

PRÓLOGO

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) es una organización intergubernamental que se estableció con el fin de promover la sanidad animal en el mundo. Las principales actividades de la organización, que se creó en 1924 y contaba con 178 Países Miembros en 2012, son las siguientes:

1. Asegurar la transparencia de la situación mundial relativa a las enfermedades de los animales terrestres y acuáticos.
2. Recabar, analizar y difundir información científico-veterinaria.
3. Ofrecer conocimiento experto y promover la solidaridad internacional para el control de las enfermedades de los animales.
4. Dentro de su mandato, sujeto al Acuerdo sobre la aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias (Acuerdo) MSF con la OMC (Organización Mundial del Comercio), proteger el comercio mundial mediante la publicación de normas sanitarias para el comercio internacional de animales y de productos de origen animal.
5. Mejorar el marco legal y los recursos de los Servicios veterinarios nacionales y de las Autoridades competentes correspondientes.
6. Garantizar mejor la seguridad de los alimentos de origen animal y fomentar el bienestar de los animales terrestres y acuáticos mediante procedimientos científicos.

Los procedimientos de diagnóstico de algunas enfermedades de los animales acuáticos solían incluirse en el *Código Internacional de Sanidad Animal* de la OIE (edición de 1986), pero pronto resultó evidente la necesidad de contar con publicaciones específicas sobre sanidad de los animales acuáticos. Las razones para ello estriban en que muchos aspectos de las condiciones, problemas y necesidades propias de los medios de acuicultura difieren de los relacionados con los animales terrestres. Asimismo, como sigue creciendo la intensidad e importancia de la producción y el comercio internacionales de animales acuáticos y de los productos con ellos relacionados, se están incluyendo más enfermedades en el *Código sanitario para los animales acuáticos* de la OIE (*Código acuático*).

El objetivo de este *Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos* (*Manual acuático*) es proporcionar un enfoque uniforme para la detección de las enfermedades incluidas en la lista del *Código acuático*, cumpliendo así con los requisitos para la certificación sanitaria de cara a los programas de control y prevención de las enfermedades y al comercio de animales acuáticos y de productos relacionados con dichos animales.

Aunque hay muchas publicaciones sobre detección y control de las enfermedades de los animales acuáticos, el *Manual acuático* constituye un documento clave y único en el que se describen los procedimientos que deberían aplicarse a las enfermedades de la lista de la OIE en los laboratorios de todo el mundo especializados en sanidad de animales acuáticos, aumentando de este modo la eficiencia y propiciando la mejora de la sanidad de los animales acuáticos en todo el mundo. Los requisitos publicados en este *Manual acuático* son reconocidos como normas internacionales por la OMC.

La compilación del *Manual acuático* fue encomendada por la Asamblea mundial de Delegados (de los Países Miembros de la OIE) a la Comisión de normas sanitarias para los animales acuáticos de la OIE (Comisión para los animales acuáticos). La Comisión para los animales acuáticos, elegida cada tres años por la Asamblea mundial, contó con la ayuda considerable de expertos en este ámbito a los que se solicitó su contribución. Se enviaron todos los proyectos de capítulo a los Países Miembros de la OIE, así como a expertos revisores seleccionados, para recabar su revisión y comentarios. El *Manual acuático* se revisará y actualizará de forma continua a medida que se disponga de nueva información sobre enfermedades de los animales acuáticos en general, o sobre nuevas enfermedades emergentes en particular. Se publicará una nueva edición cada cuatro años a partir de 2014; en la página Web de la OIE se podrá disponer de las modificaciones que se vayan produciendo.

Dr Bernard Vallat
Director General de la OIE
Diciembre de 2014

Dr Franck Berthe
Presidente de la Comisión para los animales acuáticos
Diciembre de 2014

*
* *

INTRODUCCIÓN

Para que los Servicios de Sanidad de los Animales Acuáticos puedan implementar los programas de diagnóstico, vigilancia y comercio, es fundamental que cuenten con unos resultados de laboratorio válidos. Este *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Acuáticos (Manual Acuático)* constituye una herramienta para que los Servicios de Sanidad de los Animales Acuáticos lleven a cabo unos análisis de laboratorio de detección de agentes patógenos que afectan negativamente a los animales acuáticos.

En el apartado 1 del *Manual Acuático* se aportan recomendaciones sobre las disposiciones generales necesarias para hacer viable una capacidad analítica efectiva en el laboratorio. El Capítulo 1.1. destaca los aspectos y las consideraciones importantes que debe abordar un laboratorio durante el diseño y mantenimiento de sus sistemas de gestión de la calidad, tanto si ha recibido acreditación formal como si no. Las recomendaciones de este capítulo cubren los aspectos técnicos, de gestión y de funcionamiento de los análisis, así como la interpretación de los resultados analíticos. En el Capítulo 1.2 se aportan recomendaciones sobre los principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico. La validación es fundamental para garantizar que una prueba es adecuada para el propósito para el cual está pensada, como la demostración de ausencia de enfermedad, la confirmación del diagnóstico de casos clínicos o la estimación de patrones de infección en una población. Este capítulo presenta un enfoque de la validación analítica por etapas, que incluye datos sobre el rendimiento analítico, el rendimiento diagnóstico, la reproducibilidad, el uso de las pruebas y el seguimiento periódico.

El apartado 2 del *Manual Acuático* aporta recomendaciones relativas al diagnóstico de enfermedades específicas de los anfibios, los crustáceos, los peces y los moluscos. Se han incluido algunos capítulos más para enfermedades que ya no están en la lista de la OIE, pero que se mantienen en el *Manual Acuático* a petición de Países Miembros de la OIE por su importancia para el comercio o la productividad. Cada capítulo específico de enfermedad sigue un formato similar con información sobre la enfermedad (factores del agente, factores del hospedador, patrones de la enfermedad, control y prevención), la obtención de muestras, los métodos de diagnóstico, la idoneidad de las pruebas recomendadas para cada uso previsto, las pruebas recomendadas para la vigilancia destinada a declarar la ausencia de enfermedad y las definiciones de lo que es un caso sospechoso y un caso confirmado.

Las disposiciones generales y las recomendaciones específicas de cada enfermedad del *Manual Acuático* en conjunto aportan información técnica que respalda las normas del *Código Sanitario para los Animales Acuáticos* de la OIE (*Código Acuático*). Estas normas consisten en la obligación de los Países Miembros de notificar la aparición de las enfermedades de la lista de la OIE; la exigencia de demostrar ausencia de enfermedad en un país, zona o compartimiento; la exigencia de responder a la aparición de una enfermedad; y la exigencia de que el país vuelva a estar libre de la enfermedad tras un brote. Las recomendaciones del *Manual Acuático* y del *Código Acuático* se complementan entre sí y ambos documentos deben utilizarse conjuntamente cuando un país desarrolle o se comprometa a desarrollar actividades de vigilancia con arreglo a las Normas de la OIE.

