La proporción recomendada entre el fijador y el tejido es de 10:1.
---------------------	------	---

Una vez obtenidas las muestras, el envío de estas al laboratorio se deberá realizar de manera inmediata y los análisis deberán ser realizados dentro de las primeras 24 horas posteriores a la llegada de las muestras.



2. MUESTREO PARA EL PSEV MOLUSCOS

Los procedimientos de muestreo que se describen en este numeral se aplicarán a selección de moluscos para el diagnóstico de las Enfermedades de Alto Riesgo (EAR), Lista 1, establecidas en la resolución vigente emitida por la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura.

2.1. Personal

El muestreo para el PVM será realizado por certificadores de la condición sanitaria.

2.2. Selección de ejemplares

En la selección de individuos a muestrear se considerará proporcionalmente todas las unidades epidemiológicas o estructuras y especies, según corresponda. Si existe más de una fuente de agua para la producción, la muestra deberá incluir ejemplares que representen a todas las fuentes.

En el muestreo se privilegiará la obtención de ejemplares que presenten anomalías tales como crecimiento anormal y alta mortalidad.

Los criterios de proporcionalidad antes indicados podrán ser modificados si en la inspección se sospecha de la presencia de una EAR de la lista 1. En tal caso, se dejará un registro de las razones que motivaron tal decisión, incluyendo esta información en el informe sanitario correspondiente.

2.3. Número de muestras a extraer

Se deberá extraer el número de muestras establecido en el PVM, considerando el tipo de centro, la cantidad de ejemplares en cultivo y los diferentes estadíos, cuando corresponda.

Cuando la técnica diagnóstica lo permita, las muestras podrán conformar pools para análisis, con un máximo de 5 ejemplares por pool, provenientes de una misma unidad epidemiológica o estructura.



2.4. Contramuestras

Simultáneamente a la extracción de las muestras, deberá extraerse una contramuestra, la que deberá ser conservada debidamente rotulada. Mientras exista un resultado sospechoso o positivo la contramuestra deberá mantenerse debidamente conservada.

La contramuestra podrá ser separada una vez que las muestras hayan sido trasladadas al laboratorio de diagnóstico en que se realizarán los análisis. En el caso de las determinaciones que se realicen mediante técnicas moleculares, se podrá conservar como contramuestra homogeneizado de los órganos de los ejemplares que constituyen la muestra.

2.5. Conservación y traslado de las muestras al laboratorio

Los ejemplares muestreados deben ser enviados vivos y mantenidos hasta su llegada al laboratorio en condiciones que garanticen su integridad y trazabilidad.

En caso que las muestras que no pueden ser entregadas en vivas al laboratorio de diagnóstico, debido a las etapas avanzadas de la enfermedad, largas distancias o conexiones lentas de transporte, entre otros, deberán fijarse en el lugar de muestreo en los casos que el diagnóstico de las enfermedades a analizar incluya, por ejemplo, histología o posterior examen de microscopía electrónica.

Para otras técnicas que requieran tejidos frescos, tales como frotis fresco, bacteriología, micología o cultivo, las muestras podrán ser enviadas refrigeradas siempre que no se supere el plazo de 24 hrs. En caso de diagnóstico por PCR, las muestras podrán ser enviadas congeladas, fijadas o en preservante de material genético.

Las muestras de los moluscos deberán ser empacadas de forma adecuada a fin de mantenerlos vivos, y deberán ser enviadas tan pronto como sea posible después de su extracción del agua a fin de reducir el almacenamiento de aire y la posible mortalidad durante el transporte, especialmente en caso de ejemplares moribundos o enfermos.



Con todo, los procedimientos relacionados con la obtención, manipulación, conservación y traslado de las muestras al laboratorio de diagnóstico, deberán realizarse en conformidad con lo establecido en el punto 2.4.0 del Manual de Pruebas Diagnósticas para Animales Acuáticos, de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) en su versión vigente.

3. MUESTREO PARA EL PSGR

Los procedimientos de muestreo para este programa consideran la extracción de muestras de tejidos, órganos o fluidos para el control individual de reproductores salmónidos al momento del desove para la detección de los agentes causales de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN), Renibacteriosis (BKD) y Anemia Infecciosa del Salmón (ISA).

