



LABD/NT2/Enero 2018

# **PROGRAMA SANITARIO GENERAL LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES DE ANIMALES ACUÁTICOS**

## **NORMA TÉCNICA Nº 2**

**Pruebas diagnósticas para enfermedades de animales  
acuáticos.**

DEPARTAMENTO DE SALUD ANIMAL  
SERVICIO NACIONAL DE PESCA Y ACUICULTURA  
CHILE

## CONTENIDO

I.	OBJETIVOS.....	3
II.	ALCANCE .....	3
III.	PRUEBAS DIAGNÓSTICAS .....	3
1.	SEPTICEMIA HEMORRÁGICA VIRAL.....	3
2.	NECROSIS HEMATOPOYÉTICA INFECCIOSA (IHN).....	9
3.	NECROSIS HEMATOPOYÉTICA EPIZOÓTICA (EHN).....	15
4.	ALPHAVIRUS.....	20
5.	TOTIVIRUS .....	21
6.	ANEMIA INFECCIOSA DEL SALMÓN (ISA) .....	23
7.	NECROSIS PANCREÁTICA INFECCIOSA (IPN) .....	25
8.	RENIBACTERIOSIS (BKD).....	27
9.	PISCIRICKETTSIOSIS .....	28
IV.	BIBLIOGRAFÍA.....	31

## **I. OBJETIVOS**

Esta Norma Técnica establece los métodos de diagnóstico que deberán ser utilizados por los laboratorios autorizados, para el análisis de muestras de peces correspondientes a los programas oficiales establecidos por el Servicio.

## **II. ALCANCE**

Los métodos de análisis descritos en la presente norma se aplicarán para el diagnóstico de enfermedades exigidos en 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 Sanitarios Específico de Vigilancia Activa para Enfermedades de Alto Riesgo en Moluscos (PVM), 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).

## **III. PRUEBAS DIAGNÓSTICAS**

### **1. Septicemia Hemorrágica Viral (VHS)**

El muestreo y envío de las muestras al laboratorio deberá ser realizado conforme los procedimientos establecidos en el documento LABD/NT 1.

Las muestras deberán ser analizadas mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR) en tiempo real, utilizando sondas TaqMan®, a partir del ARN total extraído de los tejidos blancos. Se detectará la presencia o ausencia del gen N que codifica la nucleoproteína, proteína estructural del virus. Las secuencias de los partidores y sonda son las recomendadas por la OIE para este tipo de técnica y corresponden a las descritas en la referencia de Jonstrup *et al.*, 2013. De manera complementaria podrá considerarse el ensayo descrito por Garver *et al.*, 2011.

En caso que los laboratorios realicen modificaciones a la técnica, deberán realizar el proceso de validación de acuerdo a lo establecido en la norma LABD/NT 3, y solicitar formalmente la autorización a Sernapesca, a fin de que sean incluidos en la presente norma.

Los resultados positivos a los análisis de RT-qPCR deberán informarse inmediatamente al Servicio, al correo electrónico [notificacionear@sernapesca.cl](mailto:notificacionear@sernapesca.cl), sin perjuicio que estos deberán confirmarse, en el laboratorio nacional de referencia (LNR), mediante la técnica de cultivo celular según las recomendaciones de la OIE.

Las muestras podrán conformar pools para su análisis, considerando un máximo de 5 peces por pool, teniendo en cuenta que estos deben ser conformados por peces que, al momento del muestreo se encuentren en una misma jaula o estanque (unidad de cultivo). El peso del tejido de los 5 peces que conforman el pool no deberá ser inferior a 1,5 g. La especificación respecto del tejido que constituya la muestra dependerá del tamaño del pez, de acuerdo a lo indicado en el punto VII.1.3 de la Norma Técnica de muestreo LABD/NT1. En aquellos casos en que por el tamaño de los peces no se logre reunir la cantidad mínima de tejido requerida para los análisis, se podrá extraer un número mayor de individuos considerando un máximo de 10.

### **Procedimiento de análisis para RT-PCR en tiempo real**

**Homogenización:** debe realizarse mediante un equipo automatizado, utilizando para ello perlas de material no adherente.

**Extracción de ARN total o viral:** debe realizarse mediante kits comerciales en base al uso de columnas de extracción y según las recomendaciones de los fabricantes de cada kit.

**RT-PCR en tiempo real:** La amplificación mediante RT-PCR debe llevarse a cabo utilizando los partidores/sonda adaptados de Jonstrup *et al.*, 2013: partidador directo: 5'-AAAC-CTC-GCA-GGA-TGT-GTG-CGT-CC-3'; partidador inverso: 5'-TCT-GCG-ATC-TCA-GTC-AGG-ATG-AA-3'; y sonda: 5'-FAM-TAG-AGG-GCC-TTG-GTG-ATC-TTC-TG-BHQ1. Estos partidores van dirigidos a los nucleótidos 532-608 según el número de acceso de GenBank Z93412. Como alternativa complementaria, pueden adaptarse los partidores/sonda de Garver *et al.*, 2011: partidador directo (2F): 5'-ATG-AGG-CAG-GTG-TCG-GAG-G-3'; partidador inverso (2R): 5'-TGT-AGT-AGG-ACT-CTC-CCA-GCA-TCC-3'; y sonda (2-MGB):

5'FAM-TAC-GCC-ATC-ATG-ATG-AGT-MGBNFQ-3' dirigidos a los nucleótidos 787-868, según el número de acceso de GenBank Z93412.

El programa de la PCR depende del kit y del equipo de PCR en tiempo real utilizado, siempre considerando como mínimo 40 ciclos. Sin perjuicio de lo anterior, se debe considerar que ha sido reportado que la sensibilidad de la RT-PCR en tiempo real depende en gran medida del kit utilizado (consúltese Jonstrup *et al.*, 2013, para más detalles).

### Controles de extracción y contaminación

- **Control Negativo:** corresponde a tejido de la misma matriz a evaluar, negativo a la presencia de VHSV, según chequeo previo, conservado a  $-80^{\circ}\text{C}$  o  $-20^{\circ}\text{C}$  en preservante de ARN. Se someterá a ensayo en paralelo a las muestras de diagnóstico, considerando 1 por cada 20 a 24 muestras extraídas.
- **Factor de elongación o control interno (ELF1  $\alpha$ ):** corresponde a un gen de expresión constitutiva del pez, específico para las especies salmonídeas, que permite controlar la calidad de la muestra y el proceso de extracción. Deberá ser incorporado en cantidad equivalente al 30% de las muestras de análisis y la reacción de PCR deberá ser realizada en un tubo independiente según lo descrito por Sepúlveda *et al.*, 2013, salvo que se valide el uso de sonda duplex conforme el procedimiento descrito en la norma LABD/NT 3, y previa autorización del Servicio.

### Control de amplificación

- **Blanco:** Corresponde a la mezcla de reacción con agua libre de nucleasas en lugar de ARN; se debe incluir al menos uno por placa de PCR.
- **Control Positivo:** Corresponde a una dilución de cDNA, pDNA u material genético sintético de la región blanco del VHSV. Se incluye 1 por placa de PCR.