Se describen métodos de detección basados en los ácidos nucleicos para todas las enfermedades del *Manual Acuático*. Ha habido un rápido aumento del uso de métodos moleculares para las enfermedades de los animales acuáticos, porque, en comparación con muchos métodos tradicionales, son más rápidos, sensibles y rentables, y no exigen la presencia de personal demasiado especializado. Los métodos moleculares son especialmente importantes en circunstancias en las que no se dispone de ciertos métodos tradicionales; por ejemplo, para moluscos y crustáceos no se dispone de aislamiento vírico en cultivo celular debido a la falta de líneas celulares adecuadas. Sin embargo, a pesar de la obvia importancia de los métodos moleculares, es fundamental que se conozcan sus limitaciones y que se utilicen adecuadamente como parte de una investigación diagnóstica completa. En este sentido, deben tenerse muy en cuenta las definiciones del apartado 7 de cada capítulo específico de enfermedad, con el fin de garantizar un enfoque diagnóstico que permita llegar a lo que se entiende por caso sospechoso o caso confirmado.

Cada vez se dispone de más kits comerciales para el diagnóstico de enfermedades de los animales acuáticos. El uso de kits comerciales solo es aceptable si se han validado como adecuados para el fin para el que han sido diseñados. La OIE aporta datos sobre la idoneidad de cada kit comercial en el *Registro de kits de diagnóstico validados y certificados por la OIE*. Los kits comerciales que constan en este registro se han evaluado de

acuerdo con el *Procedimiento de la OIE para el Registro de los Kits de Diagnóstico*. Este registro se puede consultar en <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/certification-of-diagnostic-tests/the-register-of-diagnostic-tests/>

La información del *Manual Acuático* se ha preparado a tenor de la *Comisión de Normas Sanitarias para los Animales Acuáticos* y gracias a los conocimientos aportados por los Laboratorios de Referencia y los Centros Colaboradores de la OIE. Todas las recomendaciones de este *Manual Acuático* han sido adoptadas por la Asamblea Mundial de Delegados de la OIE y, como tales, constituyen normas aceptadas a nivel internacional. La versión final de cada capítulo adoptado es producto de exhaustivas consultas y comentarios por parte de los Países Miembros de la OIE. En el siguiente apartado de este *Manual Acuático* se encuentra una lista de los principales contribuyentes a cada capítulo.

Los métodos de diagnóstico de las enfermedades de los animales acuáticos evolucionan rápidamente. Cada capítulo del *Manual Acuático* se actualiza periódicamente para incluir los últimos hallazgos científicos y avances tecnológicos. Todos los capítulos modificados se presentan a la Asamblea para que los adopte en mayo de cada año y, si lo hace, se publican en la página web de la OIE poco después. Se alienta a los usuarios de este manual a consultar la página web de la OIE para conocer las últimas actualizaciones. Están identificadas claramente con el año en que se han adoptado.

*
* *

COLABORADORES

COLABORADORES CON SUS DIRECCIONES PROFESIONALES EN EL MOMENTO DE LA REDACCIÓN DE SUS CONTRIBUCIONES

Los capítulos del *Manual de animales acuáticos* son escritos por autores invitados (expertos de los Laboratorios de Referencia de la OIE, cuando sea posible). Siguiendo el procedimiento estándar de la OIE, todos los capítulos se entregan a los países miembros de la organización y a otros expertos para que ofrezcan sus comentarios a la misma. Seguidamente, la Comisión de Estándares Sanitarios de los Animales Acuáticos modifica el texto incorporando los comentarios recibidos y el texto se distribuye por segunda vez como la versión final que será presentado para su aprobación por la Asamblea Mundial de Delegados de la OIE durante la Sesión General de mayo de cada año. De esta forma, el *Manual de animales acuáticos* se convierte en un texto de referencia de la OIE que es fruto del consenso internacional. Por esa razón, los nombres de los colaboradores no aparecen en el correspondiente capítulo sino que se ofrecen en el listado que se presenta a continuación. La Comisión de los Animales Acuáticos quiere manifestar su agradecimiento por el trabajo de los siguientes colaboradores:

1.1.1. Gestión de calidad en los laboratorios de pruebas veterinarias

Dr R.A. Williams,
AHVLA-Penrith, Merrythought, Calthwaite,
Penrith, Cumbria CA11 9RR, Reino Unido.

1.1.2. Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas¹

Dr R.H. Jacobson (se ha jubilado)
27801 Skyridge Drive, Eugene, Oregon 97405,
EE. UU.

Dr P. Wright (se ha jubilado)
Aquatic Animal Health, Fisheries and Oceans
Canada, 343 University Avenue, Moncton,
New Brunswick, E1C 9B6, Canadá.

1.1.3. Métodos para la desinfección de los establecimientos de acuicultura

Dr B.J. Hill (se ha jubilado)
The Centre for Environment, Fisheries &
Aquaculture Science (Cefas), Weymouth
Laboratory, Barrack Road, The Nothe, Weymouth
DT4 8UB, Reino Unido.

Dr F. Berthe
European Food Safety Authority (EFSA),
Animal Health and Animal Welfare unit – AHAW,
Largo N. Palli 5/A, 43100 Parma, Italia.

Prof. D.V. Lightner
Aquaculture Pathology Laboratory, Department of
Veterinary Science and Microbiology, University of
Arizona, 1117 E. Lowell, Building 90, Tucson, AZ
85721, EE. UU.

Dr R. Enriquez Saís
Patología Animal/Ictiopatología, Universidad
Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia, Chile.

¹ Este capítulo ha sido actualizado por consenso del Grupo *ad hoc* de la OIE encargado de la validación de las pruebas de diagnóstico.

Parte 2. Introducción general

Dr B.J. Hill (se ha jubilado)

The Centre for Environment, Fisheries & Aquaculture Science (Cefas), Weymouth Laboratory, Barrack Road, The Nothe, Weymouth DT4 8UB, Reino Unido.

Dr F. Berthe

European Food Safety Authority (EFSA), Animal Health and Animal Welfare unit – AHAW, Largo N. Palli 5/A, 43100 Parma, Italia.

Prof. D.V. Lightner

Aquaculture Pathology Laboratory, Department of Veterinary Science and Microbiology, University of Arizona, 1117 E. Lowell, Building 90, Tucson, AZ 85721, EE. UU.