La extracción de muestras de tejidos, órganos o fluidos en el caso de la detección de BKD es solo obligatoria solo en el caso de las hembras.

En el caso de ISA será aplicable para las especies susceptibles, sin considerar al salmón coho.

3.1. Personal

El muestreo para el chequeo individual de reproductores podrá ser realizado por profesionales o técnicos egresados de carreras de ciencias biológicas, los que deberán haber sido sometidos a un programa de capacitación específico, por parte del laboratorio en el que se desempeñen. El laboratorio deberá mantener debido registro de las capacitaciones realizadas.

3.2. Extracción de muestras

3.2.1. Muestreo con sacrificio

Luego del desove, se deberá realizar una incisión longitudinal al reproductor, a nivel de la línea media ventral. A continuación, se procederá a exponer los órganos a muestrear, indicados en el numeral 3.3.



3.2.2. Muestreo sin sacrificio

3.2.2.1. Biopsia de branquias

En el caso de aquellos reproductores que sean sometidos a varios desoves en la temporada, la muestra para diagnóstico ISA podrá ser obtenida mediante biopsia o torulado de branquia.

Este muestreo y análisis deberá efectuarse en cada desove. Al término de la vida productiva de los reproductores deberá realizarse el diagnóstico a partir de órganos.

Los individuos deberán ser previamente anestesiados y la extracción de la muestra deberá realizarse de forma tal, que asegure el mínimo sangrado de los peces. Luego de la biopsia, los reproductores deberán ser introducidos individualmente en una solución desinfectante, por el tiempo y a la dosis suficiente que garantice la eliminación de potenciales patógenos que hayan contaminado externamente al pez, producto del sangrado. Solo una vez que éste haya cesado completamente podrán ser devueltos a sus estanques. Los laboratorios deberán contar con antecedentes técnicos que avalen la seguridad y efectividad del producto utilizado y el tiempo de desinfección.

3.2.2.2. Fluidos celómico, seminal o sangre

En el caso de aquellos reproductores que sean sometidos a varios desoves en la temporada, las muestras para diagnóstico BKD e IPN podrán ser fluido celómico, fluido seminal o sangre.

Las muestras de fluidos seminal y celómico podrá ser obtenidas manualmente (*stripping* o masaje) o mediante una cánula. Por su parte, la obtención de la muestra de sangre se realizará por punción de la vena caudal, previa anestesia de los peces.



3.3. Muestras a extraer

Los órganos blanco de los que se deben extraer las muestras de tejidos se detallan en la siguiente tabla.

Tabla N° 1: Órganos y tejidos a muestrear para el PSGR

Tipo de muestreo	ISA	IPN	BKD
Con sacrificio	Corazón, riñón y branquia	Riñón	Riñón
Sin sacrificio	Branquia	Fluidos seminal o celómico. Sangre.	Fluidos seminal o celómico. Sangre.



Se extraerán trozos de órganos de 5 mm^3 ; en el caso del riñón para análisis de IFAT ó ELISA se extraerá aproximadamente 1 gramo de tejido del órgano, incluyendo la parte anterior, media y posterior.

Las muestras podrán conformar pools para análisis considerando un máximo de 3 reproductores por pool.

Cuando se realicen análisis de tipo molecular para el diagnóstico de los tres patógenos, podrá realizarse una sola extracción, considerando muestras que incluyan riñón, corazón y branquias.

3.4. Contramuestras

Simultáneamente a la extracción de las muestras de órganos o tejidos para análisis, se deberá extraer una contramuestra equivalente, la que deberá ser posteriormente almacenada en el laboratorio, a una temperatura de al menos -20°C , por un periodo no inferior a 15 días.

Alternativamente, la contramuestra podrá ser separada una vez que las muestras hayan sido trasladadas al laboratorio de diagnóstico en que se realizarán los análisis. En el caso de las determinaciones que se realicen mediante técnicas moleculares, se podrá conservar como contramuestra homogeneizado de los órganos de los peces que constituyen la muestra.