### Informe de resultados

Se informarán como positivas aquellas muestras de las cuales se obtenga curva de amplificación dentro del rango confiable de resultados establecido por el laboratorio, conforme la validación del método. En aquellos casos en el valor de Ct se ubiquen entre el Ct de corte del laboratorio y el ciclo 45, en el informe de resultados se deberá indicar el valor de CT obtenido.

## Procedimiento de análisis para Cultivo celular

Se recomienda la línea celular de pez BF-2. Como alternativa, pueden utilizarse las líneas celulares EPC o FHM.

La detección del virus por la observación de efecto citopático (ECP) en el cultivo celular va seguida de una identificación del virus mediante pruebas basadas en anticuerpos, o bien, basadas en la secuenciación. En el caso de utilizar anticuerpos, estos deberán estar validados. El uso de MAb IP5B11 se recomienda como reactivo de referencia, debido a que todas las cepas de VHSV aisladas hasta ahora reaccionan con este.

Es importante que, al menos cada 6 meses, se monitoree la susceptibilidad de los cultivos celulares, realizando una titulación del stock congelado de VHSV para verificar la susceptibilidad de los cultivos celulares a la infección. Asimismo, los cultivos celulares deberán ser sometidos a pruebas para IPN y micoplasmas al menos cada 3 a 6 meses, considerando el último pasaje de todas las líneas celulares que se utilicen en el laboratorio, de manera de asegurar que éstas se mantiene libres de los agentes indicados

## Extracción del virus

En el laboratorio, el tejido debe homogenizarse totalmente (mediante digestor, mezcladora, homogeneizador validado o, lo que resulta más eficiente, mortero con arena estéril) y posteriormente debe suspenderse en el medio de transporte inicial. La proporción final de tejido respecto a medio de transporte debe ajustarse en el laboratorio a 1:10.

El homogenizado se centrifuga en una centrífuga refrigerada a 2 – 5°C a 2.000–4.000 **g** durante 15 minutos y el sobrenadante se recoge y se trata durante 4 horas a 15°C o durante toda la noche a 4°C con antibióticos, 1 mg ml<sup>-1</sup> de gentamicina, por ejemplo, puede ser útil en esta fase. Si la muestra se envía en medio de transporte (es decir, expuesta a antibióticos), el tratamiento del sobrenadante con antibióticos puede omitirse. El tratamiento con antibióticos tiene por objetivo controlar la contaminación bacteriana de las muestras y permite prescindir de la filtración por filtros de membrana.

Si el sobrenadante recogido se guarda a –80°C en un plazo de 48 horas tras la obtención de la muestra, puede volver a utilizarse solo una vez para el examen virológico.

Antes de inocular las células, el sobrenadante se mezcla con partes iguales de una dilución adecuada (recomendada por el fabricante) de antisuero contra los serotipos prevalentes del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) y la solución se incuba durante un mínimo de 1 hora a 15°C o un máximo de 18 horas a 4°C.

El tratamiento de todos los inóculos con antisuero contra el IPNV tiene por objetivo impedir que se desarrolle el ECP inespecífico en cultivos celulares inoculados. Cuando las muestras proceden de unidades de producción que se consideran libres de la IPN, este tratamiento puede omitirse.

### **Inoculación de monocapas celulares**

Se cultivan células de la línea BF-2 a 20 – 24°C en medio adecuado, por ejemplo, el medio mínimo esencial de Eagle (o modificaciones del mismo) con un suplemento de un 10% de suero fetal bovino y antibióticos a las concentraciones estándar. Cuando las células se cultivan en viales cerrados, se recomienda tamponar el medio con bicarbonato. El medio utilizado para el cultivo de células en unidades abiertas puede tamponarse con Tris/HCl (23 mM) y bicarbonato de sodio (6 mM), o con medio tamponado con HEPES (HEPES= ácido N-2-hidroxietil-piperazina-N-2-etanosulfónico). El pH debe mantenerse a  $7,6 \pm 0,2$ . Los cultivos celulares que van a utilizarse para la inoculación con material tisular deben ser jóvenes (4–48 horas de edad), y en el momento de la inoculación deben estar en crecimiento activo (no confluyentes).

Se inoculan suspensiones de órganos tratados con antibióticos en cultivos celulares al menos a dos diluciones, es decir, la dilución madre y una dilución de esta a 1/10, que da lugar a diluciones finales de material tisular en el medio de cultivo celular de 1/100 y de 1/1000, respectivamente (para prevenir interferencia por homólogos). La proporción entre el tamaño del inóculo y el volumen de medio de cultivo celular debe ser de aproximadamente 1:10. Para cada dilución y cada línea celular, tiene que utilizarse un mínimo de aproximadamente 2 cm<sup>2</sup> de área celular, correspondiente a un pocillo de una placa de cultivo celular de 24 pocillos. Se recomienda utilizar placas de cultivo celular, pero también son aceptables otras unidades con áreas de crecimiento similar o mayores.

## **Incubación de cultivos celulares**

Los cultivos celulares inoculados se incuban a 15°C durante 7–10 días. Si el color del medio de cultivo celular pasa de rojo a amarillo, indicando una acidificación del medio, debe realizarse un ajuste del pH con solución de bicarbonato estéril o sustancias equivalentes para garantizar la susceptibilidad de las células a la infección vírica.

## **Microscopía**

Los cultivos celulares inoculados deben inspeccionarse periódicamente (al menos tres veces a la semana) para comprobar si presentan ECP a 40–150 aumentos. Si se observa un ECP evidente, deben iniciarse de inmediato los procedimientos de identificación del virus. Se recomienda mantener un registro fotográfico de los ECP detectados. El laboratorio deberá realizar las pruebas para descartar la presencia de IPNV virus ISA o micoplasmas en un plazo no superior a 24 horas.

Los laboratorios deberán contar con al menos un miembro del personal, con dedicación a esta tarea, que cuente con capacitación específica y formal en la detección de ECP, la que deberá estar debidamente documentada.

## **Subcultivos**

Si pasados 7 a 10 días de la incubación inicial no se ha observado ECP, se lleva a cabo un subcultivo con cultivos celulares nuevos utilizando una zona celular similar a la del cultivo primario.

Se combinan alícuotas de medio (sobrenadante) de todos los cultivos/pocillos que constituyan el cultivo primario, según la línea celular, 7–10 días después de la inoculación. Las alícuotas combinadas se inoculan en cultivos celulares homólogos no diluidas y diluidas a 1/10 (obteniendo diluciones finales de 1/10 y 1/100, respectivamente, del sobrenadante) como se describe arriba (Inoculación de monocapas celulares).

Como alternativa, se inoculan alícuotas de un 10% del medio que constituye el cultivo primario directamente en un pocillo con cultivo celular nuevo (subcultivo de pocillo a pocillo).



En el caso de muestras de salmónidos, la inoculación puede ir precedida de una preincubación de las diluciones con un antisuero anti-IPNV a una dilución adecuada, como se describe arriba (Extracción del virus).