2.1.0. Enfermedades de los anfibios – Introducción general

Capítulo de preparación

- 2.1.1. Infección por Batrachochytrium dendrobatidis*
- 2.1.2. Infección por ranavirus*

Dr A. Hyatt (se ha jubilado)

Australia Animal Health Laboratory (AAHL), CSIRO Livestock Industries, Private Bag 24 (Ryrie Street), Geelong, VIC 3220, Australia.

Prof. R. Whittington

Faculty of Veterinary Science, University of Sydney, Private Bag 3, Camden NSW 2570, Australia.

2.2.0. Enfermedades de los crustáceos – Introducción general

Prof. D.V. Lightner

Aquaculture Pathology Laboratory, Department of Veterinary Science and Microbiology, University of Arizona, 1117 E. Lowell, Building 90, Tucson, AZ 85721, EE. UU.

2.2.1. Plaga del cangrejo de río (Aphanomyces astaci)

Dr B. Oidtmann

The Centre for Environment, Fisheries & Aquaculture Science (Cefas), Weymouth Laboratory, Barrack Road, The Nothe, Weymouth, Dorset DT4 8UB, Reino Unido.

- 2.2.2. Necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa*
- 2.2.3. Mionecrosis infecciosa*

Prof. D.V. Lightner

Aquaculture Pathology Laboratory, Department of Veterinary Science and Microbiology, Pharmacy/Microbiology, University of Arizona, 1117 E. Lowell, Building 90, Room 202, Tucson, AZ 85721, EE. UU.

2.2.4. Hepatopancreatitis necrotizante

Dr M.S. Morales Covarrubias

Laboratorio de Histología, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Av. Sabalo-Cerritos s/n, Mazatlan, Sinaloa, C. P. 82010, México.

2.2.5. Síndrome de Taura

Prof. D.V. Lightner

Aquaculture Pathology Laboratory, Department of Veterinary Science and Microbiology, Pharmacy/Microbiology, University of Arizona, 1117 E. Lowell, Building 90, Room 202, Tucson, AZ 85721, EE. UU.

-
- | | |
|---|--|
| <i>2.2.6. Enfermedad de las manchas blancas</i> | Dr G. Chu-Fang Lo
College of Bioscience and Biotechnology,
National Cheng Kung University, No.1, University
Road, Tainan City 701, Taipei Chino. |
| <i>2.2.7. Enfermedad de la cola blanca</i> | Dr A. Sait Sahul Hameed
Aquaculture Biotechnology Division, Department
of Zoology, C. Abdul Hakeem College,
Melvisharam-632 509, Vellore Dt. Tamil Nadu,
India. |
| <i>2.2.8. Infección por virus de la cabeza amarilla</i> | Dr P. Walker
Australia Animal Health Laboratory (AAHL),
CSIRO Livestock Industries, Private Bag 24 (Ryrie
Street), Geelong, VIC 3220, Australia. |
| <i>2.2.9. Baculovirus esférica (Baculovirus de tipo
Penaeus monodon)</i>
<i>2.2.10. Baculovirus tetraédrica (Baculovirus penaei)</i> | Prof. D.V. Lightner
Aquaculture Pathology Laboratory, Department of
Veterinary Science and Microbiology,
Pharmacy/Microbiology, University of Arizona,
1117 E. Lowell, Building 90, Room 202, Tucson,
AZ 85721, EE. UU. |
| <i>2.3.0. Enfermedades de los peces – Información
general</i> | Dr B.J. Hill (se ha jubilado)
The Centre for Environment, Fisheries &
Aquaculture Science (Cefas), Weymouth
Laboratory, Barrack Road, The Nothe, Weymouth
DT4 8UB, Reino Unido. |
| <i>2.3.1. Necrosis hematopoyética epizootica</i> | Dr A. Hyatt (se ha jubilado)
Australian Animal Health Laboratory (AAHL),
CSIRO Livestock Industries, P.O. Bag 24 (Ryrie
Street), Geelong, Victoria 3220, Australia.

Prof. R.J. Whittington
Faculty of Veterinary Science, University of
Sydney, Private Bag 3, Camden, NSW 2006,
Australia. |
| <i>2.3.2. Infección por Aphanomyces invadans
(Síndrome ulcerante epizootico)</i> | Dr S. Kanchanakhan
Inland Aquatic Animal Health Research Institute
(AAHRI), Inland Fisheries Research and
Development Bureau, Department of Fisheries,
Paholyothin Road, Jatuchak, Bangkok 10900,
Tailandia. |
| <i>2.3.3. Infección por Gyrodactylus salaris</i> | Dr T.A. Mo
National Veterinary Institute, Section for
Parasitology, P.O. Box 750 Sentrum, 0106 Oslo,
Noruega. |
| <i>2.3.4. Necrosis hematopoyética infecciosa</i> | Dr J. Winton
Western Fisheries Research Center, 6505 N.E.
65th Street, Seattle, Washington 98115, EE. UU. |
| <i>2.3.5. Infección por virus de la anemia infecciosa del
salmón</i> | Dr B. Dannevig (Q.E.P.D.) & Dr Knut Falk
National Veterinary Institute, P.O. Box 750
Sentrum, 0106 Oslo, Noruega. |

2.3.6. Infección por alfavirus de los salmónidos

Dr T. Taksdal

National Veterinary Institute, P.O. Box 750,
Sentrum, 0106 Oslo, Noruega.

2.3.7. Herpesvirosis de la carpa koi

Dr K. Way

The Centre for Environment, Fisheries and
Aquaculture Science (Cefas), Weymouth
Laboratory, Barrack Road, The Nothe, Weymouth
DT4 8UB, Reino Unido.

2.3.8. Iridovirosis de la dorada japonesa

Dr K. Nakajima

National Research Institute of Fisheries Science,
Fisheries Research Agency, Fukuura 2-12-4,
Kanazawa-ku, Yokohama-shi, Kanagawa 236-
8048, Japón.

2.3.9. Viremia primaveral de la carpa

Dr P. Dixon

The Centre for Environment, Fisheries and
Aquaculture Science (Cefas), Weymouth
Laboratory, Barrack Road, The Nothe, Weymouth,
Dorset DT4 8UB, Reino Unido.

2.3.10. Septicemia hemorrágica viral

Dr N.J. Olesen & Dr H.F. Skall

National Veterinary Institute, Technical
University of Denmark (DTU), Hangovej 2,
DK-8200 Aarhus N, Dinamarca.

*2.3.11. Herpesvirosis del salmón masou
(Oncorhynchus masou)*

Dr M. Yoshimizu

Laboratory of Biotechnology and Microbiology,
Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido
University, 3-1-1 Minato-cho, Hakodate, Hokkaido
041-8611, Japón.

2.3.12. Encefalopatía y retinopatía virales

Dr G. Cattoli

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie,
Dipartimento di Ittiopatologia, Via Romea 14/A,
35020 Legnaro PD, Italia.

