

COMUNICADO N° 009-2023-SANIPES**REQUISITOS SANITARIOS PARA LA CERTIFICACIÓN SANITARIA CON FINES DE EXPORTACION DE LANGOSTINOS CON DESTINO A AUSTRALIA**

El Organismo Nacional de Sanidad Pesquera - SANIPES, en cumplimiento de las facultades que le confiere la Ley de Creación del Organismo Nacional de Sanidad Pesquera, Ley N° 30063 y sus modificatorias; el Reglamento de la Ley de Creación del Organismo Nacional de Sanidad Pesquera, D.S. N° 010-2019-PRODUCE, de lo señalado en el inciso 5.1 del artículo 5 del Decreto Supremo N° 017-2020-PRODUCE y las funciones administrativas enmarcadas en la Resolución de Presidencia Ejecutiva N°53-2021-SANIPES/PE, hace de conocimiento la actualización de los requisitos sanitarios para la emisión del certificado sanitario de exportación de Langostino Congelado con destino a Australia.

I. Productos de langostinos para consumo humano:

1. Langostinos crudos congelados sin cabeza, pelados y desvenados (se permite el último segmento de caparazón y los abanicos de la cola).
2. Productos altamente procesados (bola de masa hervida, samosa, roll, dim-sum).
3. Langostinos empanizados, rebozados o desmenuzados (sin cabeza y pelados) con cocción parcial aceptable.
4. Langostinos cocidos.

Las condiciones de importación de Australia para estos productos se encuentran en la Tabla de requisitos de productos de langostinos¹ (Resumen de las condiciones reforzadas para la importación de langostinos y productos del langostino destinados al consumo humano). Todos los productos deben ir acompañados del certificado sanitario.

II. Sobre el análisis de enfermedades de declaración obligatoria:

1. Todos los lotes² de langostinos crudos congelados previo a su exportación deben ser analizados para la detección de las enfermedades de declaración obligatoria ante la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA)³ empleando el método de PCR en tiempo real: Virus del Síndrome de las Manchas Blancas (WSSV) y Virus de la Enfermedad de la Cabeza Amarilla Genotipo 1 (YHV1)
2. Especificaciones del plan de muestreo para la detección del WSSV y YHV1:
 - Tamaño de muestra: 65 langostinos por lote, seleccionando de 13 cajas al azar (pool de cinco langostinos por cada caja).
 - Las muestras son obtenidas considerando los siguientes parámetros:
 - ✓ Prevalencia: 5%
 - ✓ Nivel de confianza: 95%
 - ✓ Sensibilidad del método de PCR: 90 %
 - ✓ Especificidad del método de PCR: 100 %
3. En el laboratorio de análisis, los tejidos de cada uno de los cinco langostinos por muestra se agruparán a efectos de las pruebas PCR, es decir, se realizarán 13 pruebas individuales para el WSSV y el YHV1.
4. Los ensayos de enfermedades de crustáceos (WSSV y YHV1) debe realizarse en laboratorios de diagnósticos que cuenten con acreditación (International Organization for Standardization - ISO 17025) y autorizados por SANIPES o previa evaluación excepcionalmente con participación en pruebas de interlaboratorio (Ring Test) para el diagnóstico de enfermedades listadas por la OMSA (no mayor de 2 años).
5. Para la detección del Virus del Síndrome de las Manchas Blancas (WSSV) debe emplearse el Procedimiento para la detección del WSSV del Gobierno de Australia (en adjunto) o equivalente técnico, el cual será verificado por SANIPES, para incrementar la sensibilidad y minimizar la posibilidad de rechazo de las

¹ <https://www.agriculture.gov.au/biosecurity-trade/import/goods/uncooked-prawns/prawn-products-requirements-table>

² A efecto de analizar los langostinos en relación a las enfermedades de interés, según la normativa de Australia, un lote puede definirse por uno de los siguientes:

a) Producto de una sola línea en una sola corrida de procesamiento.

b) Producto recolectado de un solo estanque de acuicultura (es decir, los langostinos recolectados de estanques separados se consideran poblaciones separadas a efectos de definir un lote).

c) Una especie de langostino capturado en estado salvaje durante un período de pesca continuo.

SANIPES consignará en el Certificado sanitario la definición de lote aplicable al envío.