A continuación, los cultivos inoculados se incuban 7 a 10 días a 15°C, observándolos, como se describe arriba (Microscopía). Si aparece ECP en los primeros 3 días de incubación, puede realizarse un subcultivo en esa fase, pero después las células tienen que incubarse durante 7 días y subcultivarse de nuevo con otra incubación de 7 días. Cuando aparece ECP tóxico pasados 3 días, las células pueden pasarse una vez e incubarse para alcanzar un total de 14 días desde la inoculación primaria. No debe haber indicios de toxicidad en los últimos 7 días de incubación.

Si se produce contaminación bacteriana a pesar del tratamiento con antibióticos, el subcultivo debe ir precedido de una centrifugación a 2.000–4.000 **g** de 15–30 minutos a 2–5°C, y/o una filtración del sobrenadante por un filtro de 0,22 µm (membrana de baja unión de proteínas). Además de esto, los procedimientos de subcultivo son los mismos que en el caso del ECP tóxico.

Si no aparece ECP, la prueba puede declararse negativa.

## **2. Necrosis Hematopoyética Infecciosa (IHN)**

El muestreo y envío de las muestras al laboratorio deberá ser realizado conforme los procedimientos establecidos en el documento LABD/NT 1.

Las muestras deberán ser analizadas mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR) en tiempo real, utilizando sondas TaqMan®, a partir del ARN total extraído de los tejidos blancos. Se detectará la presencia o ausencia del gen N que codifica para la nucleocapside, proteína estructural del virus. Las secuencias de los partidores y sonda corresponden a las descritas en la referencia de Purcell *et al.*, 2013.

En caso que los laboratorios realicen modificaciones a la técnica, deberán realizar el proceso de validación de acuerdo a lo establecido en la norma LABD/NT 3, y solicitar formalmente la autorización a Sernapesca, a fin de que sean incluidos en la presente norma.

Los resultados positivos a los análisis de RT-qPCR deberán informarse inmediatamente al Servicio, al correo electrónico [notificacionear@sernapesca.cl](mailto:notificacionear@sernapesca.cl) sin perjuicio que estos deberán confirmarse, en el laboratorio nacional de referencia (LNR), mediante la técnica de cultivo celular según las recomendaciones de la OIE.

Las muestras podrán conformar pools para su análisis, considerando un máximo de 5 peces por pool, teniendo en cuenta que estos deben ser conformados por peces que, al momento del muestreo se encuentren en una misma jaula o estanque (unidad de cultivo). El peso del tejido de los 5 peces que conforman el pool no deberá ser inferior a 1,5 g. La especificación respecto del tejido que constituya la muestra dependerá del tamaño del pez, de acuerdo a lo indicado en el punto VII.1.3 de la Norma Técnica de muestreo LABD/NT1. En aquellos casos en que por el tamaño de los peces no se logre reunir la cantidad mínima de tejido requerida para los análisis, se podrá extraer un número mayor de individuos considerando un máximo de 10

### **Procedimiento de análisis para RT-PCR en tiempo real**

**Homogenización:** debe realizarse mediante un equipo automatizado, utilizando para ello perlas de material no adherente.

**Extracción de ARN total o viral:** debe realizarse mediante kits comerciales en base al uso de columnas de extracción y según las recomendaciones de los fabricantes de cada kit.

**RT-PCR en tiempo real:** La amplificación mediante RT-PCR debe llevarse a cabo utilizando los partidores/sonda adaptados de Purcell *et al.*, 2013: partidador directo: 5'-AGA-GCC-AAG-GCA-CTG-TGC-G-3'; partidador inverso: 5'-TTC-TTT-GCG-GCT-TGG-TTG-A-3'; y sonda: 5'-6-FAM-TGA-GAC-TGA-GCG-GGA-CA-NFQ/MGB. Estos partidores van dirigidos a los nucleótidos 796-875 según el número de acceso de GenBank NC\_001652.

El programa de la PCR depende del kit y del equipo de PCR en tiempo real utilizado, siempre considerando como mínimo 40 ciclos.

### Controles de extracción y contaminación

- **Control Negativo:** corresponde a tejido de la misma matriz a evaluar, negativo a la presencia de IHNV, según chequeo previo, conservado a  $-80^{\circ}\text{C}$  o  $-20^{\circ}\text{C}$  en preservante de ARN. Se someterá a ensayo en paralelo a las muestras de diagnóstico, considerando 1 por cada 20 a 24 muestras extraídas.
- **Factor de elongación o control interno (ELF1  $\alpha$ ):** corresponde a un gen de expresión constitutiva del pez, específico para las especies salmonídeas, que permite controlar la calidad de la muestra y el proceso de extracción. Deberá ser incorporado en cantidad equivalente al 30% de las muestras de análisis y la reacción de PCR deberá ser realizada en un tubo independiente según lo descrito por Sepúlveda *et al.*, 2013, salvo que se valide el uso de sonda duplex conforme el procedimiento descrito en la norma LABD/NT 3, y previa autorización del Servicio.

### Control de amplificación

- **Blanco:** Corresponde a la mezcla de reacción con agua libre de nucleasas en lugar de ARN; se debe incluir al menos uno por placa de PCR.
- **Control Positivo:** Corresponde a una dilución de cDNA, pDNA u material genético sintético de la región blanco del IHNV. Se incluye 1 por placa de PCR.

### Informe de resultados

Se informarán como positivas aquellas muestras de las cuales se obtenga curva de amplificación dentro del rango confiable de resultados establecido por el laboratorio, conforme la validación del método. En aquellos casos en el valor de Ct se ubiquen entre el Ct de corte del laboratorio y el ciclo 45, en el informe de resultados se deberá indicar el valor de CT obtenido.

### Procedimiento de análisis para Cultivo celular

Se recomienda la línea celular de pez EPC o FHM.

La detección del virus por la observación de efecto citopático (ECP) en el cultivo celular va seguida de una identificación del virus mediante pruebas basadas en anticuerpos o bien basadas en la secuenciación. En el caso de utilizar anticuerpos, estos deberán estar validados.

Es importante que, al menos cada 6 meses, se monitoree la susceptibilidad de los cultivos celulares, realizando una titulación del stock congelado de IHNV para verificar la susceptibilidad de los cultivos celulares a la infección. Asimismo, los cultivos celulares deberán ser sometidos a pruebas para IPN y micoplasmas al menos cada 3 a 6 meses, considerando el último pasaje de todas las líneas celulares que se utilicen en el laboratorio, de manera de asegurar que éstas se mantiene libres de los agentes indicados

### **Extracción del virus**

En el laboratorio, el tejido debe homogenizarse totalmente (mediante digestor, mezcladora, homogeneizador validado o, lo que resulta más eficiente, mortero con arena estéril) y posteriormente debe suspenderse en el medio de transporte inicial. La proporción final de tejido respecto a medio de transporte debe ajustarse en el laboratorio a 1:10.

El homogeneizado se centrifuga en una centrífuga refrigerada a 2 – 5°C a 2.000–4.000 **g** durante 15 minutos y el sobrenadante se recoge y se trata durante 4 horas a 15°C o durante toda la noche a 4°C con antibióticos, por ejemplo, 1 mg ml<sup>-1</sup> de gentamicina puede ser útil en esta fase. Si la muestra se envía en medio de transporte (es decir, expuesta a antibióticos), el tratamiento del sobrenadante con antibióticos puede omitirse. El tratamiento con antibióticos tiene por objetivo controlar la contaminación bacteriana de las muestras y permite prescindir de la filtración por filtros de membrana.