Dr T. Nakai

Hiroshima University, Graduate School of
Biosphere Science, Laboratory of Fish Pathology
Higashi Hiroshima 739-8528, Japón.

*2.4.0. Enfermedades de los moluscos –
Información general*

Dr F. Berthe

European Food Safety Authority (EFSA), Animal
Health and Animal Welfare unit – AHAW, Largo N.
Palli 5/A, 43100 Parma, Italia.

2.4.1. Herpesvirosis del abalón

Dr M. Crane & Dr S. Corbeil

Australia Animal Health Laboratory (AAHL),
CSIRO Livestock Industries, Private Bag 24 (Rylie
Street), Geelong, VIC 3220, Australia

2.4.2. Infección por Bonamia exitiosa

2.4.3. Infección por Bonamia ostreae

2.4.3. Infección por Marteilia refringens

Dr I. Arzul

IFREMER, Laboratoire de Génétique Aquaculture
et Pathologie, av. de Mus de Loup, 17390 La
Tremblade, Francia.

2.4.5. *Infección por herpesvirus de los ostreidos microvariante 1*

Dr T. Renault & Dr I. Arzul
IFREMER, Laboratoire de Génétique Aquaculture et Pathologie, av. de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, Francia.

2.4.6. *Infección por Perkinsus marinus*
2.4.7. *Infección por Perkinsus olseni*

Dr R. Carnegie
Shellfish Pathology Laboratory, Department of Environmental and Aquatic Animal Health, Virginia Institute of Marine Science, P.O. Box 1346 Gloucester Point, VA 23062, EE. UU.

2.4.8. *Infección por Xenohaliotis californiensis*

Prof. C. Friedman
Friedman Shellfish Health Laboratory, School of Aquatic and Fishery Sciences, University of Washington, Box 355020, Seattle, Washington 98195, EE. UU.

2.4.9. *Infección por Mikrocystis mackini*

Dr G. Meyer
Pacific Biological Station, Aquatic Animal Health Section, 3190 Hammond Bay Road, Nanaimo, BC V9T 6N7, Canadá.

*

* *

ABREVIATURAS

Ab	anticuerpo	ECA	enfermedad de la cabeza amarilla
ABTS	ácido 2,2'-azino-di-(3-etil-benzotiazolina)-6-sulfónico	ECACC	Colección Europea de Cultivos Celulares
ADN	ácido desoxiribonucleico	ECB	enfermedad de la cola blanca
AEC	3-amino-9-etilcarbazol	ECP	efecto citopático
AFA	alcohol, formalina, ácido acético	EDTA	ácido etilendiaminetetraacético
Ag	antígeno	ELISA	enzimoinmunoanálisis
AIS	anemia infecciosa del salmón	EMB	enfermedad de las manchas blancas
AP	fosfatasa alcalina	EMEM	medio mínimo esencial de Eagle
ARN	ácido ribonucleico	EMR	enfermedad de las manchas rojas
ARNds	ARN bicatenario	EOL	esferoides del órgano linfoide
ARNi	interferencia por ARN	EPC	epitelioma papuloso de carpa (línea celular)
AS	salmón del atlántico (línea celular)	ERB	enfermedad renal bacteriana (o renibacteriosis)
ASe	sensibilidad analítica	ERP	enfermedad renal proliferativa
ASK	riñón de salmón del Atlántico (línea celular)	ERV	encefalopatía y retinopatía virales
Asp	especificidad analítica	FAM	5-carboxifluoresceína
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indoil fosfato	FAT	prueba de inmunofluorescencia
Bd	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	FBS	suero fetal bovino
BF-2	alevín de mojarra oreja azul (línea celular)	FFPE	cortes de tejido fijados en formalina e incluidos en parafina
BHPN	bacteria de la HPN	FHM	piscardo (línea celular)
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	FLU	sonda de fluoresceína
BME	Herramienta de Búsqueda de Alineamiento Local Básico	GF	aleta de ronco (línea celular)
BP	medio basal de Eagle	GP	agar de glucosa/pectosa
BSA	<i>Baculovirus penaei</i>	GPY	agar o caldo de glucosa-peptona-levadura
BSA	albúmina de suero bovino	GVA	ganglioneuritis viral del abulón
BSS	solución salina equilibrada	H/E	hematoxilina y eosina
BVEMB	baculovirus de la enfermedad de las manchas blancas	HBSS	solución salina equilibrada de Hank
BVM	baculovirus de tipo <i>Penaeus monodon</i>	HCK	herpesvirosis de la carpa koi
CCB	encéfalo de carpa (línea celular)	HEPES	ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfónico
CCD	dispositivo de carga acoplada	HP	hepatopáncreas
CCO	ovario del bagre de Canal (línea celular)	HPN	hepatopancreatitis necrotizante
CHSE-214	embrión de salmón real (línea celular)	HPR	región altamente polimórfica
CIA	cuerpo de inclusión de Cowdry tipo A	HPR0	gen HPR de longitud total
COI	citocromo oxidasa I	HRP	peroxidada de rábano
Ct	ciclo umbral	HVAb	virus afín al herpes del abulón
CTAB	N-cetil-N,N,N-trimetilamonio	HVCy-3	herpesvirus de los ciprínidos tipo 3
DAN	detección de ácido nucleico	HVK	herpesvirus koi
DEPC	dietil pirocarbonato	HVSM	herpesvirosis del salmón masou
DICT50	dosis infectiva 50% en cultivo tisular	IC	índice de conversión
DIG	digoxigenina	ICTV	Comité Internacional de Taxonomía de Virus
DMF	dimetilformamida	IF	inmunofluorescencia
dNTP	desoxinucleótidos trifosfato	IFAT	prueba de la inmunofluorescencia indirecta
DSe	sensibilidad diagnóstica	Ig	inmunoglobulina
DSp	especificidad diagnóstica	IM	intramuscular

