



Original: Inglés  
Febrero a agosto de 2018

## **INFORME DE LA REUNIÓN ELECTRÓNICA DEL GRUPO *AD HOC* DE LA OIE SOBRE EL VIRUS DE LA TILAPIA DEL LAGO<sup>1</sup>**

**Febrero a agosto de 2018**

El Grupo *ad hoc* electrónico de la OIE sobre el virus de la tilapia del lago (TiLV) se estableció en noviembre de 2017 con el fin de evaluar los métodos de diagnóstico, publicados o no, para la detección de este virus, describir el nivel de validación de cada método, determinar los requisitos adicionales de validación, recomendar el desarrollo de todo ensayo adicional que resulte necesario, facilitar el suministro y la distribución de materiales de control positivos correctamente caracterizados a efectos de la evaluación del método y de la implementación de comparaciones interlaboratorio.

Este informe enumera las actividades y los logros del grupo *ad hoc* de febrero a agosto de 2018. La lista de los participantes y el mandato figuran, respectivamente, en los Anexos I y II.

### **Actividades, logros y próximas etapas**

Atendiendo una solicitud de la Comisión de Normas Sanitarias para los Animales Acuáticos, en mayo de 2018, los países que declararon la presencia del virus de la tilapia del lago (TiLV) recibieron un mensaje de la directora general de la OIE solicitándoles que brindaran material de control positivo del TiLV al Centro colaborador de la OIE para las enfermedades nuevas y emergentes y la validación de las pruebas de diagnóstico, ubicado en Australia (laboratorio australiano de sanidad animal - AAHL, SCIRO) para la evaluación de las pruebas moleculares y las comparaciones interlaboratorio.

El grupo *ad hoc* se complace en anunciar haber recibido hasta la fecha (o en curso de envío) muestras con contenido infeccioso del TiLV de Taipéi Chino, Israel, Perú y Tailandia.

Actualmente, el grupo *ad hoc* se concentra esencialmente en el punto 5 del mandato, del que SCIRO ha asumido el liderazgo.

**Punto 5 del mandato: Elaborar un plan de trabajo para las comparaciones interlaboratorio. Objetivo:** desarrollar e implementar un programa de comparaciones interlaboratorio, con el fin de validar los siguientes métodos moleculares de detección del TiLV:

1. Prueba convencional RT-PCR semi-anidada (RT-nPCR), descrita por Dong *et al.* (2017).
2. Prueba RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR) con el colorante fluorescente SYBR, descrito por Tattiyapong *et al.* (2017).
3. Prueba basada en una sonda RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR), sin publicar al día de hoy, y comunicado al grupo *ad hoc* por el Dr. Prof. Hong Liu.

---

<sup>1</sup> Nota: el informe de este grupo *ad hoc* refleja las opiniones de sus integrantes y no necesariamente las de la OIE. Deberá leerse junto con el informe de septiembre de 2018 de la Comisión de Normas Sanitarias para los Animales Acuáticos en el que se exponen el examen y los comentarios hechos por la Comisión sobre el presente informe (<http://www.oie.int/es/normas-internacionales/comisiones-especializadas-y-grupos/comision-para-los-animales-acuaticos-y-informes/informes/>).

## **Metodología:**

### Recepción del material en el laboratorio SCIRO

Los miembros del grupo *ad hoc* determinarán el material infeccioso que se utilizará en las comparaciones interlaboratorio que luego se enviarán al laboratorio australiano de sanidad animal (CSIRO) situado en Geelong, Australia. Se establecerán acuerdos de transferencia de material para garantizar que el material suministrado sólo se utilice en el marco de las actividades del grupo *ad hoc*. Al llegar al laboratorio, se confirmará la presencia del TiLV utilizando una prueba PCR convencional y un análisis de la secuencia del genoma del virus. El virus se someterá a cultivo en la línea celular E-II y se conservará en nitrógeno líquido.

### Multiplificación del TiLV y producción de material de control positivo

El TiLV se multiplicará en cultivos de células E-II y el valor límite inferior se determinará utilizando soluciones decimales de las muestras para garantizar que el material se adapta a la preparación del panel de comparaciones interlaboratorio. Además, esto permitirá la comparación de la sensibilidad analítica (ASE) de las pruebas moleculares. El sobrenadante del cultivo celular previamente clarificado será irradiado con rayos gama a 50kGy y puesto a prueba para medir el grado de degradación del DNA del TiLV causado por las radiaciones. Trabajos realizados anteriormente en el laboratorio australiano con otros virus de peces sugieren que esto no hará que el material irradiado no pueda ser utilizado.

Si las pruebas moleculares de TiLV funcionan como esperado, la evaluación preliminar de la especificidad analítica (ASp) se llevará a cabo para cada una de las pruebas moleculares del TiLV utilizando los ácidos nucleicos extraídos de diversos virus que afectan los peces y en posesión del laboratorio.