Si el sobrenadante recogido se guarda a –80°C en un plazo de 48 horas tras la obtención de la muestra, puede volver a utilizarse solo una vez para el examen virológico.

Antes de inocular las células, el sobrenadante se mezcla con partes iguales de una dilución adecuada (recomendada por el fabricante) de antisuero contra los serotipos prevalentes del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) y la solución se incuba durante un mínimo de 1 hora a 15°C o un máximo de 18 horas a 4°C.

El tratamiento de todos los inóculos con antisuero contra el IPNV tiene por objetivo impedir que se desarrolle el ECP inespecífico en cultivos celulares inoculados. Cuando las muestras proceden de unidades de producción que se consideran libres de la IPN, este tratamiento puede omitirse.

## **Inoculación de monocapas celulares**

Se cultivan células de la línea EPC o FHM a 20 – 30°C en medio adecuado, como el MEM de Eagle (o modificaciones del mismo) con un suplemento de un 10% de suero fetal bovino y antibióticos a las concentraciones estándar. Cuando las células se cultivan en viales cerrados, se recomienda tamponar el medio con bicarbonato. El medio utilizado para el

cultivo de células en unidades abiertas puede tamponarse con Tris/HCl (23 mM) y bicarbonato de sodio (6 mM). El pH debe mantenerse a  $7,6 \pm 0,2$ . Los cultivos celulares que van a utilizarse para la inoculación con material tisular deben ser jóvenes (4–48 horas de edad), y en el momento de la inoculación deben estar en crecimiento activo (no confluyentes).

Se inoculan suspensiones de órganos tratados con antibióticos en cultivos celulares al menos a dos diluciones, es decir, la dilución madre y una dilución de esta a 1/10, que da lugar a diluciones finales de material tisular en el medio de cultivo celular de 1/100 y de 1/1000, respectivamente (para prevenir interferencia por homólogos). La proporción entre el tamaño del inóculo y el volumen de medio de cultivo celular debe ser de aproximadamente 1:10. Para cada dilución y cada línea celular, tiene que utilizarse un mínimo de aproximadamente 2 cm<sup>2</sup> de área celular, correspondiente a un pocillo de una placa de cultivo celular de 24 pocillos. Se recomienda utilizar placas de cultivo celular, pero también son aceptables otras unidades con áreas de crecimiento similar o mayores.

## **Incubación de cultivos celulares**

Los cultivos celulares inoculados se incuban a 15°C durante 7–10 días. Si el color del medio de cultivo celular pasa de rojo a amarillo, indicando una acidificación del medio, debe realizarse un ajuste del pH con solución de bicarbonato estéril o sustancias equivalentes para garantizar la susceptibilidad de las células a la infección vírica.

## **Microscopía**

Los cultivos celulares inoculados deben inspeccionarse periódicamente (al menos tres veces a la semana) para comprobar si presentan ECP a 40–150 aumentos. Si se observa

un ECP evidente, deben iniciarse de inmediato los procedimientos de identificación del virus. Se recomienda mantener un registro fotográfico de los ECP detectados. El laboratorio deberá realizar las pruebas para descartar la presencia de IPNV, virus ISA o micoplasmas en un plazo no superior a 24 horas.

Los laboratorios deberán contar con al menos un miembro del personal, con dedicación a esta tarea, que cuente con capacitación específica y formal en la detección de ECP, la que deberá estar debidamente documentada.

### **Subcultivos**

Si pasados 7 a 10 días de la incubación inicial no se ha observado ECP, se lleva a cabo un subcultivo con cultivos celulares nuevos utilizando una zona celular similar a la del cultivo primario.

Se combinan alícuotas de medio (sobrenadante) de todos los cultivos/pocillos que constituyan el cultivo primario, según la línea celular, 7–10 días después de la inoculación.

Las alícuotas combinadas se inoculan en cultivos celulares homólogos no diluidas y diluidas a 1/10 (obteniendo diluciones finales de 1/10 y 1/100, respectivamente, del sobrenadante) como se describe arriba (Inoculación de monocapas celulares).

Como alternativa, se inoculan alícuotas de un 10% del medio que constituye el cultivo primario directamente en un pocillo con cultivo celular nuevo (subcultivo de pocillo a pocillo).

En el caso de muestras de salmónidos, la inoculación puede ir precedida de una preincubación de las diluciones con un antisuero anti-IPNV a una dilución adecuada, como se describe arriba (Extracción del virus).

A continuación, los cultivos inoculados se incuban 7 a 10 días a 15°C, observándolos, como se describe arriba (Microscopía). Si aparece ECP en los primeros 3 días de incubación, puede realizarse un subcultivo en esa fase, pero después las células tienen que incubarse durante 7 días y subcultivarse de nuevo con otra incubación de 7 días. Cuando aparece ECP tóxico pasados 3 días, las células pueden pasarse una vez e incubarse para alcanzar

un total de 14 días desde la inoculación primaria. No debe haber indicios de toxicidad en los últimos 7 días de incubación.

Si se produce contaminación bacteriana a pesar del tratamiento con antibióticos, el subcultivo debe ir precedido de una centrifugación a 2.000–4.000 **g** de 15–30 minutos a 2 – 5°C, y/o una filtración del sobrenadante por un filtro de 0,45 µm (membrana de baja unión de proteínas). Además de esto, los procedimientos de subcultivo son los mismos que en el caso del ECP tóxico.

Si no aparece ECP, la prueba puede declararse negativa.

### **3. Necrosis Hematopoyética Epizoótica (EHN)**

El muestreo y envío de las muestras al laboratorio deberá ser realizado conforme los procedimientos establecidos en el documento LABD/NT 1.

Las muestras deberán ser analizadas mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR) en tiempo real, utilizando sondas TaqMan®, a partir del ARN total extraído de los tejidos blancos. Se detectará la presencia o ausencia del gen de la proteína principal de la capsida (MCP) que codifica la proteína de la cubierta viral. Las secuencias de los partidores y sonda son las recomendadas por el laboratorio de referencia OIE para la enfermedad *Australian Animal Health Laboratory (AAHL)* y descritas en la referencia de Pallister *et al.*, 2007.

En caso que los laboratorios realicen modificaciones a la técnica, deberán realizar el proceso de validación de acuerdo a lo establecido en la norma LABD/NT 3, y solicitar formalmente la autorización a Sernapesca, a fin de que sean incluidos en la presente norma.

Los resultados positivos a los análisis de RT-qPCR deberán informarse inmediatamente al Servicio, al correo electrónico [notificacionear@sernapesca.cl](mailto:notificacionear@sernapesca.cl), sin perjuicio que estos deberán confirmarse, en el laboratorio de referencia (LR), mediante la técnica de cultivo celular según las recomendaciones de la OIE.