IPX	inmunoperoxidasa		
ISH	hibridación <i>in-situ</i>	RAPD-PCR	reacción en cadena de la polimerasa de amplificación aleatoria de polimorfismo del ADN
ITCF	isotiocianato de fluoresceína		
ITS	espaciador transcrito interno	RB	renibacteriosis (o enfermedad renal bacteriana)
IUCN	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza	REA	análisis mediante endonucleasa de restricción
IVB	iridovirus Bohle		
IVCRR	iridovirus del cuerpo rojizo del rodaballo	RFLP	análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción
IVDJ	iridovirus de la dorada japonesa	RO	ósmosis inversa
IVTH	iridovirus de <i>Testudo hermanni</i>	RT	temperatura ambiente
IVW	iridovirus Wamena	RTG-2	gónada de trucha arco iris (línea celular)
KF-1	aleta de carpa koi (línea celular)		
LAMP	amplificación isotérmica mediada por bucle	RT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa
LBA	pruebas de unión de ligando	RVAL	rabdo virus de alevín de lucio
LHM	hemolinfa de langosta	SDE	síndrome de la deformidad y del enanismo
LOD	límite de detección	SDS	dodecil sulfato de sodio
m.d.i.	multiplicidad de infección	SHK-1	riñón cefálico de salmón (línea celular)
MAB	anticuerpo monoclonal	SHV	septicemia hemorrágica viral
MCP	proteína principal de la cápsida	SKDM	medio selectivo para la enfermedad renal
MEM	medio mínimo esencial	SLS	N-laurilsarcosinato de sodio
MET	microscopía electrónica de transmisión	SM	leche desnatada
MO	microscopía óptica	SPF	libre de patógenos específicos
NAB	anticuerpo neutralizante	SSC	citrato salino estándar
NAH	hibridación de ácido nucleico	SSN-1	<i>Channa striata</i> (línea celular)
NASBA	amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico	SSS	esperma de salmón sonificado
NBT	nitroazul de tetrazolio	SUE	síndrome ulcerante epizootico
NEP	proteína nuclear de exportación	TAMRA	N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxi rodamina
NHE	necrosis hematopoyética epizootica	TAS-ELISA	ELISA en sándwich de triple anticuerpo
NPVCPv	nucleopoliedrovirus de envoltura única del camarón <i>Penaeus vannamei</i>	TBE	Tris, ácido bórico, ácido etilendiaminotetraacético [EDTA]
NV	no virión (proteína)	TE	Tris/EDTA
NVHA	nodavirus del halibut	TMB	tetrametilbenzidina
NVMr	nodavirus de <i>Macrobrachium rosenbergii</i>	TN	Tris/NaCl
NVPv	nodavirus de <i>Penaeus vannamei</i>	TNE	Tris/NaCl/EDTA
OL	órgano linfóide	Tris	tris(hidroximetil)aminometano
ORF	marco abierto de lectura	TRITC	isotiocianato de tetrametilrodamina-5-(y-6-)
PAb	anticuerpo policlonal		
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida	TSGM	medio de crecimiento para <i>Staphylococcus</i>
PBS	solución salina tamponada con fosfato	UFP	unidades formadoras de placas
PBST	solución salina tamponada con fosfato y que contiene Tween	UVC	radiación UV
PBSTG	PBS + Tween + gelatina	VAB	virus asociado a las branquias
PCF	factor de corrección de la placa	VAIS	virus de la anemia infecciosa del salmón
PCR	reacción en cadena de la polimerasa	VAT	virus de la salamandra <i>Ambystoma tigrinum</i>
PL	postlarvas	VB	virus del bagre
ppmil	partes por mil	VBC	virus del bagre de Canal
PTA	ácido fosfotúngstico	VECA	virus de la enfermedad de la cabeza amarilla
PVA	alcohol polivinílico	VEP	virus de la encefalitis de los peces
qPCR	PCR en tiempo real	VERV	virus de la encefalopatía y retinopatía virales

VIBC	virosis del bagre de canal
VLM-M	virus de la leucemia murina de Moloney
VMB	virus de las manchas blancas
VMNI	virus de la mionecrosis infecciosa
VMP	virus muy pequeño
VN	neutralización vírica
VNHE	virus de la necrosis hematopoyética epizoótica
VNHHI	virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa
VNHI	virus de la necrosis hematopoyética infecciosa
VNIBR	virus de la necrosis infecciosa del bazo y el riñón
VNNJL	virus de la necrosis nerviosa del jurel limón
VNPI	virus de la necrosis pancreática infecciosa
VOL	virus del órgano linfoide
VOM	virus de <i>Oncorhynchus masou</i>
VPC	viremia primaveral de la carpa
VR3	virus de la rana tipo 3
VSE	virus del siluro europeo
VSE	virus del siluro europeo
VSHV	virus de la septicemia hemorrágica viral
VSMB	virus del síndrome de las manchas blancas
VST	virus del síndrome de Taura
VVPC	virus de la viremia primaveral de la carpa

*

* *

DEFINICIONES

El *Código sanitario para los animales acuáticos* (un volumen que complementa al presente *Manual de animales acuáticos*) contiene un listado de definiciones que se pueden consultar para averiguar el significado de los términos utilizados en dicho *Manual*. A continuación se ofrecen las definiciones de algunos términos que no se utilizan en el *Código* pero sí en el *Manual*:

Confianza	En un contexto de demostración de la ausencia de infección (en el que la hipótesis nula es que existe infección), la confianza consiste en la probabilidad de que un sistema de vigilancia o una combinación de sistemas de vigilancia detecte la presencia de la infección en los casos en que la población esté realmente infectada. La confianza depende de la prevalencia del diseño, o del nivel de infección que se supone para una población infectada. La confianza se refiere, por tanto, a nuestra confianza en la capacidad de un sistema de vigilancia para detectar la enfermedad, y es equivalente a la sensibilidad del sistema. Esta es diferente de (pero puede utilizarse para calcular) la probabilidad de que una población concreta esté libre de infección, basándose en los resultados de uno o más sistemas de vigilancia.
Crías	Larvas de peces recién eclosionadas.
Sistema de vigilancia	Un método de vigilancia que genera una fuente de información sobre el estatus sanitario de poblaciones de animales.
Prueba	Procedimiento utilizado para clasificar una unidad como positiva o negativa con respecto a una infección o enfermedad. Las pruebas pueden clasificarse como sigue: a) de diagnóstico, cuando se aplican a individuos clínicamente enfermos; b) de escrutinio, cuando se aplican a individuos de apariencia sana; o c) confirmativas, cuando se aplican para confirmar el resultado de una prueba anterior.
Sistema de pruebas	Combinado de pruebas múltiples y normas de interpretación que se utilizan con el mismo fin que el de una prueba.