La contramuestra sólo podrá ser utilizada por Sernapesca o por el laboratorio con autorización expresa del Servicio.

3.5. Conservación y traslado de las muestras al laboratorio

Al momento de su extracción, las muestras deberán ser identificadas de manera que se mantenga su trazabilidad desde el reproductor en el centro de cultivo, hasta la obtención del resultado en el laboratorio.

En los casos en que el tiempo del traslado de las muestras desde el lugar de muestreo hasta el laboratorio para el inicio de los análisis no supere las 24 hrs., las muestras deberán ser mantenidas en condiciones de refrigeración ($4-10^{\circ}\text{C}$)



$\pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$) en contenedores adecuados que cuenten con un sistema de registro de temperatura, que permita garantizar la mantención de la cadena de frío.

En los casos que el tiempo de traslado supere las 24 hrs., las muestras para análisis molecular deberán ser introducidas en tubos con un preservante de ARN o etanol PA, en una relación de 1:10 entre tejido y preservante. En caso de utilizar etanol, las muestras deberán ser mantenidas en condiciones de refrigeración ($4 - 10 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ o inferior).

Para el análisis de BKD por técnica de IFAT, se deberá realizar el frotis en terreno.

4. MUESTREO PARA EL PSEVC ISA

4.1 Personal

El muestreo para el PEVC ISA será realizado por certificadores de la condición sanitaria.

4.2. Selección de peces

Previo a la selección de los ejemplares de la muestra, se deberá recopilar antecedentes productivos y sanitarios necesarios para la planificación del muestreo y la elección de las jaulas o unidades epidemiológicas a muestrear.

Se deben tomar en cuenta, entre otros, el tipo de centro (engorda, esmoltificación o piscicultura), las especies cultivadas en él, los porcentajes de mortalidad por unidad epidemiológica o jaula de cultivo en las últimas semanas.

Se privilegiará la extracción de peces orillados, moribundos, desorientados o mortalidad fresca del día (de menos de 12 horas) que no haya sido tratada con desinfectante o inactivador. Si el número final de ejemplares no se completa con peces en tales condiciones, se deberá completar la muestra con peces elegidos al azar.

Los peces extraídos deben ser dispuestos en bolsas plásticas debidamente cerradas y rotuladas, con la respectiva identificación de jaula o unidad epidemiológica en forma clara y permanente, asegurando la trazabilidad de las muestras hasta el momento de la extracción de órganos.



4.3. Extracción de órganos

El procedimiento de extracción de órganos se realizará de acuerdo a lo descrito en el numeral 1.3 precedente.

Los órganos blanco para el diagnóstico de ISAV, corresponden a corazón, riñón y branquia.

Tratándose de alevines y alevines con saco, se deberá enviar el pez completo (sin saco vitelino). En el evento que éstos se depositen en preservante, se deberá abrir la cavidad abdominal y cortar los opérculos.

En los casos en que los peces muestreados tengan una talla entre 4 a 6 centímetros se deberán extraer todas las vísceras, riñón y branquias.

Los restos de peces que queden de la toma de muestra, se deben adicionar al tratamiento de mortalidad del centro o disponer como desecho biológico en el laboratorio.

4.4. Número de muestras a extraer y frecuencia de muestreos

Se deberá extraer el número de muestras establecido en el PSEVC ISA, considerando el tipo de centro, la cantidad de ejemplares en cultivo y los diferentes estadios, cuando corresponda.

En el caso de muestreo y análisis como respaldo para traslados de Salmón del Atlántico, ya sea por cosecha o eliminación, se realizará el muestreo de 30 peces del grupo, conforme lo dispuesto en el Programa de Vigilancia y Control de ISA.

En las pisciculturas de reproducción de ciclo cerrado, es decir, aquéllas que no ingresan material biológico y no tengan en antecedentes de positividad al virus ISA en los dos últimos años, ya sea en los análisis de vigilancia o chequeo individual de reproductores, se considerará la extracción de, al menos, 15 peces para fines de vigilancia. Este muestreo se realizará con frecuencia semestral independiente de la especie en cultivo.