Las muestras podrán conformar pools para su análisis, considerando un máximo de 5 peces por pool, teniendo en cuenta que estos deben ser conformados por peces que, al momento del muestreo se encuentren en una misma jaula o estanque (unidad de cultivo). El peso del tejido de los 5 peces que conforman el pool no deberá ser inferior a 1,5 g. La especificación respecto del tejido que constituya la muestra dependerá del tamaño del pez, de acuerdo a lo indicado en el punto VII.1.3 de la Norma Técnica de muestreo LABD/NT1. En aquellos casos en que por el tamaño de los peces no se logre reunir la cantidad mínima de tejido requerida para los análisis, se podrá extraer un número mayor de individuos considerando un máximo de 10.

### Procedimiento de análisis para RT-PCR en tiempo real

**Homogenización:** debe realizarse mediante un equipo automatizado, utilizando para ello perlas de material no adherente.

**Extracción de ARN total o viral:** debe realizarse mediante kits comerciales en base al uso de columnas de extracción y según las recomendaciones de los fabricantes de cada kit.

**RT-PCR en tiempo real:** La amplificación mediante RT-PCR debe llevarse a cabo utilizando los partidores/sonda adaptados de Pallister *et al.*, 2007: partidador directo: 5'-CTC ATC GTT CTG GCC ATC A-3'; partidador inverso: 5'-TCC CAT CGA GCC GTT CA-3'; y sonda: 5'-**6FAM**-CAC AAC ATT ATC CGC ATC-**MGB**-3'.

El programa de la PCR depende del kit y del equipo de PCR en tiempo real utilizado, siempre considerando 45 ciclos. Como ejemplo lo indicado por el laboratorio de referencia es 1 ciclo de 2 minutos a 50°C, seguido de 1 ciclo de 10 minutos a 95°C, para terminar con 45 ciclos de 15 segundos a 95°C y 60 segundos a 60°C.

### Controles de extracción y contaminación

- **Control Negativo:** corresponde a tejido de la misma matriz a evaluar, negativo a la presencia de EHNV, según chequeo previo, conservado a -80°C o -20°C en preservante de ARN. Se someterá a ensayo en paralelo a las muestras de diagnóstico, considerando 1 por cada 20 a 24 muestras extraídas.
- **Factor de elongación o control interno (ELF1  $\alpha$ ):** corresponde a un gen de expresión constitutiva del pez, específico para las especies salmonídeas, que permite controlar la calidad de la muestra y el proceso de extracción. Deberá ser



incorporado en cantidad equivalente al 30% de las muestras de análisis y la reacción de PCR deberá ser realizada en un tubo independiente según lo descrito por Sepúlveda *et al.*, 2013, salvo que se valide el uso de sonda duplex conforme el procedimiento descrito en la norma LABD/NT 3, y previa autorización del Servicio.

### Control de amplificación

- **Blanco:** Corresponde a la mezcla de reacción con agua libre de nucleasas en lugar de ARN; se debe incluir al menos uno por placa de PCR.
- **Control Positivo:** Corresponde a una dilución de cDNA, pDNA u material genético sintético de la región blanco del EHN. Se incluye 1 por placa de PCR.

### Informe de resultados

Se informarán como positivas aquellas muestras de las cuales se obtenga curva de amplificación dentro del rango confiable de resultados establecido por el laboratorio, conforme la validación del método. En aquellos casos en el valor de CT se ubiquen entre el CT de corte del laboratorio y el ciclo 45, en el informe de resultados se deberá indicar el valor de CT obtenido.

### Procedimiento de análisis para Cultivo celular

Si bien el EHN crece bien en muchas líneas celulares, se recomienda, para maximizar los títulos, utilizar principalmente la línea celular BF-2 y alternativamente la EPC o CHSE-214.

La detección del virus por la observación de efecto citopático (ECP) en el cultivo celular va seguida de una identificación del virus mediante pruebas basadas en anticuerpos o bien basadas en la secuenciación. En el caso de utilizar anticuerpos, estos deberán estar validados.

Es importante que, al menos cada 6 meses, se monitoree la susceptibilidad de los cultivos celulares, realizando una titulación del stock congelado de VHSV para verificar la susceptibilidad de los cultivos celulares a la infección. Asimismo, los cultivos celulares deberán ser sometidos a pruebas para IPN y micoplasmas al menos cada 3 a 6 meses, considerando el último pasaje de todas las líneas celulares que se utilicen en el laboratorio, de manera de asegurar que éstas se mantiene libres de los agentes indicados

## Extracción del virus

Se ha validado un método sencillo de preparación de tejidos de peces para el cultivo celular (Whittington & Steiner, 1993).

1. Se congelan los tubos con tejidos a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta que se utilicen.
2. Se añaden 0,5 ml de medio homogeneizado (medio mínimo esencial de Eagle, con sales de Earle con glutamina, con  $200\text{UI ml}^{-1}$  de penicilina,  $200\ \mu\text{g ml}^{-1}$  de estreptomicina y  $4\ \mu\text{g ml}^{-1}$  de amfotericina B en cada tubo. Se tritura el tejido hasta conseguir una pasta fina con un émbolo adecuado estéril.
3. Se añaden otros 0,5 ml de medio de homogeneización a cada tubo y se mezclan con el émbolo.
4. Se añaden tres perlas de vidrio estéril a cada tubo (de 3 mm de diámetro) y se cierra la tapa del tubo.
5. Se somete la suspensión a vórtex enérgicamente durante 20–30 segundos y se deja a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas.
6. Se somete la suspensión a vórtex de nuevo como en el paso anterior y se centrifuga durante 10 minutos a  $2.500\ \text{g}$  en una centrífuga de sobremesa.
7. Se transfiere el sobrenadante, ahora denominado homogenado de tejido clarificado, a un tubo limpio estéril. Los homogenados se pueden congelar a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta que se utilicen para el aislamiento vírico.

Si el sobrenadante recogido se guarda a  $-80^{\circ}\text{C}$  en un plazo de 48 horas tras la obtención de la muestra, puede volver a utilizarse solo una vez para el examen virológico.

Antes de inocular las células, el sobrenadante se mezcla con partes iguales de una dilución adecuada (recomendada por el fabricante) de antisuero contra los serotipos prevalentes del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) y la solución se incuba durante un mínimo de 1 hora a  $15^{\circ}\text{C}$  o un máximo de 18 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ .

El tratamiento de todos los inóculos con antisuero contra el IPNV tiene por objetivo impedir que se desarrolle el ECP inespecífico en cultivos celulares inoculados. Cuando las muestras proceden de unidades de producción que se consideran libres de la IPN, este tratamiento puede omitirse.

**Procedimiento técnico del cultivo celular:** se cultivan células (en frascos, tubos o placas multipocillo) con medio de cultivo (MEM + 10% suero fetal bovino FBS con 100 IU ml<sup>-1</sup> de penicilina, 100 µg ml<sup>-1</sup> de estreptomicina y 2 µg ml<sup>-1</sup> de anfotericina B). Las células se incuban hasta que casi confluyen a 22°C, lo cual puede llevar hasta 4 días, en función de la dosis de siembra.

Al momento de la inoculación el medio se sustituye por un medio de mantenimiento (MEM con un 2% de FBS y 100 IU ml<sup>-1</sup> de penicilina, 100 µg ml<sup>-1</sup> de estreptomicina y 2 µg ml<sup>-1</sup> de anfotericina B).