*
* *

GESTIÓN DE LA CALIDAD EN LOS LABORATORIOS DE PRUEBAS VETERINARIAS

RESUMEN

Para el diagnóstico, la vigilancia y el comercio es fundamental disponer de resultados de laboratorio válidos. Estos resultados se logran aplicando unas buenas prácticas de gestión, métodos analíticos y de calibración válidos, una técnica adecuada y garantía y control de calidad, y al mismo tiempo un sistema de gestión de calidad. La gestión de calidad en el laboratorio incluye elementos técnicos, de gestión y de funcionamiento del análisis e interpretación de resultados analíticos. El sistema de gestión de calidad permite al laboratorio demostrar tanto competencia como capacidad de generar resultados técnicamente válidos y constantes que satisfagan las necesidades de sus clientes. La necesidad de un reconocimiento mutuo de los resultados analíticos para el comercio internacional y la aceptación de estándares internacionales como la norma ISO/IEC¹ 17025: Requisitos Generales para la Competencia en los Laboratorios de Análisis y Calibración, de 2005 (ISO/IEC, 2005) requiere de unos buenos sistemas de gestión de la calidad en el laboratorio. La OIE ha publicado una norma detallada sobre este tema (OIE, 2008). El objetivo de este capítulo no es reiterar los requisitos de estos dos documentos, ni ha sido aprobado por parte de organismos de acreditación. Más bien se presenta un resumen de los aspectos y consideraciones importantes que un laboratorio debe acometer en el diseño y mantenimiento de su sistema de gestión de la calidad, tanto si ha sido formalmente acreditado como si no.

CONSIDERACIONES CLAVE PARA EL DISEÑO Y MANTENIMIENTO DE UN SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD EN EL LABORATORIO

Con el fin de asegurar que el sistema de gestión de calidad sea apropiado y eficaz, debe elaborarse cuidadosamente el diseño y, cuando se pretenda conseguir una acreditación, debe cumplir todos los criterios de la norma de calidad correspondiente. En los ocho apartados siguientes de este capítulo, se presenta un esquema de las principales categorías a tener en cuenta, y de los asuntos y actividades clave dentro de cada una de dichas categorías.

1. El trabajo, las responsabilidades y los objetivos del laboratorio

Son muchos los factores que influyen en los elementos y requisitos necesarios de un sistema de gestión de calidad. Estos factores son los siguientes:

- i) El tipo de prueba realizada;
- ii) El objetivo y los requisitos de los resultados de la prueba;
- iii) La repercusión de un resultado cuestionable o erróneo;
- iv) El nivel de tolerancia de riesgo y fiabilidad;
- v) Las necesidades del cliente (por ejemplo, sensibilidad y especificidad del método analítico, costes, tiempo de respuesta, caracterización de la cepa/genotipo);
- vi) El papel del laboratorio en el trabajo legal o en programas reguladores;
- vii) El papel del laboratorio en la asistencia, confirmación y/o supervisión del trabajo de otros laboratorios (por ejemplo, como Laboratorio de Referencia);

1 ISO/IEC – Organización Internacional de Estandarización/Comisión Internacional de Electroquímica.

viii) Los objetivos comerciales del laboratorio, incluida la necesidad de algún reconocimiento y/o acreditación por parte de terceros.

2. Normas, directrices y referencias

Se recomienda que el laboratorio seleccione normas y directrices acreditadas y fiables que contribuyan al diseño del sistema de gestión de calidad. La norma de la OIE sobre este tema, constituye una directriz útil (7). Para los laboratorios que deseen una acreditación de sus análisis, es esencial la utilización de la norma 17025 ISO/IEC (ISO/IEC, 2005) o del estándar de la OIE (2008). Puede obtenerse información adicional sobre las normas en los organismos de normas nacionales de cada país, en la Cooperación Internacional de Acreditación de Laboratorios (ILAC) y en los organismos de acreditación, como por ejemplo, la *National Association of Testing Authorities* (NATA), Australia, el Servicio de Acreditación del Reino Unido (UKAS), la *American Association for Laboratory Accreditation* (A2LA), etc. Algunas organizaciones técnicas e internacionales, como la AOAC Internacional (la Asociación Científica Dedicada a la Excelencia Analítica, la antigua Asociación de Químicos Analistas Oficiales) y la Organización Internacional para la Estandarización (ISO) publican referencias, directrices y/o normas útiles que completan los requisitos generales de la norma 17025 de la ISO/IEC. La Norma Internacional ISO 9001 (ISO, 2008), es una certificación, una norma para los sistemas de gestión de la calidad, y aunque puede ser un complemento útil para un sistema de calidad, sus requisitos no necesariamente aseguran ni implican competencia técnica (en las áreas detalladas en el apartado 3, abajo). La ISO 9001 es evaluada mediante un organismo de certificación, que está acreditado por el organismo nacional de acreditación para llevar a cabo estas evaluaciones. Cuando un laboratorio cumple los requisitos de la ISO 9001, se utilizan los términos *registro* o *certificación* para indicar la conformidad.

3. Acreditación

Si el laboratorio decide proceder con a un reconocimiento formal de su sistema de gestión de la calidad y de sus análisis, será necesaria la verificación, por parte de terceros, de esta conformidad con las normas escogidas. La ILAC ha publicado requisitos y directrices específicos para laboratorios y organismos de acreditación. Según el sistema ILAC, para la acreditación de actividades analíticas y/o de calibración en un laboratorio, debe utilizarse la norma ISO/IEC 17025. Pueden hallarse definiciones relativas a la acreditación de laboratorios en la Norma Internacional ISO/IEC 17000: Evaluación de la conformidad – Vocabulario y Principios (ISO/IED, 2004). La acreditación va unida a la competencia, que supone mucho más que disponer de unos procedimientos y seguirlos. Si un laboratorio es competente, también significa que:

- i) dispone de métodos analíticos, procedimientos y especificaciones técnicamente válidos y validados, que están documentados de acuerdo con los requisitos de la norma o directrices aplicables;
- ii) dispone de personal adecuadamente cualificado y formado con un elevado grado de conocimientos técnicos acorde con los niveles correspondientes de la autoridad;
- iii) dispone de equipo con programas de mantenimiento y calibración;
- iv) dispone de instalaciones y de control medioambiental adecuados;
- v) dispone de procedimientos y especificaciones que garantizan resultados exactos y fiables;
- vi) implementa mejoras continuas en la gestión de los análisis y de la calidad;
- vii) puede evaluar la necesidad de aplicar medidas correctoras y preventivas y las aplica;
- viii) evalúa con exactitud y controla la incertidumbre en los análisis;
- ix) demuestra competencia en los métodos analíticos utilizados (por ejemplo, participando en pruebas de competencia de forma periódica);
- x) ha demostrado competencia para generar resultados técnicamente válidos.

4. Elección del organismo de acreditación

Para facilitar la aceptación de los resultados de un laboratorio para el comercio, la norma de acreditación utilizada debe estar reconocida por la comunidad internacional, y el organismo de acreditación debe ser reconocido como competente para acreditar laboratorios. Los programas para el reconocimiento de los organismos de acreditación se basan, en el esquema de la ILAC, en los requisitos de la Norma Internacional ISO/IEC 17000: Requisitos Generales para los Organismos de Acreditación que Acreditan Organismos de Evaluación de la Conformidad (ISO/IED, 2004). Puede obtenerse información sobre organismos de acreditación reconocidos a partir de organizaciones que los reconocen, como la Cooperación de Acreditación de Laboratorios de Asia-Pacífico (APLAC), la Cooperación Interamericana de Acreditación (IAAC) o la Cooperación de Acreditación Europea (EA).