Las muestras podrán conformar pools para su análisis, considerando un máximo de 3 peces por pool, conformado por peces de la misma unidad epidemiológica.

4.5. Contramuestras

Simultáneamente a la extracción de las muestras órganos o tejidos, se deberá extraer una contramuestra equivalente, la que deberá ser almacenada en el laboratorio, a una temperatura de al menos -20°C , por un periodo no inferior a 15 días a menos que el Servicio disponga lo contrario.

Alternativamente, la contramuestra podrá ser separada una vez que las muestras hayan sido trasladadas al laboratorio de diagnóstico en que se realizarán los análisis. Se podrá conservar como contramuestra homogeneizado de los órganos de los peces que constituyen la muestra.

La contramuestra sólo podrá ser utilizada por Sernapesca o por el laboratorio con autorización expresa del Servicio.

4.6. Conservación y traslado de las muestras al laboratorio

En los casos en que el tiempo que medie entre la toma de muestra y el inicio de los análisis no supere las 24 horas, las muestras deberán se mantenidas en condiciones de refrigeración ($4-10^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ o inferior) en contenedores adecuados que cuenten con un sistema de registro de temperatura, que permita garantizar la mantención de la cadena de frío.

Cuando el tiempo que medie entre la toma de muestra y el inicio de los análisis supere las 24 horas, ya sea en el laboratorio, centro de cultivo o bien en un lugar especialmente habilitado por el laboratorio para ello, se extraerán los órganos, con instrumental de disección, y se introducirán en recipientes con preservante de RNA comercial o etanol PA en una proporción 1:10. En los casos en que se utilice etanol para análisis como preservante de RNA, las muestras deberán se mantenidas en condiciones de refrigeración ($4-10^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ o inferior) en contenedores adecuados que cuenten con un sistema de registro de temperatura, que permita garantizar la mantención de la cadena de frío hasta la llegada al laboratorio.



Las muestras deben ser enviadas de forma tal de asegurar su identificación y dispuestas en un doble contenedor (muestras en bolsas y éstas dentro de cajas de polietileno expandido). Los contenedores deberán ser debidamente sellados para evitar su alteración o manipulación, lo que deberá ser minuciosamente chequeado a la llegada al laboratorio.

5. MUESTREO PARA EL PSEVC PISCIRICKETTOSIS

5.1. Personal

El muestreo para el PSEVC PISCIRICKETTOSIS podrá ser realizado por médicos veterinarios de las empresas de cultivo o por certificadores de la condición sanitaria, según se establece en la resolución correspondiente.

5.2. Selección de peces

Previo a la selección de los ejemplares de la muestra, se deberá recopilar antecedentes productivos y sanitarios necesarios para la planificación del muestreo y la elección de las jaulas o unidades epidemiológicas a muestrear.

Se deben tomar en cuenta, entre otros, el tipo de centro (engorda, esmoltificación), las especies cultivadas en él, los porcentajes de mortalidad por unidad epidemiológica o jaula de cultivo en las últimas semanas.

Se privilegiará la extracción de peces orillados, moribundos, desorientados o mortalidad fresca del día (de menos de 12 horas) que no haya sido tratada con desinfectante o inactivador. Si el número final de ejemplares no se completa con peces en tales condiciones, se deberá completar la muestra con peces elegidos al azar.

Los peces extraídos deben ser dispuestos en bolsas plásticas debidamente cerradas y rotuladas, con la respectiva identificación de jaula o unidad



epidemiológica en forma clara y permanente, asegurando la trazabilidad de las muestras hasta el momento de la extracción de órganos.

5.3. Extracción de órganos

El procedimiento de extracción de órganos se realizará de acuerdo a lo descrito en el numeral 1.3 precedente.

Los órganos blanco para el diagnóstico de Piscirickettsiosis corresponden a cerebro, hígado y músculo, este último en caso que existan lesiones a ese nivel.

Se debe extraer por pez un trozo de los órganos blanco de 0,5 cm x 0,5 cm aproximadamente y depositarlos en un tubo estéril que contenga el preservante de material genético o medio de transporte, según corresponda.