Se prepara una dilución 1/10 utilizando medio de homogeneización. Cada cultivo se inocula con 100µl de muestra por ml de medio de cultivo. Esto representa una dilución final 1/100 de un homogenado de tejido de 0,1 mg ml<sup>-1</sup>. Se prepara otra dilución 1/10 que representará una dilución final a 1/1000, y se inoculan dos cultivos. No se requiere paso de adsorción. Como alternativa, pueden inocularse dos a tres cultivos con 10 µl de homogenado no diluido por ml de medio de cultivo. Hay que tener en cuenta que la utilización de un inóculo no diluido grande a menudo conlleva con una alta probabilidad de toxicidad o contaminación celular.

Los cultivos se incuban a 22°C durante 6 días. Los cultivos se leen el día 3 y el día 6. Los cultivos se comprueban al menos una vez para detectar muestras con niveles bajos de virus.

**Subcultivos:** El día 6, los cultivos primarios (P1) se congelan durante toda la noche a –20°C, se descongelan, se mezclan con cuidado y a continuación el sobrenadante se inocula en células frescas como antes (P2), es decir, 100 µl de sobrenadante de P1 por ml de medio de cultivo. Los sobrenadantes de P1 restantes se transfieren a tubos estériles de 5 ml y se dejan a 4°C para realizar el ELISA o PCR u otras pruebas que permitan confirmar que la causa del efecto citopático (ECP) es el EHNV.

P2 se incubaba como anteriormente, y se lleva a cabo un tercer paso si es necesario.

**Interpretación de los resultados:** El ECP se desarrolla bien y consiste en una lisis focal envuelta por células granuladas redondeadas. Esta alteración se extiende rápidamente hasta afectar a toda la monocapa, que se desprende y se desintegra.

Si no aparece ECP, la prueba puede declararse negativa.

#### **4. ALPHAVIRUS**

El muestreo y envío de las muestras al laboratorio deberá ser realizado conforme los procedimientos establecidos en el documento LABD/NT 1.

Las muestras deberán ser analizadas por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) tiempo real con sonda TaqMan®, de acuerdo al procedimiento descrito por Honeland & Endresen (Journal of Virological Methods, 131 (2006) 184-192).

En caso que los laboratorios realicen modificaciones a la técnica, deberán realizar el proceso de validación de acuerdo a lo establecido en la norma LABD/NT 3, y solicitar formalmente la autorización a Sernapesca, a fin de que sean incluidos en la presente norma.

Los resultados positivos a los análisis de RT-qPCR deberán informarse inmediatamente al Servicio, al correo electrónico [notificacionear@sernapesca.cl](mailto:notificacionear@sernapesca.cl), sin perjuicio que estos deberán confirmarse, en el laboratorio de referencia (LR), mediante la técnica de cultivo celular según las recomendaciones de la OIE.

Las muestras podrán conformar pooles para su análisis, considerando un máximo de 5 peces por pool, teniendo en cuenta que estos deben ser conformados por peces que, al momento del muestreo se encuentren en una misma jaula o estanque (unidad de cultivo).

El peso del tejido de los 5 peces que conforman el pool no deberá ser inferior a 1,5 g. La especificación respecto del tejido que constituya la muestra dependerá del tamaño del pez, de acuerdo a lo indicado en el punto VII.1.3 de la Norma Técnica de muestreo LABD/NT1. En aquellos casos en que por el tamaño de los peces no se logre reunir la cantidad mínima de tejido requerida para los análisis, se podrá extraer un número mayor de individuos considerando un máximo de 10

## Controles

### Controles de extracción y contaminación

- **Control Negativo:** corresponde a tejido de la misma matriz a evaluar, negativo a la presencia de alphavirus según chequeo previo, conservado a  $-80^{\circ}\text{C}$  ó  $-20^{\circ}\text{C}$  en preservante de ARN. Se someterá a ensayo en paralelo a las muestras de diagnóstico, considerando 1 por cada 20 a 24 muestras extraídas.
- **Factor de elongación o control interno (ELF1  $\alpha$ ):** corresponde a un gen de expresión constitutiva del pez, específico para la especie salmonídea, que permite controlar la calidad de la muestra y el proceso de extracción. Deberá ser incorporado en cantidad equivalente al 30% de las muestras de análisis y la reacción de PCR deberá ser realizada en un tubo independiente, salvo que se valide el uso de sonda duplex conforme el procedimiento descrito en la norma LAB/NT 3, y previa autorización del Servicio.

### Control de amplificación

- **Blanco:** Corresponde a la mezcla de reacción con agua libre de nucleasas en lugar de ARN; se debe incluir al menos uno por placa de PCR.
- **Control Positivo:** Corresponde a ARN purificado in vitro. Se incluye 1 por placa de PCR.

## 5. TOTIVIRUS

El muestreo y envío de las muestras al laboratorio deberá ser realizado conforme los procedimientos establecidos en el documento LABD/NT 1.

Las muestras deberán ser analizadas por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), con sonda TaqMan®, de acuerdo al procedimiento descrito por Lovoll et al, 2010 o Haugland et al, 2011.

En caso que los laboratorios que incorporen otros partidores, deberán realizar el proceso de validación de acuerdo a lo establecido en la norma LABD/NT 3, y solicitar

formalmente la autorización a Sernapesca, a fin de que sean incluidos en la presente norma.

Los resultados positivos a los análisis de RT-qPCR deberán informarse inmediatamente al Servicio, al correo electrónico [notificacionear@sernapesca.cl](mailto:notificacionear@sernapesca.cl), sin perjuicio que estos deberán confirmarse, en el laboratorio de referencia (LR), mediante la técnica de cultivo celular según las recomendaciones de la OIE.

Las muestras podrán conformar pools para su análisis, considerando un máximo de 5 peces por pool, teniendo en cuenta que estos deben ser conformados por peces que, al momento del muestreo se encuentren en una misma jaula o estanque (unidad de cultivo). El peso del tejido de los 5 peces que conforman el pool no deberá ser inferior a 1,5 g. La especificación respecto del tejido que constituya la muestra dependerá del tamaño del pez, de acuerdo a lo indicado en el punto VII.1.3 de la Norma Técnica de muestreo LABD/NT1. En aquellos casos en que por el tamaño de los peces no se logre reunir la cantidad mínima de tejido requerida para los análisis, se podrá extraer un número mayor de individuos considerando un máximo de 10.

En aquellos casos en que exista una curva de amplificación en que el valor de CT se ubique entre el valor de corte del laboratorio y el ciclo 45, en el informe de resultados se deberá indicar el valor de CT obtenido, y esto deberá ser informado de manera inmediata al correo electrónico [notificacionear@sernapesca.cl](mailto:notificacionear@sernapesca.cl)

## Controles

### Controles de extracción y contaminación

- **Control Negativo:** corresponde a tejido de la misma matriz a evaluar, negativo a la presencia de totivirus según chequeo previo, conservado a -80°C ó -20°C en preservante de ARN. Se someterá a ensayo en paralelo a las muestras de diagnóstico, considerando 1 por cada 20 a 24 muestras extraídas.
- **Factor de elongación o control interno (ELF1  $\alpha$ ):** corresponde a un gen de expresión constitutiva del pez, específico para la especie salmonídea, que permite controlar la calidad de la muestra y el proceso de extracción. Deberá ser incorporado en cantidad equivalente al 30% de las muestras de análisis y la

reacción de PCR deberá ser realizada en un tubo independiente, salvo que se valide el uso de sonda duplex conforme el procedimiento descrito en la norma LAB/NT 3, y previa autorización del Servicio.

