



“Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres”
“Año de la Universalización de la Salud”

ORGANISMO NACIONAL DE SANIDAD PESQUERA Y ACUÍCOLA
PROGRAMA INTERLABORATORIO
“DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA TILAPIA LACUSTRE TiLV”
INFORME FINAL

Fecha de emisión: 2020/05/14

Datos de Contacto

Proveedor: Coordinación de Ensayos de Aptitud – SANIPES

Persona de Contacto: Coordinador General ACU003

Correo electrónico: Interlaboratorios@sanipes.gob.pe

Tel: (511) 213-8570 Anexo 7134.

Web: www.sanipes.gob.pe

Autorizado por:

Abg. Mercedes Govea Requena

Directora

**Dirección Sanitaria y de Normatividad
Pesquera y Acuícola**

Revisado por:

Eduard Villalobos Infante

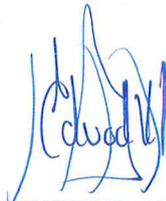
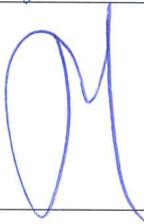
Coordinador General ACU003

**Dirección Sanitaria y de Normatividad
Pesquera y Acuícola**



“Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres”
“Año de la Universalización de la Salud”

DATOS DEL EQUIPO TÉCNICO:

Colaborador	Formación	Función	Firma
Eduard Villalobos Infante	Biólogo	Coordinador General Acu 003	
Christian Rebatta Quintanilla	Biólogo	Responsable técnico	



“Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres”
“Año de la Universalización de la Salud”

INDICE

1. Introducción	4
2. Declaración de Confidencialidad	5
3. Ítems de Ensayo	5
3.1 Preparación de los ítems de ensayo	5
3.2 Homogeneidad	5
3.3 Estabilidad	6
3.4 Distribución y Transporte	7
3.5 Contenido de los Ítem de Ensayo o Resultados Esperados	8
4. Análisis Estadístico	8
5. Resultados	9
6. Comentarios	11



1. Introducción

El Organismo Nacional de Sanidad Pesquera-SANIPES implementa, a través de la Dirección Sanitaria y de Normatividad Pesquera y Acuícola, el Programa de Ensayos Interlaboratorios dirigidos a las Entidades de Ensayo autorizadas y previamente acreditadas por el Instituto Nacional de Calidad-INACAL, las cuales participan en el Control y Certificación Oficial Sanitaria del sector pesquero y acuícola; programa que permite evaluar los resultados en los ensayos realizados con matrices hidrobiológicas, y así demostrar la confiabilidad y competencia técnica.

Las Pruebas Interlaboratorios son una herramienta técnica necesaria para implementar un sistema de monitoreo con el fin de vigilar el cumplimiento de los estándares de calidad en los análisis que se ejecutan en las Entidades de Ensayo y laboratorios que provean de servicios para la detección de agentes patógenos en los recursos hidrobiológicos, fortaleciendo el rol del SANIPES y brindando confianza a los consumidores del mercado nacional o extranjero, así como a las autoridades sanitarias extranjeras.

El SANIPES, continuando con su programa de Interlaboratorios, organizó la prueba “Detección del Virus de la Tilapia Lacustre TiLV”, dirigido a los laboratorios que brinden este servicio para la detección de este agente patógeno.

El Virus de la Tilapia Lacustre o también conocido como la enfermedad del Virus de la Tilapia de Lago (TiLV), es una enfermedad emergente ocasionada por un nuevo virus de la familia Orthomyxoviridae, que ha provocado brotes asociados a diferentes niveles de mortalidades en países como Ecuador (2013), Israel (2014), Colombia (2017), Tailandia (2017) y Egipto (2017), de acuerdo al reporte emitido por la Organización Mundial de Sanidad Animal - OIE. En este sentido, dado que la tilapia es un pez fundamental para la seguridad alimentaria y la nutrición a nivel mundial y nacional, se requiere de una acción acertada dentro y fuera de nuestro territorio, con la finalidad de controlar y vigilar el Virus de la Tilapia Lacustre (TiLV) en las regiones productoras de tilapia, siendo uno de los principales actores en la detección del Virus de la Tilapia Lacustre (TiLV), los laboratorios que brindan estos servicios, los cuales deben tener resultados confiables; por ello, uno de los objetivos de este interlaboratorio es identificar las diferencias de exactitud que puedan existir, y de esa manera, éstas puedan ser mejoradas.