³ https://www.agriculture.gov.au/biosecurity-trade/import/goods/uncooked-prawns#_14-import-permits-for-uncooked-prawns

"Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres"

"Año de la unidad, la paz y el desarrollo"

exportaciones y; para el Virus de la Enfermedad de la Cabeza Amarilla Genotipo 1 (YHV1) puede emplearse métodos especificados por la OMSA.

6. El tamaño de lote no puede ser superior a 1 contenedor de envío, sin embargo, puede haber múltiples lotes, si se identifican adecuadamente, dentro de un solo contenedor. Cada lote está sujeto a muestreo y pruebas para WSSV y YHV1.
7. Del informe de ensayo, si una o más muestras obtiene resultado fuera del parámetro establecido "positivo" para WSSV o YHV1, el resultado es representativo para todo el lote y no se puede exportar a Australia. Solo se pueden exportar los lotes con resultado "negativo" para ambas enfermedades.
8. El acta de inspección y/o muestreo y el informe de ensayo deben ser emitidos por entidades de inspección y/o ensayo acreditadas por INACAL y autorizadas por SANIPES.

III. Etiquetado:

Los productos que serán exportados deben cumplir los requisitos de etiquetado de bioseguridad establecidos por el Departamento de Agricultura, Pesca y Silvicultura, Autoridad Sanitaria de Australia⁴, asimismo, debe cumplir con lo indicado en la sección 1.2.1 del Capítulo 1 del Código de Normas Alimentarias de Australia y Nueva Zelanda⁵.

IV. Indicadores y límites microbiológicos:

1. Las infraestructuras pesqueras y acuícolas deberán garantizar el cumplimiento del Código de Normas Alimentarias de Australia y Nueva Zelanda⁵.
2. Los productos a exportar deben cumplir los límites microbiológicos establecidos en el apéndice 27 "Límites microbiológicos para los alimentos" del Código y las pruebas del Departamento de Agricultura aplicadas a los alimentos de riesgo⁶, los cuales se detallan a continuación:

Límites microbiológicos para los alimentos: Tabla - Apéndice 27

N°	Indicador microbiológico	Plan de muestreo		Límites	
		n	C	m	M
1	Staphylococcus coagulasa positivo	5	2	10 ² /g	10 ³ /g
2	Salmonella	5	0	No detectado en 25g	
3	Aerobios mesófilos				
	crustáceos cocidos	5	2	10 ⁵ /g	10 ⁶ /g
	crustáceos crudos	5	2	5 x 10 ⁵ /g	5 x 10 ⁶ /g
4	Listeria monocytogenes (Crustáceos cocidos que no favorecen el crecimiento de la bacteria).	5	0	100 cfu/g	-
5	Listeria monocytogenes (Crustáceos cocidos que favorecen el crecimiento de la bacteria).	5	0	No detectado en 25g	
6	Vibrio cholerae (Únicamente camarones y langostinos cocidos listos para comer)	5	0	No detectado en 25g	

Referencia: Requisitos de importación por tipo de alimento

<https://www.agriculture.gov.au/biosecurity-trade/import/goods/food/type/cooked-crustaceans>

(Firmado digitalmente)
JESSICA SUSAN BARRENECHEA CURO
Dirección de Habilitaciones y Certificaciones
Organismo Nacional de Sanidad Pesquera



Firmado digitalmente por:
BARRENECHEA CURO Jessica
Susan FAU 20505429050 soft
Motivo: En señal de
conformidad
Fecha: 25/01/2023 16:40:45-0500

⁴ https://www.agriculture.gov.au/biosecurity-trade/import/goods/uncooked-prawns#_12-biosecurity-labelling-requirements-for-uncooked-prawns

