



LABD/NT2/Junio 2023

PROGRAMA SANITARIO GENERAL LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES DE ANIMALES ACUÁTICOS

NORMA TÉCNICA N° 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 (VHS).....	3
1.1	Muestreo para la vigilancia	3
1.2	Muestreo para el diagnóstico confirmativo.....	6
2.	Necrosis Hematopoyética Infecciosa (IHN).....	7
2.1	Muestreo para la vigilancia	7
2.2	Muestreo para el diagnóstico confirmativo.....	9
3.	Necrosis Hematopoyética Epizoótica (EHN)	10
3.1	Muestreo para la vigilancia	10
3.2	Muestreo para el diagnóstico confirmativo.....	12
4.	ALPHAVIRUS.....	13
4.1	Muestreo para la vigilancia	13
4.2	Muestreo para el diagnóstico confirmativo.....	14
5.	TOTIVIRUS	15
5.1	Muestreo para la vigilancia	15
5.2	Muestreo para el diagnóstico confirmativo.....	17
6.	ANEMIA INFECCIOSA DEL SALMÓN (ISA)	17
7.	NECROSIS PANCREÁTICA INFECCIOSA (IPN)	20
8.	RENIBACTERIOSIS (BKD).....	21
9.	PISCIRICKETTSIOSIS	23
IV.	BIBLIOGRAFÍA.....	25

I. OBJETIVOS

Establecer 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 exigidas 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.

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.

1.1 Muestreo para la vigilancia

Las muestras deberán ser analizadas mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa tiempo real (RT-qPCR), 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, sin perjuicio que estos deberán confirmarse.

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). La especificación respecto del tejido que constituya la muestra dependerá del tamaño del pez, de acuerdo a lo indicado en 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-qPCR

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 o con modificaciones debidamente validadas y visadas por el Servicio.

RT-qPCR: La amplificación mediante RT-qPCR debe llevarse a cabo utilizando los partidores/sonda adaptados de Jonstrup *et al.*, 2013: partidador directo: 5'-AAA- 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-qPCR 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°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 α): 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 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

1.2 Muestreo para el diagnóstico confirmativo

La confirmación será realizada por el Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) para enfermedades de Alto Riesgo. Sin perjuicio de lo anterior, y en caso de que el Servicio lo determine podrá ser realizado por un laboratorio de diagnóstico autorizado por Sernapesca.

El diagnóstico se realizará mediante análisis específicos para el agente causal utilizando las técnicas mencionadas a continuación y siguiendo las recomendaciones de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA) en su Manual de las Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos en su versión vigente.

Histopatología: Si bien no es una prueba confirmatoria, se puede considerar adecuada para hacer diagnósticos preliminares de animales afectados clínicamente, de estadios juveniles y adultos y para el diagnóstico definitivo debe estar acompañado de otra prueba.

Cultivo celular: La línea celular utilizada deberá ser BF2 y como alternativa CHSE-214, EPC, FHM o RTG-2. El aislamiento viral se realiza seguido de la identificación del virus por RT-PCR convencional, RT-qPCR, y secuenciación del amplicón.

Técnicas moleculares: El RT-PCR convencional y RT-qPCR seguidos por la secuenciación del amplicón se consideran pruebas adecuadas tanto para la vigilancia como para la confirmación de la enfermedad en poblaciones sanas y enfermas. Para el RT-qPCR se deberá utilizar el mismo método ya descrito para la vigilancia (Jonstrup *et al.*, 2013) o complementariamente (Garver *et al.*, 2011).

2. Necrosis Hematopoyética Infecciosa (IHN)

2.1 Muestreo para la vigilancia

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 en tiempo real (RT-qPCR), 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 sin perjuicio que estos deberán confirmarse.

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). La especificación respecto del tejido que constituya la muestra dependerá del tamaño del pez, de acuerdo a lo indicado en 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-qPCR

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 o con modificaciones debidamente validadas y visadas por el Servicio.

qRT-PCR : 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 qPCR 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°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 α): 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 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

2.2 Muestreo para el diagnóstico confirmativo

La confirmación será realizada por el Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) para enfermedades de Alto Riesgo. Sin perjuicio de lo anterior, y en caso de que el Servicio lo determine podrá ser realizado por un laboratorio de diagnóstico autorizado por Sernapesca.

El diagnóstico se realizará mediante análisis específicos para el agente causal utilizando las técnicas mencionadas a continuación y siguiendo las recomendaciones de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA) en su Manual de las Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos en su versión vigente.

Histopatología: Si bien no es una prueba confirmatoria, se puede considerar adecuada en el caso de diagnóstico preliminar de animales afectados clínicamente. Para el diagnóstico definitivo debe estar acompañado de otra prueba.

Cultivo celular: Las líneas celulares utilizadas deberán ser EPC o FHM. Se considera una prueba adecuada tanto para la vigilancia como para la confirmación de la enfermedad en poblaciones sanas y enfermas. El aislamiento viral se realiza seguido de la identificación del virus por RT-PCR convencional, RT-qPCR, y secuenciación del amplicón.

Técnicas moleculares: El PCR convencional y qPCR seguidos por la secuenciación del amplicón se consideran pruebas adecuadas tanto para la vigilancia como para la confirmación de la enfermedad en poblaciones sanas y enfermas. Para el RT-qPCR se deberá utilizar el mismo método descrito para la vigilancia (Purcell *et al.*, 2013).

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.

3.1 Muestreo para la vigilancia

Las muestras deberán ser analizadas mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa tiempo real (qRT-PCR) , 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, sin perjuicio que estos deberán confirmarse.