El diseño estadístico del interlaboratorio estuvo basado en la naturaleza de datos y el número esperado de resultados siguiendo los lineamientos de la ISO/IEC 17043:2010 e ISO 13528:2018. En este caso, se emplearon las tablas de contingencia, donde se registra y analiza la asociación entre dos variables de naturaleza cualitativa.



“Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres”
“Año de la Universalización de la Salud”

El presente documento detalla la información sobre los resultados de los laboratorios participantes, la evaluación de los datos y su desempeño en el Interlaboratorio para la “Detección del Virus de la Tilapia Lacustre TiLV, desarrollado por la Coordinación de Ensayos de Aptitud de SANIPES en referencia de la ISO/IEC 17043:2010.

2. Declaración de Confidencialidad

Los participantes del ensayo interlaboratorio “Detección del Virus de la Tilapia Lacustre (TiLV)”, recibieron un código para su identificación, el cual es conocido únicamente por las personas involucradas en la ejecución del interlaboratorio, de conformidad a la política del SANIPES de mantener la confidencialidad en los resultados obtenidos, en el marco del cumplimiento de la norma ISO/IEC 17043:2010.

Los resultados del ensayo interlaboratorio serán comunicados a los participantes mediante correo electrónico, oficio y publicación en el portal web de SANIPES.

3. Ítems de ensayo

3.1. Preparación de los ítems de ensayo

Los ítems de ensayo de este interlaboratorio fueron preparados por la Coordinación de Ensayos de Aptitud del SANIPES, en condiciones controladas, usando equipos calibrados, material de referencia certificado y materia prima seleccionada para la preparación de las matrices.

Matriz

Se distribuyó 60 miligramos de órganos y tejido de “Tilapia”: *Oreochromis niloticus* en crioviales estériles debidamente sellados en condiciones asépticas. Se verificó previamente a la distribución, que el mecanismo de sellado prevenga la contaminación.

3.2. Homogeneidad

Para determinar la homogeneidad de los ítems de ensayo se evaluaron cinco (5) viales del lote N° 1 y cinco (5) viales del lote N° 2, seleccionados aleatoriamente (ensayo de muestras ciegas). Se realizó el ensayo de Detección del Virus de la Tilapia Lacustre (TiLV) mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real para determinar la presencia del genoma viral de TiLV en una muestra de 25 mg, se usó el Procedimiento interno para la Detección del Virus de la Tilapia Lacustre (TiLV) mediante RT-PCR en tiempo real (LAB-PO63-M03).



“Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres”
“Año de la Universalización de la Salud”

3.2.1 Homogeneidad de la muestra Lote N°1 y Lote N°2

Tabla N°01. Resultados de la homogeneidad de la muestra **Lote N°1** y **Lote N°2**

N° de muestra	N° de Lote	Patógeno target	Ct	Resultado
01	1	TiLV	-	No Detectado
02	2	TiLV	21.00	Detectado
03	2	TiLV	20.57	Detectado
04	2	TiLV	21.99	Detectado
05	1	TiLV	-	No Detectado
06	1	TiLV	-	No Detectado
07	2	TiLV	22.58	Detectado
08	1	TiLV	22.73	Detectado
09	1	TiLV	-	No Detectado
10	1	TiLV	-	No Detectado
Control negativo		TiLV	-	Conforme
Control negativo de extracción		TiLV	-	Conforme
Control positivo		TiLV	20.20	Conforme

Homogeneidad: **Aprobada**

Nota: En algunos casos no es factible someter los ítems de ensayo de aptitud a ensayos de homogeneidad. Un ejemplo de dichos casos sería, cuando se dispone de material limitado para preparar los ítems de ensayo de aptitud (ISO/IEC 17043).

3.3. Estabilidad

Se seleccionaron aleatoriamente 6 viales y se evaluó su estabilidad en tres periodos de tiempo (dos viales por tiempo), según las recomendaciones de la ISO 13528: 2015. Estas pruebas se realizaron con el procedimiento (LAB-PO63-M03), para Detección del virus TiLV.