⁵ <https://www.foodstandards.gov.au/code/Pages/default.aspx>

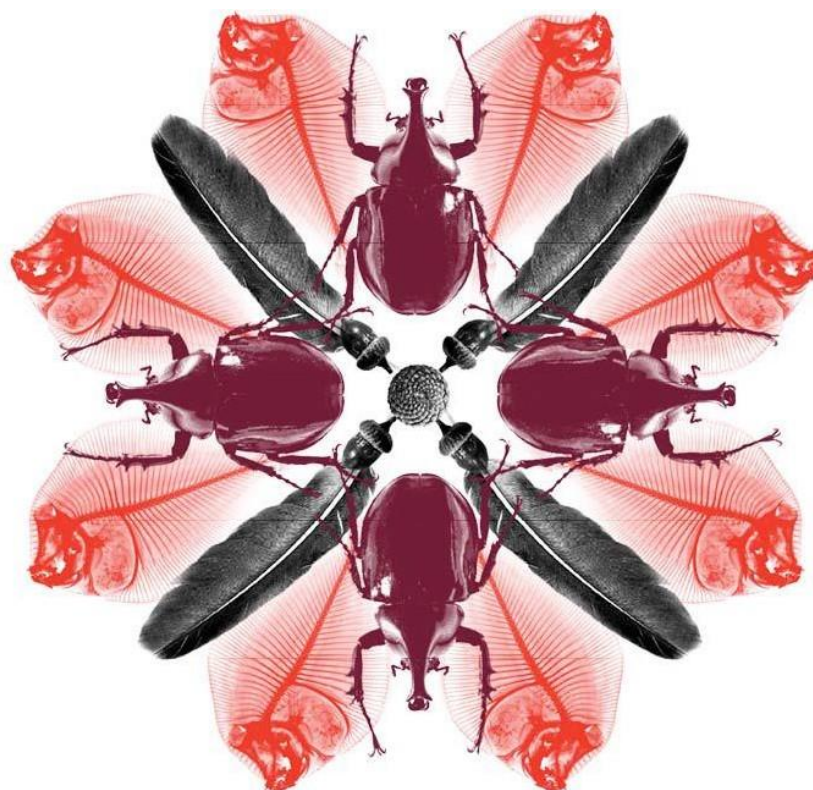
⁶ Pruebas aplicadas a los alimentos de riesgo, se encuentra indicado en el siguiente enlace: <https://www.agriculture.gov.au/biosecurity-trade/import/goods/food/type/cooked-crustaceans>



Australian Government
Department of Agriculture
and Water Resources

Procedimiento para la detección del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) para el manejo de riesgo de bioseguridad

Versión 1.1



© Commonwealth de Australia 2017

Titularidad de los derechos de propiedad intelectual

A menos que se indique lo contrario, los derechos de autor de esta publicación (y cualquier otro derecho de propiedad intelectual, si lo hubiera) son propiedad de la Commonwealth de Australia.

Licencia Creative Commons

Todo el material de esta publicación está sujeto a una licencia [Creative Commons Attribution \(CC BY\) 3.0 Australia](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/au/), a excepción del contenido suministrado por terceros, los logotipos y el escudo de la Commonwealth.



La licencia Creative Commons Attribution 3.0 Australia es un acuerdo de licencia estándar que permite copiar, distribuir, transmitir y adaptar esta publicación siempre que se cite la obra. En el siguiente enlace puede encontrarse un resumen de los términos de la licencia creativecommons.org/licenses/by/3.0/au/deed.es. Los términos completos de la licencia están disponibles en <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/au/legalcode>.

Las consultas sobre la licencia y cualquier uso de este documento deben enviarse a copyright@agriculture.gov.au

Cualquier material extraído de este documento debe atribuirse al Departamento de Agricultura y Recursos Hídricos, *Procedimiento para la detección del virus del síndrome de la mancha blanca para el manejo de riesgo de bioseguridad*.

Departamento de Agricultura y Recursos Hídricos
Dirección postal GPO Box 858 Canberra ACT 2601
+61 2 6272 2000
+61 2 6272 2001
Sitio web agriculture.gov.au

El Gobierno de Australia, a través del Departamento de Agricultura y Recursos Hídricos, ha preparado y recopilado cuidadosamente la información y los datos de esta publicación. No obstante, el Departamento de Agricultura y Recursos Hídricos, sus empleados y sus asesores declinan toda responsabilidad, incluida la responsabilidad por negligencia, y por cualquier pérdida, daño, lesión, gasto o coste en que incurra cualquier persona como resultado del acceso y uso de cualquier información o dato de esta publicación, en la medida máxima permitida por la ley.

Historial de versiones

La siguiente tabla detalla la fecha de publicación y las modificaciones de este documento.