5. Determinación del ámbito del sistema de gestión de calidad y/o de la acreditación del laboratorio

El sistema de gestión de calidad debe cubrir todas las áreas de actividad que afecten a los análisis que se llevan a cabo en el laboratorio. Aunque los laboratorios acreditados están obligados a cumplir los requisitos de la norma exactamente como se detalla a continuación, estos principios son importantes para todos los laboratorios de análisis.

Los laboratorios acreditados por la norma ISO/IEC 17025 tienen una lista específica de las pruebas que están acreditadas, denominada plan de acreditación o ámbito de aplicación. Si se introducen nuevos métodos analíticos, estos deben evaluarse y acreditarse para que puedan ser añadidos al plan de acreditación. Lo ideal es que el sistema de gestión de calidad cubra todas las áreas de actividad que afectan a los análisis que se llevan a cabo en el laboratorio. No obstante, es el laboratorio quien tiene que decidir qué pruebas desea acreditar e incluir en el plan. Si un laboratorio acreditado también ofrece pruebas no acreditadas, estas deben ir claramente identificadas como tales en todos los informes en los que se indique o se haga referencia a la acreditación. Los factores que pueden afectar al criterio que aplique el laboratorio para elegir las pruebas que desea acreditar son los siguientes:

- i) El impacto de la acreditación inicial en los recursos en un plazo de tiempo determinado;
- ii) Un requisito incluido en el contrato relativo a los análisis acreditados (por ejemplo, para el comercio internacional o para proyectos de investigación);
- iii) La importancia del análisis y la repercusión que tendría un resultado incorrecto;
- iv) El coste de mantener una prueba acreditada;
- v) La disponibilidad de personal, instalaciones y equipo;
- vi) La disponibilidad de estándares de referencia (por ejemplo, reactivos estandarizados, muestras de control de calidad interno, cultivos de referencia) y de esquemas de análisis eficientes;
- vii) La garantía de calidad necesaria para los materiales, los reactivos y los medios;
- viii) La validación, la complejidad técnica y la fiabilidad del método analítico;
- ix) La posibilidad de subcontratar pruebas acreditadas;

6. Garantía de Calidad, Control de Calidad y Comprobación de la Competencia

La Garantía de Calidad (QA) es el proceso sistemático y planificado destinado a garantizar que el servicio ofrecido cumple con los requisitos establecidos en todas las áreas. Los requisitos pueden ser internos o bien pueden estar definidos por una norma de acreditación/certificación. La QA es un proceso orientado y asegura que se realicen las cosas correctas y de la forma correcta.

El Control de Calidad (QC) es el seguimiento sistemático y planificado del rendimiento para asegurar que se han cumplido los niveles mínimos de calidad. En el caso de un laboratorio de análisis, esto consiste en asegurar que los procesos analíticos están funcionando correctamente y que se obtienen resultados dentro de los parámetros y límites esperados. El QC es específico de cada prueba y garantiza que los resultados sean los esperados.

La Comprobación de la Competencia (PT), a veces denominada Garantía Externa de Calidad o EQA, es la determinación del rendimiento de un laboratorio mediante muestras problema de contenido no revelado. Lo ideal es que los esquemas de PT los aplique un proveedor externo independiente. La participación en la comprobación de la competencia permite al laboratorio evaluar y demostrar la fiabilidad de sus resultados por comparación con los de otros laboratorios participantes.

En la medida de lo posible, todos los laboratorios deben participar en programas de comprobación de la competencia adecuados para sus tipos de análisis. La participación en estos programas es un requisito para los laboratorios acreditados. Esto proporciona una evaluación independiente de los métodos analíticos utilizados y del nivel de competencia de la plantilla. Si no se dispone de este tipo de programas, pueden utilizarse alternativas válidas, como pruebas de validación en círculo organizadas por los Laboratorios de Referencia, pruebas realizadas por varios laboratorios, uso de materiales de referencia certificados o de muestras de control de calidad interno, repetición de análisis utilizando el mismo o distintos métodos, repetición del análisis de muestras almacenadas, y correlación entre los resultados de distintas características de una misma muestra.

Los proveedores y los operarios que intervengan en los programas de comprobación de la competencia deben estar acreditados con la norma ISO/IEC 17043:2010 – Evaluación de la conformidad – Requisitos generales para la comprobación de la competencia (ISO/IEC, 2010). Esta norma sustituye a la Directriz ISO/IEC 43-1:1997 Comprobación de la competencia mediante comparaciones interlaboratoriales, en la que se basaban las Directrices previas de la OIE (OIE, 2008, Directriz 4).

Se ha caracterizado bien el material necesario para la comprobación de la competencia procedente de proveedores acreditados, y todo el material sobrante, una vez terminada la comprobación de la competencia, puede ser útil para demostrar la competencia del personal o para validar pruebas.

7. Métodos analíticos

La norma ISO/IEC 17025 exige el uso de métodos analíticos adecuados y establece requisitos en cuanto a su selección, desarrollo y validación. Las Normas de Calidad y las Directrices de la OIE para los Laboratorios Veterinarios: Enfermedades Infecciosas (OIE, 2008) también proporcionan requisitos de selección y validación.

En este *Manual Acuático* se proporcionan recomendaciones sobre la selección de los métodos analíticos adecuados para el comercio, el diagnóstico y la vigilancia en los capítulos sobre cada enfermedad. Además, también se facilita una lista de las pruebas prescritas para el comercio internacional. Como se indica en la introducción a esta lista, las pruebas prescritas de la lista son las que exige el *Código Terrestre* de la OIE. Estas pruebas se consideran adecuadamente validadas como para dar resultados fiables para cualificar a los animales destinados a desplazamientos a nivel internacional. También se ofrece una lista de pruebas alternativas que pueden ser adecuadas para su uso en contextos locales, pero pueden no estar suficientemente validadas. El hecho de que una prueba esté recomendada no necesariamente significa que un laboratorio sea competente para ejecutarla. El sistema de calidad del laboratorio debe contar con evidencias de su competencia.

En la profesión veterinaria puede ser preferible utilizar otros métodos estándar (publicados en normas internacionales, regionales o nacionales) o métodos totalmente validados (que hayan sido sometidos a un estudio completo de colaboración y que se hayan publicado o hayan sido generados por un organismo técnico con autoridad, como la AOAC internacional), aunque es posible que no se disponga de ellos. Muchos laboratorios veterinarios desarrollan o modifican métodos, y la mayoría de laboratorios tienen sistemas analíticos que utilizan métodos no estándar, o una combinación de métodos estándar y métodos no estándar. En los laboratorios veterinarios, incluso en los que se utilizan métodos estándar, en general debe llevarse a cabo cierta evaluación, optimización y/o validación interna para asegurarse de que los resultados son válidos.