3.3.1 Resultados de la prueba de estabilidad de la muestra

Tabla N°02. Resultados de la prueba de estabilidad 1 del lote N°2

N° de muestra	Patógeno target	Ct	Resultado
01	TiLV	22.22	Detectado
02	TiLV	23.92	Detectado
Control negativo	TiLV	-	Conforme
Control negativo de extracción	TiLV	-	Conforme
Control positivo	TiLV	20.41	Conforme

*Fecha de la prueba: 04 de marzo de 2020



“Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres”
“Año de la Universalización de la Salud”

Tabla N°03. Resultados de la prueba de estabilidad 2 del lote N°2

N° de muestra	Patógeno target	Ct	Resultado
01	TiLV	22.65	Detectado
02	TiLV	24.81	Detectado
Control negativo	TiLV	-	Conforme
Control negativo de extracción	TiLV	-	Conforme
Control positivo	TiLV	20.41	Conforme

*Fecha de la prueba: 12 de marzo de 2020

Tabla N°04. Resultados de la prueba de estabilidad 3 del lote N°2

N° de muestra	Patógeno target	Ct	Resultado
01	TiLV	22.27	Detectado
02	TiLV	23.46	Detectado
Control negativo	TiLV	-	Conforme
Control negativo de extracción	TiLV	-	Conforme
Control positivo	TiLV	27.65	Conforme

*Fecha de la prueba: 31 de marzo de 2020

3.4. Distribución y Transporte

Se enviaron dos (2) criviales estériles con tapa rosca conteniendo 60 mg de órganos y tejido de tilapia (*Oreochromis niloticus*).

Las muestras se enviaron en cajas térmicas con geles refrigerantes manteniendo una temperatura de 2 °C – 8°C durante su transporte. Cada laboratorio recibió un protocolo para manipular los ítems de ensayo para proceder con el análisis según su método de rutina.

Los ítems de ensayo fueron recepcionados por los laboratorios participantes de Lima en las instalaciones del SANIPES- Callao, el 04 de marzo del 2020, y por los laboratorios participantes de Provincia, el 05 de marzo del 2020; en ambos casos se hizo entrega de la caja térmica (tecnopor), previa verificación de la temperatura de transporte.

Los laboratorios participantes recibieron los ítems de ensayo de acuerdo con los siguientes Códigos: P-001, P-003, P-004, P-005, P-006, P-007 y P-008; asimismo se les asignó códigos al ítem de ensayo, los cuales se detallan en la Tabla N°07.



"Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres"
"Año de la Universalización de la Salud"

3.5. Contenido de los ítems de ensayo o resultados esperados

Tabla N°05. Resultados esperados

Código de los ítems de ensayo	Contenido de los ítems de ensayo
M-1 (Lote N° 1)	Órganos y tejido de tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)
M-2 (Lote N° 2)	Órganos y tejido de tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) + TiLV

Nota: SANIPES, no se responsabilizó por la estabilidad y homogeneidad de los ítems de ensayo, si éstos se analizan fuera del tiempo establecido en las instrucciones

4. Análisis Estadístico

El objetivo del tratamiento estadístico es obtener un resultado simple y transparente, de fácil comprensión para los laboratorios participantes; la evaluación cualitativa se realiza en base al reporte de falsos positivos, falsos negativos o resultados correctos.

Criterios y Evaluación del desempeño

Para el análisis estadístico de la prueba interlaboratorio cualitativa (Detectado/no detectado) de la detección de Virus de la Tilapia Lacustre (TiLV), se calculó el porcentaje de coincidencia (Tabla N°06). Un resultado es clasificado como satisfactorio si el porcentaje de coincidencia es igual a 100 %; no permitiendo resultados falsos positivos o falsos negativos.

Tabla N°06. Cálculo de porcentaje de coincidencia

Resultado reportado	Resultado esperado	
	Detectado	No detectado
Detectado	Verdadero positivo (VP)	Falso Positivo (FP)
No detectado	Falso negativo (FN)	Verdadero Negativo (VN)

$$\% \text{ Coincidencia} = \frac{VN + VP}{VP + FP + FN + VN} \times 100$$



“Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres”
“Año de la Universalización de la Salud”

5. Resultados

Los resultados fueron enviados al correo electrónico (interlaboratorios@sanipes.gob.pe), el 15 de marzo del 2020. Los resultados de los participantes al igual que la metodología utilizada se detallan en la tabla N°07.

Tabla N°07. Resultados de los laboratorios participantes en el interlaboratorio: Detección del Virus de la Tilapia Lacustre (TiLV).