Versión	Fecha de emisión	Detalles de la modificación
1	26/09/2017	Procedimiento para la detección del virus del síndrome de la mancha blanca para el manejo de riesgo de bioseguridad
1.1	13/10/2017	Actualizado con cambios menores

Contenido

Historial de versiones	2
Método de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real	4
1. Objetivo	4
2. Principio del método	4
3. Manejo de la contaminación cruzada	5
4. Control de calidad	6
5. Almacenamiento de muestras de tejido	6
6. Agrupación de muestras	7
7. Muestras de tejido adecuadas para la extracción de ADN	7
8. Extracción de ADN	7
9. TaqMan qPCR	8
10. Controles para la qPCR del WSSV	8
11. Protocolos para la TaqMan qPCR	8
12. Evaluación y registro de datos	10
13. Criterios de validez de los resultados	11
14. Interpretación de un resultado válido de una muestra individual	11
15. Informar los resultados de un lote de mercancías o de una población de animales	12
16. Revisión del procedimiento	13
17. Referencias	13

Procedimiento para la detección del virus del síndrome de la mancha blanca para el manejo de riesgo de bioseguridad

Método de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

1. Objetivo

Este procedimiento proporciona métodos PCR TaqMan (qPCR) en tiempo real para la detección del ADN del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) para el manejo de riesgo de bioseguridad.

En este procedimiento se describen dos métodos TaqMan qPCR para el WSSV, ambos reconocidos por el Departamento de Agricultura y Recursos Hídricos del Gobierno de Australia como adecuados para el propósito mencionado. Los dos métodos se basan en la TaqMan qPCR (Durand & Lightner 2002) descrita en el *Manual de Pruebas de Diagnóstico para Animales Acuáticos* de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y en la TaqMan qPCR de CSIRO (Sritunyalucksana et al. 2006).

Para obtener información sobre otros métodos (incluidos los métodos convencionales de PCR) para la vigilancia y el diagnóstico del WSSV, se debe consultar la última versión del capítulo sobre la [enfermedad de la mancha blanca](#) del *Manual de Pruebas de Diagnóstico para Animales Acuáticos* de la OIE.

2. Principio del método

El método TaqMan qPCR combina la amplificación del ADN diana/objetivo mediante PCR con la detección simultánea de la diana mediante una sonda específica marcada con un fluoróforo reportero. Los dos métodos de TaqMan qPCR del WSSV descritos están diseñados con cebadores y sondas específicas de la secuencia del ADN del WSSV basadas en regiones conservadas del genoma que codifican la proteína de la cápside del WSSV.

La sonda aumenta aún más la especificidad del método porque, además de los cebadores, esta sonda también debe unirse a la secuencia de ADN objetivo durante la fase de recocido de la reacción de PCR.

En primer lugar, se extrae el ADN total de las muestras de tejido y, a continuación, se utiliza la TaqMan qPCR para amplificar un fragmento específico del ADN del WSSV a lo largo de varios

ciclos. La acumulación de un fragmento específico de ADN se caracteriza por un aumento de la fluorescencia debido a la descomposición específica de la sonda TaqMan. La sonda lleva incorporado un fluoróforo reportero en el extremo 5' y un supresor en el extremo 3'. Cuando la sonda se degrada durante el paso específico de amplificación en los ciclos de reacción qPCR, el fluoróforo reportero se libera del supresor para que el reportero pueda emitir señal fluorescente. La señal fluorescente resultante se detecta mediante una máquina PCR en tiempo real como el Qiagen Rotor-Gene System (Qiagen) o el 7500 fast real-time PCR System (Life Technologies).

Se debe establecer un umbral para evaluar los datos de una reacción completa. Si se registra una curva de amplificación típica para una muestra, la intersección entre la curva de amplificación y la línea del umbral se utiliza para determinar el valor del umbral de ciclo (Ct) para la muestra. Por lo tanto, el valor Ct se define como el número de ciclo de PCR en el que la fluorescencia registrada cruza el umbral.

El valor Ct es una medida relativa de la concentración de ADN diana en la mezcla de reacción de qPCR. El valor numérico del Ct no solo depende de la cantidad inicial de ADN diana en la mezcla de reacción de qPCR, sino también de algunos factores independientes de la plantilla. Por ello, el valor de Ct para la misma muestra homogeneizada puede variar en cierta medida dentro de un mismo laboratorio y entre distintos laboratorios. Un valor Ct está inversamente asociado a la concentración logarítmica del ADN diana/objetivo, es decir, un valor Ct alto representa una baja concentración de ADN diana en la muestra, y viceversa.