### **Control de amplificación**

- **Blanco:** Corresponde a la mezcla de reacción con agua libre de nucleasas en lugar de ARN; se debe incluir al menos uno por placa de PCR.
- **Control Positivo:** Corresponde a ARN purificado in vitro. Se incluye 1 por placa de PCR.

## **6. ANEMIA INFECCIOSA DEL SALMÓN (ISA)**

El muestreo y envío de las muestras al laboratorio deberá ser realizado conforme los procedimientos establecidos en el documento LABD/NT 1.

Las muestras deberán ser analizadas mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR) en tiempo real, utilizando sondas TaqMan®, a partir del ARN total extraído de el o los tejido (s) blanco (s). Se detectará la presencia o ausencia del segmento 8 del ARN del virus ISA. Las secuencias de los partidores y sondas corresponden a las descritas en la referencia de Snow, 2006 (3), considerando las especificaciones del punto siguiente.

En caso que los laboratorios que incorporen otros partidores, deberán realizar el proceso de validación de acuerdo a lo establecido en la norma LABD/NT 3, y solicitar formalmente la autorización a Sernapesca, a fin de que sean incluidos en la presente norma.

Las muestras podrán conformar pooles para su análisis, considerando un máximo de 3 peces por pool; el pool debe ser conformado por peces al momento del muestreo se encuentren en una misma jaula o estanque (unidad de cultivo).

## Procedimiento de análisis

Homogeneización	Extracción (*)	Elusión	Gen Blanco	Sonda Taqman 250 nM	Nº de ciclos	Tamaño del amplicón pb
Mediante acción mecánica con martillo de goma o mortero (pestle)	Mediante columnas de extracción	Agua DEPC-tratada, tampón de elusión ó agua libre de nucleasas	Segmento 8	FAM-CATCGTCGCTGC AGTTC-MGB	45	104
			ELF1 $\alpha$ mRNA	FAM-ATCGGTGGTATT GGAAC	45	57

(\*)La cantidad de tejido a partir de la cual se realice la extracción de ARN deberá ajustarse a la recomendación del fabricante del kit de extracción utilizado o de acuerdo a la experiencia del laboratorio.

Previo al inicio de los ensayos con EFL1 $\alpha$ , cada laboratorio deberá informar el CT de corte, conforme la validación del método, y el rango de aceptación de CT de ELF1  $\alpha$ , conforme su experiencia. Este último deberá ser considerado en el caso de análisis de muestras provenientes de peces vivos y mortalidad fresca (no superior a 12 hrs) de la especie *Salmo salar*.

## Controles

### Controles de extracción y contaminación

- **Control Negativo:** corresponde a tejido de la misma matriz a evaluar, negativo a la presencia del virus ISA según chequeo previo, conservado a -80°C ó a -20°C en preservante de RNA. Se someterá a ensayo en paralelo a las muestras de diagnóstico, considerando 1 por cada 20 a 24 muestras extraídas.
- **Factor de elongación o control interno (ELF1  $\alpha$ ):** corresponde a un gen de expresión constitutiva del pez, que permite controlar la calidad de la muestra y el proceso de extracción. Deberá ser incorporado en cantidad equivalente al 30% del



batch de muestras a analizar. La reacción de PCR deberá ser realizada en un tubo independiente, salvo que se valide el uso de sonda duplex conforme el procedimiento descrito en la norma LABD/NT 3, y previa autorización del Servicio

### **Control de amplificación**

- **Blanco:** Corresponde a la mezcla de reacción con agua libre de nucleasas en lugar de ARN; se debe incluir al menos uno por placa de PCR.
- **Control Positivo:** Corresponde a una muestra extraída previamente y diagnosticada positiva a virus ISA, o ARN purificado in vitro. Se incluye 1 por placa de PCR.

### **Informe de resultados**

Se informarán como positivas aquellas muestras de las cuales se obtenga curva de amplificación dentro del rango confiable de resultados establecido por el laboratorio, conforme la validación del método. En aquellos casos en el valor se ubiquen entre el CT de corte del laboratorio y el ciclo 45, en el informe de resultados se deberá indicar el valor de CT obtenido.

Previo al desarrollo de análisis que correspondan a programas oficiales, cada laboratorio debe establecer e informar oficialmente a Sernapesca su rango de resultados validado.

## **7. NECROSIS PANCREÁTICA INFECCIOSA (IPN)**

El muestreo y envío de las muestras al laboratorio deberá ser realizado conforme los procedimientos establecidos en el documento LABD/NT 1.

En el caso del chequeo individual de reproductores, las muestras deberán ser analizadas para detectar la presencia del virus causante de IPN mediante RT-PCR tiempo real, o convencional. El procedimiento de análisis deberá cumplir con las siguientes especificaciones:

## Partidores

Según Blake y cols. (1995) (4) para PCR convencional. En el caso de que se realice RT-PCR tiempo real, podrán utilizarse partidores propios validados conforme los procedimientos descritos en la Norma LABD/NT3 o que cuenten con respaldo bibliográfico reconocido internacionalmente.

## Controles

### Controles de extracción y contaminación

- **Control Negativo:** corresponde a tejido de la misma matriz a evaluar, negativo a la presencia del virus IPN según chequeo previo, conservado a  $-80^{\circ}\text{C}$  ó  $-20^{\circ}\text{C}$  en preservante de RNA. Se someterá a ensayo en paralelo a las muestras de diagnóstico, considerando 1 por cada 20 a 24 muestras extraídas.
- **Factor de elongación o control interno (ELF1  $\alpha$ ):** aplicable en el caso de PCR Tiempo real. Corresponde a un gen de expresión constitutiva del pez, que permite controlar la calidad de la muestra y el proceso de extracción. Deberá ser incorporado en cantidad equivalente al 30% de las muestras de análisis. La reacción de PCR deberá ser realizada en un tubo independiente, salvo que se valide el uso de sonda duplex conforme el procedimiento descrito en la norma LAB/NT 3, y previa autorización del Servicio.
- **Control PCR convencional:** cada laboratorio deberá establecer un control interno de ARN en reemplazo del factor de elongación, el que podrá corresponder a cualquier ARN mensajero del pez. Deberá ser incorporado en cantidad equivalente al 30% de las muestras de análisis.

### Control de amplificación

- **Blanco:** Corresponde a la mezcla de reacción con agua libre de nucleasas en lugar de ARN; se debe incluir al menos uno por placa de PCR.
- **Control Positivo:** Corresponde a una muestra extraída previamente y diagnosticada positiva a virus IPN, o ARN purificado in vitro. Se incluye 1 por placa de PCR.

## 8. RENIBACTERIOSIS (BKD)

El muestreo y envío de las muestras al laboratorio deberá ser realizado conforme los procedimientos establecidos en el documento LABD/NT 1.