### Panel de comparación interlaboratorio

El panel constituido para las comparaciones interlaboratorio estará compuesto por 20 muestras positivas y 10 negativas, preparadas como sigue:

1. 7 muestras obtenidas por dilución decimal en serie para permitir la estimación de la eficacia de los métodos moleculares en tiempo real;
2. al menos 2 muestras positivas (nivel alto);
3. al menos 2 muestras positivas (nivel intermedio);
4. al menos 2 muestras positivas (nivel bajo);
5. muestras obtenidas por dilución decimal de nivel bajo e intermedio;
6. muestras positivas con varias concentraciones virales para obtener 20 muestras positivas;
7. 10 muestras negativas preparadas a partir de sobrenadante de cultivos de líneas celulares sin infectar.

El material se entregará, verificado, en forma de sobrenadante de cultivo celular irradiado por rayos gamma en un volumen de 50µL extraído del sobrenadante.

El hecho de que no se describa con precisión la composición del panel no debe considerarse como una prueba de la capacidad de los laboratorios respectivos de los miembros del grupo *ad hoc*, sino que se trata simplemente de una buena práctica de laboratorio de brindar muestras “ciegas” a los participantes que realicen este tipo de evaluación. Se almacenarán numerosas alícuotas de cada una de las muestras.

Las pruebas de homogeneidad se realizarán utilizando 10 alícuotas de cada una de las concentraciones, con un coeficiente de variación de <5% que garantiza su homogeneidad. Se realizarán otras pruebas de estabilidad, utilizando tres alícuotas de cada muestra a -20°C, 4°C y 22°C, en los días 0, 7 y 14. Este ensayo deberá prevenir todo problema de estabilidad debido a los retrasos de transporte del panel de muestras a los laboratorios de los miembros del grupo *ad hoc*. Se realizarán también pruebas de estabilidad cuando todos los laboratorios hayan notificado los resultados y así verificar la estabilidad de las alícuotas almacenadas en el laboratorio AAHL.

Los laboratorios participantes recibirán las muestras en forma de tubos numerados para realizar pruebas a ciegas al menos tres veces. Los resultados se comunicarán al presidente del grupo *ad hoc* para que los compile y notifique sin codificar con miras a iniciar discusiones entre los laboratorios participantes. El uso de muestras duplicadas y la utilización de soluciones decimales permitirán realizar análisis estadísticos para determinar la repetibilidad y la reproductibilidad.

Inicialmente, el panel de comparación interlaboratorio utilizará soluciones distintas preparadas a partir de un solo aislado del TiLV. Cuando se obtengan aislados adicionales del TiLV de distintas ubicaciones geográficas, se determinarán la sensibilidad y especificidad de los análisis y la sensibilidad y especificidad del diagnóstico. En función de los resultados, se puede necesitar el diseño de nuevos ensayos si todos los aislados no han sido detectados en una, o más, de las pruebas moleculares. Independientemente, un se puede planificar un segundo panel conforme a la descripción anterior, pero utilizando varios aislados de distinto origen geográfico del TiLV, con el fin de brindar una mayor confianza a la solidez y reproductibilidad de las pruebas.

El panel destinado a las pruebas de comparación interlaboratorio también se enviará a laboratorios fuera del grupo *ad hoc* si dichos laboratorios contribuyen con material del TiLV que pueda ser utilizado en el marco de las actividades del grupo *ad hoc*.

#### Presentación de los resultados

Se preparará una ficha de presentación de los resultados en la que figurará el máximo de información posible sobre el proceso de prueba en cada laboratorio. La información incluirá los métodos/kits de extracción utilizados (con el volumen extraído y el volumen eluído), los reactivos/kits de prueba molecular utilizados (con el detalle del volumen de reacción y el volumen modelo utilizado) y la recodificación e interpretación de los resultados, incluyendo el umbral para las pruebas en tiempo real y la determinación del punto de corte. Esta información se comunicará antes del transporte del panel de comparación interlaboratorio y se enviará un proyecto a los miembros del grupo *ad hoc* para comentario. Se recomienda presentar todas las pruebas e informes un mes después de haber recibido el panel.

#### **Próximas etapas**

El grupo *ad hoc* continuará su labor y notificará los progresos en la próxima reunión de la Comisión de Animales Acuáticos, en febrero de 2019.

#### **Referencias:**

DONG, H., SIRIROOB, S., MEEMETTA, W., SANTIMANAWONG., W., GANGNONNGIW, W., PIRARAT, N., KHUNRAE, P., & RATTANAROJPONG, T., VANICHVIRIYAKIT, R. & SENAPIN, S. (2017). Emergence of tilapia lake virus in Thailand and an alternative semi-nested RT-PCR for detection. *Aquaculture*, **476**, 111-118.

TATTIYAPONG P., SIRIKANACHANA K. & SURACHETPONG W. (2017). Development and validation of a reverse transcription quantitative polymerase chain reaction for tilapia lake virus detection in clinical samples and experimentally challenged fish. *Journal of Fish Diseases*, **41(2)**, 255-261.