3. Manejo de la contaminación cruzada

La TaqMan qPCR es muy sensible, por lo que deben tomarse precauciones para evitar la contaminación cruzada en todas las etapas del proceso de prueba. Esto incluye la contaminación cruzada de las muestras, el ADN extraído, el equipo y los reactivos utilizados durante la prueba. El agua recuperada de los contenedores de muestras, como las bolsas de plástico, puede contener altos niveles de virus y es una potencial fuente de contaminación.

Las medidas para evitar la contaminación cruzada incluyen áreas de trabajo separadas y flujos de trabajo dedicados a las diferentes etapas del procedimiento. Deben establecerse áreas de laboratorio dedicadas a las diferentes etapas del procedimiento y documentarse y seguirse las prácticas de flujo de trabajo en cada una de ellas.

Idealmente debe haber salas separadas o áreas dedicadas a las siguientes actividades:

- preparación de mezclas magistrales de qPCR, cebadores, sondas y tubos o placas de reacción
- preparación de la muestra de tejido
- extracción de ácido nucleico

- adición de plantilla a los tubos o placas de reacción PCR
- ejecución de ensayos en un sistema PCR en tiempo real.

Todos los reactivos, incluida el agua, deben ser de biología molecular y estar certificados como libres de DNasa. Deben almacenarse en condiciones óptimas. Deben utilizarse puntas de barrera como filtro para todos los procedimientos.

Todos los instrumentos y contenedores de muestras deben estar limpios y no contaminados. Se recomienda que las muestras se manipulen y procesen utilizando recipientes e instrumentos estériles y desechables (de un solo uso).

4. Control de calidad

Las pruebas moleculares con fines de bioseguridad deben llevarse a cabo en el marco de un programa de manejo de calidad acreditado y auditado conforme a la norma internacional ISO/IEC 17025. Un programa de manejo de calidad incluirá una evaluación inicial de los kits y reactivos; validación de los métodos de ensayo; evaluación interna continua mediante el uso obligatorio de muestras de control de calidad adecuadas; y supervisión del rendimiento mediante programas externos de evaluación de calidad o de ensayos de aptitud.

Las muestras de control de calidad (controles positivos, negativos y de reactivos) deben especificarse en los protocolos del laboratorio e incluirse en cada ejecución. Los datos generados deben registrarse para controlar el rendimiento de cada serie.

Si las muestras resultan negativas para el WSSV, debe examinarse la eficacia de la extracción del ADN y descartarse la presencia de inhibidores de la PCR. Deben seguirse estos pasos para validar los resultados negativos de la prueba del WSSV. Para ello, debe realizarse la amplificación de un fragmento de ADN conservado del crustáceo huésped o de un fragmento de ADN exógeno añadido a las muestras de tejido previo a la extracción de ADN.

5. Almacenamiento de muestras de tejido

Una vez recibidas, las muestras congeladas deben almacenarse a -20°C o a una temperatura inferior. En el caso de los langostinos importados, las muestras restantes de langostinos deben almacenarse a -20°C o a una temperatura inferior luego del procesamiento de las muestras para la extracción de ácidos nucleicos. Estas muestras deben seguir almacenándose durante al menos 21 días después de la publicación del informe final.

En el caso de las muestras frescas, una vez tomados los tejidos adecuados para la extracción de ADN, las muestras deben almacenarse inmediatamente a -20°C o a una temperatura inferior, o colocarse en etanol al 80% (v/v) y almacenarse a temperatura ambiente.

6. Agrupación de muestras

Las muestras tomadas para pruebas moleculares de ADN del WSSV pueden combinarse como una agrupación de muestras de no más de cinco especímenes por agrupación de muestras.

7. Muestras de tejido adecuadas para la extracción de ADN

Langostinos con cáscara enteros o sin cabeza: los tejidos adecuados son las branquias, los pleópodos, el epitelio cuticular, los músculos o las muestras de hisopos de los músculos. Deben evitarse los ojos de los langostinos, los globos oculares y los órganos internos de la cabeza, debido a que contienen inhibidores de la PCR.

Langostinos sin cáscara sin cabeza: los tejidos adecuados son el epitelio cuticular, los músculos o las muestras de hisopo de los músculos. Los langostinos marinados deben rasparse para eliminar la marinada en la medida de lo posible.