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). La especificación respecto del tejido que constituya la muestra dependerá del tamaño del pez, de acuerdo a lo indicado en 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 qRT-PCR

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 o con modificaciones debidamente validadas y visadas por el Servicio.

qRT-PCR : La amplificación mediante RT-PCR debe llevarse a cabo utilizando los partidores/sonda adaptados de Pallister *et al.*, 2007: partidor directo: 5'-CTC ATC GTT CTG GCC ATC A-3'; partidor 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 α): 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 EHNV. 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 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

3.2 Muestreo para el diagnóstico confirmativo

La confirmación será realizada por el Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) para enfermedades de Alto Riesgo. Sin perjuicio de lo anterior, y en caso de que el Servicio lo determine podrá ser realizado por un laboratorio de diagnóstico autorizado por Sernapesca.

El diagnóstico se realizará mediante análisis específicos para el agente causal utilizando las técnicas mencionadas a continuación y siguiendo las recomendaciones de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA) en su Manual de las Pruebas de Diagnóstico para los

Animales Acuáticos en su versión vigente.

Histopatología: Si bien no es una prueba confirmatoria, se puede considerar adecuada en el caso de diagnóstico preliminar de animales afectados clínicamente. Para el diagnóstico definitivo debe estar acompañado de otra prueba.

Cultivo celular: Las líneas celulares utilizadas deberán ser de preferencia BF-2. El virus presenta buen crecimiento también en líneas celulares FHM, EPC y CHSE-214. El aislamiento viral se realiza seguido de la identificación del virus por RT-PCR convencional, RT-qPCR, y secuenciación del amplicón.

Técnicas moleculares: El PCR convencional y qPCR seguidos por la secuenciación del amplicón se consideran pruebas adecuadas tanto para la vigilancia como para la confirmación de la enfermedad en poblaciones sanas y enfermas. Para el qRT-PCR se deberá utilizar el método ya descrito para la vigilancia (Pallister *et al.*, 2007).

4. ALPHAVIRUS

4.1 Muestreo para la vigilancia

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, sin perjuicio que estos deberán confirmarse.

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). La especificación respecto del tejido que constituya la muestra dependerá del tamaño del pez, de acuerdo a lo indicado en 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°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 α):** 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.

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 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

4.2 Muestreo para el diagnóstico confirmativo

La confirmación será realizada por el Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) para enfermedades de Alto Riesgo. Sin perjuicio de lo anterior, y en caso de que el Servicio lo determine podrá ser realizado por un laboratorio de diagnóstico autorizado por Sernapesca.

El diagnóstico se realizará mediante análisis específicos para el agente causal utilizando las técnicas mencionadas a continuación y siguiendo las recomendaciones de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA) en su Manual de las Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos en su versión vigente.

Histopatología: Si bien no es una prueba confirmatoria, se puede considerar adecuada en el caso de diagnóstico preliminar de animales afectados clínicamente. Para el diagnóstico definitivo debe estar acompañado de otra prueba.

Técnicas moleculares: El RT-PCR y RT-qPCR seguidos por la secuenciación del amplicón se consideran pruebas adecuadas tanto para la vigilancia como para la confirmación de la enfermedad en poblaciones sanas y enfermas. Se recomienda el análisis de la secuencia de nucleótidos del amplicón de la RT-PCR como uno de los pasos finales para confirmar el diagnóstico. Para el qRT-PCR se deberá utilizar el método ya descrito para la vigilancia (Honeland & Endresen, 2006).

5. TOTIVIRUS

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

5.1 Muestreo para la vigilancia

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, sin perjuicio que estos deberán confirmarse.

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). La especificación respecto del tejido que constituya la muestra dependerá del tamaño del pez, de acuerdo a lo indicado en 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 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 α):** 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.

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 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

5.2 Muestreo para el diagnóstico confirmativo

La confirmación será realizada por el Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) para enfermedades de Alto Riesgo. Sin perjuicio de lo anterior, y en caso de que el Servicio lo determine podrá ser realizado por un laboratorio de diagnóstico autorizado por Sernapesca.

El diagnóstico se realizara mediante análisis específicos para el agente causal utilizando las técnicas descritas a continuación:

Histopatología: Se considera adecuado como diagnóstico preliminar, seguido de otras pruebas de confirmación.

Técnicas moleculares: El RT-PCR y RT-qPCR seguidos por la secuenciación del

amplicón se consideran pruebas adecuadas tanto para la vigilancia como para la confirmación de la enfermedad en poblaciones sanas y enfermas Para el RT-qPCR se deberá utilizar el método ya descrito para la vigilancia (Lovoll et al, 2010 o Haugland et al, 2011).

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	N° 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-CATCGTCG CTGC AGTTC- MGB	45	104
			ELF1 α mRNA	FAM-ATCGGTGGT ATT 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 α , cada laboratorio deberá informar el CT de corte, conforme la validación del método, y el rango de aceptación de CT de ELF1 α , 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 α):** 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°C ó -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 α):** 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°C ó -20°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 α):** 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 α):** 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.
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.
5. Løvoll *et al.*: A novel totivirus and piscine reovirus (PRV) in Atlantic salmon (*Salmo salar*) with cardiomyopathy syndrome (CMS). *Virology Journal*, 2010, 7:309.
6. Jonstrup *et al.*: Development and validation of a novel Taqman-based real-time RT-PCR assay suitable for demonstrating freedom from viral haemorrhagic septicaemia virus. *Journal of Fish Diseases* 2013, 36, 9–23
7. Purcell *et al.*: Universal reverse-transcriptase real-time PCR for infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). *Dis. Aquat. Org.* 2013, 106: 103–115.
8. Pallister *et al.* Development of real-time PCR assays for the detection and differentiation of Australian and European ranaviruses. *Journal of Fish Diseases* 2007, 30, 427–438.