Los restos de peces que queden de la toma de muestra, se deben adicionar al tratamiento de mortalidad del centro o disponer como desecho biológico en el laboratorio.

5.4. Número de muestras a extraer y frecuencia de muestreos

Se deberá extraer el número de muestras establecido en el PSEVC PISCIRICKETTSIOSIS, considerando el tipo de centro, la cantidad de ejemplares en cultivo y los diferentes estadios, cuando corresponda.

Las muestras podrán conformar pools para su análisis, considerando un máximo de 3 peces por pool, incluyendo peces de la misma unidad de cultivo.

4.5. Contramuestras

Simultáneamente a la extracción de las muestras órganos o tejidos, se deberá extraer una contramuestra equivalente, la que deberá ser almacenada en el laboratorio, a una temperatura de al menos -20°C , por un periodo no inferior a 15 días a menos que el Servicio disponga lo contrario.



Alternativamente, la contramuestra podrá ser separada una vez que las muestras hayan sido trasladadas al laboratorio de diagnóstico en que se realizarán los análisis. Se podrá conservar como contramuestra homogeneizado de los órganos de los peces que constituyen la muestra.

La contramuestra sólo podrá ser utilizada por Sernapesca o por el laboratorio con autorización expresa del Servicio.

4.6. Conservación y traslado de las muestras al laboratorio

En los casos en que el tiempo que medie entre la toma de muestra y el inicio de los análisis no supere las 24 horas, las muestras deberán ser mantenidas en condiciones de refrigeración ($4-10^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ o inferior) en contenedores adecuados que cuenten con un sistema de registro de temperatura, que permita garantizar la mantención de la cadena de frío.

Cuando el tiempo que medie entre la toma de muestra y el inicio de los análisis supere las 24 horas, ya sea en el laboratorio, centro de cultivo o bien en un lugar especialmente habilitado por el laboratorio para ello, se extraerán los órganos, con instrumental de disección, y se introducirán en recipientes con preservante de material genético comercial o etanol PA en una proporción 1:10, en el caso de los análisis moleculares. Si se utiliza etanol para análisis como preservante de material genético, las muestras deberán ser mantenidas en condiciones de refrigeración ($4-10^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ o inferior) en contenedores adecuados que cuenten con un sistema de registro de temperatura, que permita garantizar la mantención de la cadena de frío hasta la llegada al laboratorio

Para el caso que se realice análisis de inmunofluorescencia indirecta, IFAT, los frotis podrán ser realizados en terreno, a partir de los órganos blanco. Las muestras deben ser enviadas de forma tal de asegurar su identificación y dispuestas en un doble contenedor (muestras en bolsas y éstas dentro de cajas



de polietileno expandido). Los contenedores deberán ser debidamente sellados para evitar su alteración o manipulación, lo que deberá ser minuciosamente chequeado a la llegada al laboratorio.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. [Manual de Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos de la OIE.](#)
2. Programa Sanitario General de Manejo Sanitario de la Reproducción de Peces (PSGR) aprobado mediante Res. Ex. N° 70/2003.
3. Programa Sanitario Específico de Vigilancia y Control de la Anemia Infecciosa del Salmón (PSEVC ISA) aprobado mediante Res. Ex. N° 1577/2011 y sus modificaciones (Res. Ex. N° 228/2013 y Res.Ex. N° 565/2019).
4. Programa Sanitario Específico de Vigilancia y Control de Piscirickettsiosis (PSEVC-PISCIRICKETTSIOSIS) aprobado mediante Res. Ex. N° 3174/2012.
5. Programa Sanitario Específico de Vigilancia Activa para Enfermedades de Alto Riesgo (EAR) en Peces de Cultivo (PVA) aprobado mediante Res. Ex. N° 61/2003 y sus modificaciones Res. Ex. N°227/2018 y Res. Ex DN - 00557/2022.
6. Programa Sanitario Específico de Vigilancia Activa para Enfermedades de Alto Riesgo (EAR) en Moluscos (PVM) aprobado mediante Res. Ex. N° 1809/2003.