Cangrejos: los tejidos adecuados son las branquias o el epitelio cuticular.

8. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN deben utilizarse kits de extracción de ácidos nucleicos disponibles en el mercado, como el mini kit de ADN/ARN viral QIAamp (Qiagen) o el kit de aislamiento de ARN viral MagMAX™ 96 (Life Technologies).

Antes de utilizar de forma rutinaria un nuevo tipo de kit o método de extracción de ADN, se debe evaluar y validar en el laboratorio el rendimiento equivalente del kit o método. Como mínimo, se deberán realizar experimentos de extracción de ADN con un panel definido de muestras de control positivas y negativas y registrar los resultados.

Control negativo de extracción de ADN: para vigilar la posible contaminación de los reactivos y el equipo, en la preparación de cada lote de muestras deben incluirse muestras de control negativo para la extracción de ADN. El agua, el tampón o los tejidos de langostinos que se sabe que son negativos para el WSSV pueden utilizarse como controles negativos.

Control positivo de extracción de ADN: para controlar la eficacia de la extracción de ADN y la posible presencia de inhibidores, se puede añadir un fragmento de ADN exógeno a todas las muestras antes de la extracción de ADN. Los cebadores y la sonda pertinentes para el fragmento de ADN exógeno pueden utilizarse en una reacción de PCR para detectar esta diana.

Alternativamente, la detección de un fragmento de ADN conservado de los crustáceos huéspedes puede utilizarse para demostrar la eficacia de la extracción de ADN y la ausencia de

Inhibidores en la reacción de PCR.

No se requiere medir la concentración de ADN extraído de cada muestra. Sin embargo, la entrada de ADN para la reacción qPCR debe ser superior a 0,4 ng/μl (concentración final en la mezcla de reacción qPCR). Los ensayos de extracción de ADN deben realizarse utilizando el tipo y el volumen de las muestras de tejido seleccionadas por el laboratorio, de modo que el proceso de extracción de ADN se optimice para las condiciones de la qPCR. Esto puede realizarse como parte del proceso de validación del ensayo.

9. TaqMan qPCR

Se debe utilizar una mezcla magistral comercial de qPCR y su rendimiento debe ser evaluado y validado. Los kits alternativos deben ser validados antes de ser utilizados de forma rutinaria en un laboratorio.

Para las pruebas iniciales en un laboratorio autorizado, los extractos de ADN deben analizarse por separado y sin dilución, utilizando uno de los dos métodos de qPCR descritos en este procedimiento. Si las muestras resultan negativas para el WSSV, y los resultados de la PCR del fragmento de ADN del huésped o del exógeno indican un efecto inhibidor en la reacción de PCR, los extractos de ADN de estas muestras deberán diluirse a 1:10 y volver a analizarse. Si los extractos de ADN diluidos a 1:10 siguen presentando un efecto inhibidor, estas muestras se considerarán "no aptas para un análisis fiable". Bajo esta circunstancia, el laboratorio deberá ponerse en contacto con el remitente de la muestra o con el organismo regulador pertinente para obtener más información sobre cómo proceder.

10. Controles para la qPCR del WSSV

Los siguientes controles negativos y positivos deben incluirse en cada ejecución de la qPCR del WSSV:

- **Un control negativo** para la extracción de ADN. Se trata de controlar si los reactivos y el equipo utilizados para la extracción de ADN están libres de contaminación del ADN del WSSV.
- **Un control sin placa**, que contiene todos los demás componentes de la mezcla de reacción de la qPCR. Esto es para controlar si los reactivos y el equipo utilizados para la qPCR están libres de contaminación del ADN del WSSV.
- **Al menos un control positivo** para el ADN del WSSV. El ADN extraído de tejidos de langostinos confirmados como infectados por el WSSV o un plásmido que contenga el fragmento de ADN del WSSV objetivo deberán utilizarse como controles positivos.

11. Protocolos para la TaqMan qPCR

Las siguientes secciones describen los protocolos detallados de los métodos TaqMan qPCR. Cuando la concentración o el volumen de los componentes de la qPCR se ajustan a cantidades diferentes en un laboratorio, estos cambios deben validarse y documentarse.