Código de participante	Ítem de ensayo	Método de Ensayo / Primers	Resultado cualitativo esperado	Resultado del participante	Desempeño (% coincidencia)	EVALUACIÓN CUALITATIVA
P-001	M1	Semi-Nested RT-PCR para detección del Virus de la Tilapia Lacustre (TiLV). (Dong. et al. 2017. Emergence of Tilapia lake virus in Thailand and an alternative semi-nested RT-PCR for Detection. Aquaculture. 476. 111-118 pp). Primers: Nested ext-1, ME1 y 7450/150R/ME2.	NO DETECTADO	NO DETECTADO	100	Satisfactorio
	M2		DETECTADO	DETECTADO		
P-003	M1	LAB-PO62-M03. Detección del Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (VNPI) mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real. (Método propio)	NO DETECTADO	NO DETECTADO	100	Satisfactorio
	M2		DETECTADO	DETECTADO (Ct 23.28)		
P-004	M1	RT-semi nested-PCR, Dong, H.T., 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 seminested RT-PCR for detection. Aquaculture, advance online publication doi:10.1016/j.aquaculture.2017.04.019	NO DETECTADO	NO DETECTADO	100	Satisfactorio
	M2		DETECTADO	DETECTADO		
P-005	M1	Método de ensayo: Seminested RT-PCR Autor y artículo de referencia: 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 seminested RT-PCR for detection. Aquaculture., 476,	NO DETECTADO	NO DETECTADO	100	Satisfactorio
	M2		DETECTADO	DETECTADO		



“Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres”
“Año de la Universalización de la Salud”

		111-118 Primers: Nested ext-2: TTGCTCTGAGCAAGAGTACC Nested ext-1: TATGCAGTACTTTCCTGCC ME1: GTTGGGCACAAGGCATCCTA 7450/150R/ME2: TATCA CGTGCGTACTCGTTTCAGT				
P-006	M1	Se utilizaron los cebadores descritos por Tsofack <i>et al.</i> , 2017. Detection of Tilapia lake virus in clinical samples by culturing and nested reverse transcription PCR. Journal of Clinical Microbiology. Primers: Ext1: TATGCAGTACTTTCCTGCY Ext2 TTGCTCTGAGCAAGAGTACC ME1 GTTGGGCACAAGGCATCCTA ME2 TATCACGTGCGTAYTCGTTCA GT	NO DETECTADO	NO DETECTADO	100	Satisfactorio
	M2		DETECTADO	DETECTADO		
P-007	M1	Método Código LAB-PO63-M03 Referencia: Waiyamitra, P., Tattiyapong, P., Sirikanchana, K., et al. A TaqMan RT-qPCR assay for tilapia lake virus (TiLV) Detection in tilapia, Aquaculture, Volume 497, 2018, Pages 184-188.	NO DETECTADO	NO DETECTADO	100	Satisfactorio
	M2		DETECTADO	DETECTADO (Ct: 31.34)		
P-008	M1	Paper: A TaqMan RT qPCR assay_for tilapia lake virus TiLV detection in tilapia – (2018) Autores: Waiyamitra, Pitchaporn & Tattiyapong Primers + Sonda: TiLV93F_BTS: 5'-AGC CTG CYA CAC AGA AG-3' TiLV93R_BTS: 5'-CTG CYT GAG TTG TRC TYC T-3' SONDA_TiLV93_BTS: 6-FAM 5'-CTC TAC CRG CTA GTG CYC CA-3' BHQ1	NO DETECTADO	NO DETECTADO	100	Satisfactorio
	M2		DETECTADO	DETECTADO (Cq: 15.03 – Cq: 15.43)		

Resultado obtenido: 7/7 participantes con una coincidencia del 100%, en la prueba Detección del Virus de la Tilapia Lacustre (TiLV).

Prueba de detección: 100 % Satisfactorio



“Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres”
“Año de la Universalización de la Salud”

Tabla N°08. Resumen de resultados

Prueba	Resultados reportados	Resultados correctos	Resultados errados	Porcentaje de coincidencia
Detección del Virus de la Tilapia Lacustre (TiLV)	07	07	0	100.0 %

6. Comentarios

Participaron del Ensayo Interlaboratorio organizado por el SANIPES, 7 laboratorios de ensayos de Sanidad Animal, quienes obtuvieron un rendimiento satisfactorio 7/7 (100.0%).