Para la determinación de la presencia del agente causal de BKD, se podrán utilizar los siguientes procedimientos diagnósticos:

### **Prueba de inmunofluorescencia indirecta IFAT**

El procedimiento de análisis deberá efectuarse de acuerdo a las especificaciones contenidas en el capítulo 2.1.1.2.2 del Manual de Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos de la OIE, 5ª Edición 2006, considerando 1 frotis por cada reproductor, y un máximo de 2 frotis por portaobjetos.

El uso del kit de anticuerpos debe ser consistente con el rendimiento informado por el proveedor; se podrá variar la cantidad utilizada solamente en los casos en que el cambio en los volúmenes esté respaldado por el proceso de validación del método.

Las placas deberán ser protegidas mediante el uso de DABCO, 50 CDM mínimo, y podrán ser conservadas como contramuestras. Alternativamente se podrá mantener como contramuestra, muestras de tejido por el periodo de un mes.

- Control (+): tejido positivo
- Control (-): tejido con resultado no detectable por IFAT.

### **Enzimoinmunoensayo ELISA**

El procedimiento de análisis deberá efectuarse de acuerdo a las especificaciones contenidas en el capítulo 2.1.1.2.2 del Manual de Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos de la OIE, 5ª Edición 2006. El análisis deberá efectuarse en duplicado.

### **Reacción en cadena de la polimerasa PCR**

El procedimiento de análisis deberá efectuarse de acuerdo a las especificaciones contenidas en el capítulo 2.1.1.2.2 del Manual de Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos de la OIE, 5ª Edición 2006.

Alternativamente, podrá realizarse PCR con partidores propios que hayan sido validados o que cuenten con respaldo bibliográfico reconocido internacionalmente.

### Controles de extracción y contaminación

- **Control Negativo:** corresponde a tejido de la misma matriz a evaluar, negativo a la presencia de *Renibacterium* según chequeo previo, conservado a  $-80^{\circ}\text{C}$  ó  $-20^{\circ}\text{C}$  en preservante de ácido nucleicos. Se someterá a ensayo en paralelo a las muestras de diagnóstico, considerando 1 por cada 20 a 24 muestras extraídas.
- **Factor de elongación o control interno (ELF1  $\alpha$ ):** será aplicable sólo en el caso que el análisis se realice a partir de ARN. Corresponde a un gen de expresión constitutiva del pez, específico para la especie salmonídea, que permite controlar la calidad de la muestra y el proceso de extracción. Deberá ser incorporado en cantidad equivalente al 30% de las muestras de análisis y la reacción de PCR deberá ser realizada en un tubo independiente, salvo que se valide el uso de sonda duplex conforme el procedimiento descrito en la norma Salud Animal/LAB NT 3, y previa autorización del Servicio.

### Control de amplificación

- **Blanco:** Corresponde a la mezcla de reacción con agua libre de nucleasas en lugar de ácido nucleico; se debe incluir al menos uno por placa de PCR.
- **Control Positivo:** Corresponde a una muestra extraída previamente y diagnosticada positiva a *Renibacterium*. Se incluye 1 por placa de PCR.

## 9. PISCIRICKETTSIOSIS

El muestreo y envío de las muestras al laboratorio deberá ser realizado conforme los procedimientos establecidos en el documento LABD/NT 1.

Para la determinación de la presencia del agente causal de Piscirickettsiosis, se podrán utilizar los siguientes procedimientos diagnósticos conforme el objetivo del análisis, según lo establecido en el PSEVC PISCIRICKETTSIOSIS:

## Reacción en cadena de la polimerasa PCR

Podrá realizarse PCR convencional o de tiempo real con partidores y sondas que cuenten con respaldo bibliográfico reconocido internacionalmente o hayan sido validados conforme los procedimientos descritos en la Norma Técnica LABD/NT3, incorporando en la etapa de evaluación de la especificidad analítica organismos similares como *Francisella*.

## Controles

### Controles de extracción y contaminación

- **Control Negativo:** corresponde a tejido de la misma matriz a evaluar, negativo a la presencia de *Piscirickettsia* según chequeo previo, conservado a -80°C ó -20°C en preservante de ácidos nucleicos. Se someterá a ensayo en paralelo a las muestras de diagnóstico, considerando 1 por cada 20 a 24 muestras extraídas.
- **Factor de elongación o control interno (ELF1  $\alpha$ ):** será aplicable sólo en el caso que el análisis se realice a partir de ARN. Corresponde a un gen de expresión constitutiva del pez, específico para la especie salmonídea, que permite controlar la calidad de la muestra y el proceso de extracción. Deberá ser incorporado en cantidad equivalente a 30% de las muestras de análisis y la reacción de PCR deberá ser realizada en un tubo independiente, salvo que se valide el uso de sonda duplex conforme el procedimiento descrito en la norma LABD/NT 3, y previa autorización del Servicio.

### Control de amplificación

- **Blanco:** Corresponde a la mezcla de reacción con agua libre de nucleasas en lugar de ácido nucleico; se debe incluir al menos uno por placa de PCR.
- **Control Positivo:** Corresponde a una muestra extraída previamente y diagnosticada positiva a *Piscirickettsia*. Se incluye 1 por placa de PCR.

## Prueba de inmunofluorescencia indirecta IFAT

El procedimiento de análisis deberá efectuarse de acuerdo a las especificaciones contenidas en el capítulo 2.1.1.3.2 del Manual de Pruebas de Diagnóstico para los

Animales Acuáticos de la OIE, 5ª Edición 2006, considerando un máximo de 2 frotis por portaobjetos.

El uso del kit de anticuerpos debe ser consistente con el rendimiento informado por el proveedor; se podrán modificar los volúmenes y concentraciones utilizadas solo en los casos en que esta modificación esté respaldada por el proceso de validación del método

Las placas deberán ser protegidas mediante el uso de DABCO, 50 CDM mínimo, y podrán ser conservadas como contramuestras. Alternativamente se podrá mantener como contramuestra, muestras de tejido por el periodo de un mes.

- Control (+): tejido positivo
- Control (-): tejido con resultado no detectable por IFAT.

#### **IV. BIBLIOGRAFÍA**

1. Manual de Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos de la OIE, 7ª Edición 2016.
2. M. Snow, P. McKay, A.J.A Mc Beath, J. Black, F. Doig, R. Kerr, C.O.Cunningham, A. Nylund, M. Devold: Development, application and validation of Taqman® Real-Time RT-PCR assay for the detection of Infectious Salmon Anaemia Virus (ISAv) in atlantic salmon. *New diagnostic technology: Application in animal Health and Biologic Controls*. Vol. 126, pp 133-145.
3. S. L. Blake, W. B. Schill, P. E. McAllister, M. K. Lee, J. T. Singer, and B. L. Nicholson: Detection and identification of aquatic birnaviruses by PCR assay. *J Clin. Microbiol.* (1995) 33(4): 835–839.
4. Honeland & Endresen: Sensitive and specific detection of Salmonid alphavirus using real-time PCR (TaqMan®). *Journal of Virological Methods*, 131 (2006) 184-192.