11.1. OIE WSSV TaqMan qPCR (basado en Durand & Lightner 2002)

Tabla 1: Cebadores y secuencias de sonda de la qPCR de la OIE (el tamaño del amplicón es de 69 pb)

Cebador	Secuencia
WSSV 1011F	5'- TGG TCC CGT CCT CAT CTC AG -3'
WSSV 1079R	5'- GCT GCC TTG CCG GAA ATT A -3'
Sonda	
Sonda WSSV	5'- AGC CAT GAA TGC CGT CTA TCA CAC A -3'

Tabla 2: Mezcla de reacción de la qPCR de la OIE

Reactivo	Volumen (µl)
Agua	3.75 - 6.75
TaqMan Universal PCR Master Mix	12.5
Primer WSSV OIE 1011F (6 - 18 µM)*	1.25
Primer WSSV OIE 1079R (6 - 18 µM)*	1.25
Sonda TaqMan OIE WSSV (3 - 5 µM)*	1.25
Plantilla de ADN	2 - 5
Volumen total	25

* La gama de concentraciones es solo indicativa.

Tabla 3: Condiciones del ciclo térmico de la qPCR de la OIE

Ciclos	Temperatura y tiempo*
1	50°C durante 2 minutos
1	95°C durante 10 minutos
45	95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto

*Solo se pueden variar la temperatura y el tiempo (no el número de ciclos) de acuerdo con las condiciones estándar recomendadas por el fabricante. Cualquier cambio en estos parámetros debe registrarse en el protocolo de pruebas del laboratorio.

11.2. CSIRO WSSV qPCR (basado en Sritunyalucksana et al. 2006)

Tabla 4: Cebadores y secuencias de sonda de la qPCR de CSIRO (el tamaño del amplicón es de 77 pb)

Cebador	Secuencia
WSSV-F	5'- CCG ACG CCA AGG GAA CT -3'
WSSV-R	5'- TTC AGA TTC GTT ACC GTT TCC A -3'
Sonda	
Sonda WSSV	5'- CGC TTC AGC CAT GCC AGC CG -3'

Tabla 5: Mezcla de reacción de la qPCR de CSIRO

Reactivo	Volumen (µl)
Agua	3.75 - 6.75
TaqMan Universal PCR Master Mix	12.5
Primer WSSV-F (6 - 18 µM)*	1.25
Primer WSSV-R (6 - 18 µM)*	1.25
Sonda TaqMan CSIRO WSSV (3 - 5 µM)*	1.25
Plantilla de ADN	2 - 5
Volumen total	25

* La gama de concentraciones es solo indicativa.

Tabla 6: Condiciones del ciclo de la qPCR de CSIRO

Ciclos	Temperatura y tiempo*
1	50°C durante 2 minutos
1	95°C durante 10 minutos
45	95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto

*Solo se pueden variar la temperatura y el tiempo (no el número de ciclos) de acuerdo con las condiciones estándar recomendadas por el fabricante. Cualquier cambio en estos parámetros debe registrarse en el protocolo de pruebas del laboratorio.

12. Evaluación y registro de datos

Una vez finalizada cada ejecución de la qPCR, deben evaluarse los parámetros pertinentes para garantizar que las condiciones y las reacciones progresaron como se esperaba según el protocolo de pruebas del laboratorio.

El umbral debe establecerse en un valor fijo que se encuentre en la región del inicio de la exponencial amplificación en todas las amplificaciones del gráfico. El umbral no debe situarse ni en la fase de meseta ni en la fase lineal inicial de la amplificación. El valor del umbral debe ser documentado en el protocolo de ensayo del laboratorio y utilizado de forma coherente para el ensayo de muestras de rutina y de muestras utilizadas para los programas pertinentes de garantía de calidad o de ensayos de aptitud.

Debe registrarse el valor Ct de cualquier muestra que produzca una curva de amplificación típica antes de 45 ciclos. Estos datos, junto con los informes finales, deben conservarse durante al menos dos años a partir de la fecha de los informes finales elaborados.