---

.../Anexos



## REUNIÓN DEL GRUPO *AD HOC* DE LA OIE SOBRE EL VIRUS DE LA TILAPIA DEL LAGO

### Lista de participantes

#### MIEMBROS DEL GRUPO *AD HOC* ELECTRÓNICO

---

**Dr. Axel Colling** (Presidente)  
OIE Collaborative Centre for Diagnostic  
Test Validation Science  
Po bag 24 Geelong VIC 3220  
AUSTRALIA  
Tel.: +61 3 5227 5255  
Tel.: +61 457 515 014  
[Axel.Colling@csiro.au](mailto:Axel.Colling@csiro.au)

**Dra. Mona Dverdal Jansen**  
Veterinarian, Researcher, PhD  
Norwegian Veterinary Institute  
PO Box 750 Sentrum  
NO-0106 Oslo  
NORUEGA  
Tel.: + 47 23 21 64 79  
Tel.: + 47 934 99 808  
[mona-dverdal.jansen@vetinst.no](mailto:mona-dverdal.jansen@vetinst.no)  
[www.vetinst.no](http://www.vetinst.no)

**Dr. Navad Davidovich**  
Veterinary Services and Animal Health  
Ministry of Agriculture & Rural  
Development  
P.O. Box 12, Bet Dagan 5025001,  
ISRAEL  
Tel.: +972-50-6241511  
Tel.: Office: +972-3-9681728  
[Nadavd@moag.gov.il](mailto:Nadavd@moag.gov.il)

**Dr. Prof. Hong Liu**  
Director  
OIE SVC reference laboratory  
NACA regional resource centre  
State Key laboratory of aquatic animal  
health  
Shenzhen Custom  
General administrations of China Customs  
Room 907 of 1011 building, Fuqiang Road,  
Futian Qu  
Shenzhen, Guangdong province, 518045  
P. R. CHINA  
[mailto:709274714@qq.com](mailto:mailto:709274714@qq.com)

**Dr. Sergio Hernan Marshall Gonzalez**  
Pontificia Universidad Católica  
de Valparaiso  
Av. Brazil 2950  
Valparaiso  
CHILE  
Tel.: +55 32-2273444  
[sergio.marshall@pucv.cl](mailto:sergio.marshall@pucv.cl)

**Dr. Nick Moody**  
Senior Research Scientist  
Team Leader – Aquatic Diagnostic  
Capability  
CSIRO AAHL Fish Diseases Laboratory  
5 Portarlinton Rd, East Geelong VIC  
3219  
Private Bag 24, Geelong VIC, 3220  
AUSTRALIA  
Tel.: +61 3 5227 5749  
[nick.moody@csiro.au](mailto:nick.moody@csiro.au)

**Dr. Dong Thanh**  
Researcher, Department of Microbiology,  
Faculty of Science, King Mongkut's  
University of technology Thonburi  
(KMUTT)  
Bangkok 10140  
TAILANDIA  
[hadongntu@gmail.com](mailto:hadongntu@gmail.com)

**Dr. Henrique César Pereira Figueiredo**  
Head  
National Reference Laboratory for  
Aquatic Animal Diseases/MAPA  
Federal University of Minas Gerais  
BRASIL  
Tel.: +55 31 3409-2077  
[figueiredoh@yahoo.com](mailto:figueiredoh@yahoo.com)

**Dr. Avi Eldar**  
Head, Fish Disease Laboratory  
The Veterinary Services-Kimron Vet. Inst.  
Agricultural Ctr.  
POB 50250  
ISRAEL  
[eldar@moag.gov.il](mailto:eldar@moag.gov.il)

#### REPRESENTANTE DE LA COMISIÓN DE NORMAS SANITARIAS PARA LOS ANIMALES ACUÁTICOS

---

**Dr. Edmund Peeler**  
(Vicepresidente)  
Group Manager Aquatic Pest & Pathogens  
CEFAS  
Barrack Road, Weymouth  
Dorset, DT4 8UB  
REINO UNIDO  
[ed.peeler@cefasc.co.uk](mailto:ed.peeler@cefasc.co.uk)

Anexo I (cont.)

**SEDE DE LA OIE**

---

Dr. Stian Johnsen  
Comisionado  
Departamento de Normas  
[s.johnsen@oie.int](mailto:s.johnsen@oie.int)

### **Mandato**

El grupo *ad hoc* electrónico deberá:

1. Revisar de forma crítica la literatura existente que trate los métodos de detección del TiLV y los métodos que no se hayan publicado y que también puedan estar disponibles.
2. Formular recomendaciones sobre las exigencias requeridas en materia de desarrollo de los métodos adicionales.
3. Redactar recomendaciones sobre las exigencias requeridas para los métodos de validación.
4. Determinar las fuentes de suministro del material de control positivo bien caracterizado, viable y no viable, para la evaluación de los métodos y su implementación en los laboratorios.
5. Elaborar un programa de trabajo para las comparaciones interlaboratorio.
6. Redactar un informe, antes de fines de enero de 2018, que será examinado por la Comisión para los Animales Acuáticos durante su reunión de febrero de 2019.

Los miembros del grupo *ad hoc* deberán estar familiarizados con el contenido del Capítulo 1.2. *Criterios para la inclusión de las enfermedades de los animales acuáticos en la lista de la OIE*, con las definiciones que figuran en el glosario del *Código Acuático*, y con los principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas enumeradas en el Capítulo 1.1.2. *Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas del Manual Acuático*.

---