13. Criterios de validez de los resultados

Para que los resultados de la qPCR del WSSV sean válidos, deben cumplirse los siguientes criterios:

- Ni el control negativo de extracción ni el control sin placa deben producir curvas de amplificación típica en 45 ciclos.
- Cada control positivo para el ADN del WSSV debe producir una curva de amplificación típica con un valor Ct dentro del rango aceptable. Este rango debe determinarse en cada laboratorio y especificarse en el documento de manejo de calidad del laboratorio.
- Si una o más muestras de un lote o de una población de animales resultan positivas para el WSSV, no se requiere la detección de un fragmento de ADN del crustáceo huésped o de un fragmento de ADN exógeno.
- Si todas las muestras de un lote o de una población de animales resultan negativas para el WSSV, deberá realizarse la detección de un fragmento de ADN del crustáceo huésped o de un fragmento de ADN exógeno para demostrar la eficacia de la extracción de ADN y la ausencia de inhibidores de la PCR. En estas muestras debe observarse una curva de amplificación típica (si se utiliza la qPCR) o una banda del fragmento de ADN esperado (si se utiliza la PCR convencional).

Si no se cumple alguno de los criterios anteriores, deben repetirse las pruebas y debe seguirse el procedimiento del laboratorio para investigar los resultados anormales. Si el problema no se rectifica en cinco días naturales/continuos, el laboratorio debe ponerse en contacto con el remitente de la muestra y con el organismo regulador pertinente para obtener más información sobre cómo proceder.

14. Interpretación de un resultado válido de una muestra individual

Un resultado positivo de la qPCR del WSSV indica la presencia de un fragmento de ADN del WSSV (objetivo del método específico de qPCR aplicado) en la muestra analizada. Un resultado negativo de la qPCR del WSSV indica que no se ha detectado ADN del WSSV en la muestra analizada.

Utilizando el método qPCR de la OIE o el método qPCR de CSIRO, deben aplicarse las siguientes normas para interpretar los resultados como válidos para el manejo de riesgo de bioseguridad.

Para las pruebas iniciales:

- Una muestra que no produce una curva de amplificación típica en 45 ciclos es "**negativa**" para el WSSV.
- Una muestra que genera una curva de amplificación típica cruzando el umbral antes de 40 ciclos es "**positiva**" para el WSSV.
- Una muestra que genera una curva de amplificación típica cruzando el umbral entre 40 y 45 ciclos, o una muestra que genera una curva de amplificación típica dentro de 45 ciclos pero no cruza el umbral, es "**sospechosamente positiva**" para el WSSV. Las muestras "sospechosamente positivas" deben volver a analizarse en el mismo laboratorio utilizando uno de los dos métodos de qPCR descritos en este procedimiento.
 - Si el resultado de la repetición de la prueba es positivo o se sospecha que es positivo, la muestra debe notificarse como "**positiva**".
 - Si el resultado de la repetición de la prueba es negativo, la muestra seguirá siendo notificada como "**sospechosamente positiva**".
 - Si el responsable de la mercancía desea que se confirme una muestra "sospechosamente positiva", las pruebas de confirmación solo pueden realizarse en el Laboratorio Australiano de Sanidad Animal (AAHL). El resultado de las pruebas de confirmación del AAHL es definitivo.

Para las pruebas de confirmación:

- Una muestra que no produce una curva de amplificación típica en 45 ciclos es "**negativa**" para el WSSV.
- Una muestra que genera una curva de amplificación típica en 45 ciclos es "**positiva**" para el WSSV.

15. Informar los resultados de un lote de mercancías o de una población de animales

Si se analiza un conjunto de muestras de un lote de mercancías o de una población de animales, el laboratorio debe aplicar las siguientes normas para informar el resultado del lote o de la población:

- Si todas las muestras de un lote o de una población son "negativas", el lote o la población se declaran "**negativos**" para el WSSV.
- Si una o más de las muestras de un lote o de una población resultan "positivas" o "sospechosamente positivas", el lote o la población se declaran "**positivos**" para el WSSV.

16. Revisión del procedimiento

Este procedimiento puede ser revisado y modificado por el Departamento de Agricultura y Recursos Hídricos del Gobierno de Australia, según sea necesario.

17. Referencias

Durand, SV & Lightner, DV 2002, 'Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp'. *Journal of Fish Diseases*, vol. 25, pp. 381-389.

OIE 2017, [Enfermedad de las manchas blancas](#), París, consultado el 19 de septiembre de 2017.

Sritunyalucksana, K, Srisala, J, McColl, K, Nielsen, L & Flegel, TW 2006, 'Comparison of PCR testing methods for white spot syndrome virus (WSSV) infections in penaeid shrimp', *Aquaculture*, vol. 255, pp. 95-104.