Los clientes y el personal del laboratorio deben comprender bien las características de rendimiento de la prueba, y los clientes deben estar informados de si el método es o no estándar. Así pues, muchos laboratorios veterinarios de análisis tendrán que demostrar que el desarrollo, la adaptación y la validación de los métodos analíticos son competentes.

Este *Manual Acuático* proporciona una orientación más detallada y específica sobre la selección, optimización, estandarización y validación de las pruebas en el Capítulo 1.1.2 Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas. A continuación se indican aspectos clave del método analítico que intervienen en la gestión de calidad en el laboratorio.

a) Selección del método analítico

Para obtener resultados válidos debe empezarse por una selección del método analítico que satisfaga las necesidades de los clientes del laboratorio de que se cumplan sus requisitos específicos. Algunos aspectos están relacionados directamente con el laboratorio, mientras que otros, con el cliente. Las consideraciones a tener en cuenta para elegir un método analítico son las siguientes:

- i) Aceptación internacional;
- ii) Aceptación científica;
- iii) Tecnología adecuada o actual;
- iv) Características de rendimiento idóneas (por ejemplo, sensibilidad y especificidad analíticas y diagnósticas, repetibilidad, reproducibilidad, porcentaje de aislamiento, límites de detección, precisión, apego a la verdad, e incertidumbre);
- v) Idoneidad de la prueba en la especie y población de interés;
- vi) Tipo de muestra (por ejemplo, suero, tejido o leche) y su calidad/estado esperado al llegar al laboratorio;
- vii) Objetivo de la prueba (por ejemplo, anticuerpo, antígeno, agente patógeno vivo, secuencia de ácidos nucleicos);
- viii) Tiempo que se tarde en dar el resultado;
- ix) Recursos y tiempo disponible para el desarrollo, adaptación y evaluación;
- x) Uso previsto (por ejemplo, exportación, importación, vigilancia, cribado, diagnóstico, confirmación);

- xi) Factores de seguridad;
- xii) Expectativas del cliente;
- xiii) Rendimiento requerido de las muestras problema;
- xiv) Coste de la prueba, por muestra;
- xv) Disponibilidad de estándares de referencia, materiales de referencia y competencia de los programas de análisis.

b) Optimización y estandarización del método analítico

Una vez escogido el método, debe establecerse en el laboratorio. Es necesaria una optimización adicional, tanto si el método se ha desarrollado a nivel interno como si se ha importado de un proveedor externo. La optimización establece especificaciones críticas y normas de rendimiento para el uso del proceso analítico en un laboratorio específico. La optimización debe determinar:

- i) Las especificaciones críticas para el equipo y el instrumental;
- ii) Las especificaciones críticas para los reactivos (como sustancias químicas o biológicas), los estándares de referencia, los materiales de referencia y los controles internos;
- iii) La robustez – puntos críticos de control e intervalos aceptables, características o comportamiento en los puntos críticos de control, utilizando procedimientos estadísticamente aceptables;
- iv) Las actividades de control de calidad necesarias para realizar un seguimiento de los puntos críticos de control;
- v) El tipo, número, intervalo, frecuencia y disposición de los controles de funcionamiento de la prueba;
- vi) Los criterios no subjetivos de aceptación o rechazo de un lote de resultados analíticos;
- vii) Los criterios de interpretación y notificación de resultados analíticos
- viii) El método analítico documentado y el procedimiento de notificación que vayan a ser utilizados por el personal del laboratorio;
- ix) Evidencias de competencia técnica en los operarios que lleven a cabo la interpretación de resultados de los procesos analíticos.

c) Validación del método analítico

La validación evalúa si una prueba es adecuada para un uso determinado, estableciendo características de rendimiento analítico, como sensibilidad, especificidad y porcentaje de aislamiento, así como parámetros de diagnóstico, como umbral positivo/negativo, y el título de interés o significativo. La validación debe llevarse a cabo utilizando un procedimiento optimizado, documentado y fijado. La duración y profundidad del proceso de validación dependerán de factores logísticos y de riesgo. Puede involucrar cualquier cantidad de actividades y de datos, y en el posterior análisis de datos deben utilizarse métodos estadísticos adecuados. Las actividades de validación podrían incluir:

- i) Estudios de campo y/o epidemiológicos;
- ii) La repetición de análisis para establecer el efecto de variables como el operario, reactivos o equipo;
- iii) La comparación con otros métodos, preferiblemente estándar, y con estándares de referencia (si se dispone de ellos);
- iv) Estudios de colaboración con otros laboratorios en los que se utilice el mismo método documentado. Lo ideal es que estén organizados por un Laboratorio de Referencia y que incluyan muestras problema y de referencia, de composición o título no revelados, cuyos resultados sean evaluados por expertos, y con respuesta a los participantes;
- v) La reproducción de datos de un método estándar aceptado, o de una publicación de prestigio;
- vi) Estudios de brotes experimentales de infección o enfermedad;
- vii) El análisis de datos de control de calidad interno.

La validación siempre es un equilibrio entre los costes, el riesgo y las posibilidades técnicas. Puede haber casos en los que esta exactitud y precisión solo pueda darse de una forma simplificada. Deben desarrollarse criterios y procedimientos para establecer la correlación entre los resultados analíticos y el diagnóstico del estado respecto a una enfermedad o bien para establecer una acción reguladora. Los criterios y procedimientos desarrollados deben tener en cuenta los métodos de cribado, la repetición de pruebas y los análisis confirmativos.

La validación analítica se trata en el Capítulo 1.1.2 Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas.

d) Incertidumbre del método analítico

El Grado de Incertidumbre (MU) es “un parámetro asociado al resultado de una medición que indica la dispersión de los valores que podría atribuirse razonablemente a la medición” (Eurachem, 2000). La incertidumbre de la medición no implica duda acerca de un resultado sino que aumenta la confianza en su validez. No es equivalente a *error*, puesto que puede aplicarse a todos los resultados analíticos derivados de un procedimiento determinado.

Los laboratorios deben estimar el MU de cada método analítico que dé lugar a una medición que esté incluida en su ámbito de acreditación y de cualquier método utilizado para calibrar el equipo (ISO/IEC, 2005).

En general, las pruebas pueden dividirse en dos grupos: cuantitativas (pruebas bioquímicas, enzimo-inmunoanálisis [ELISA], titulaciones, reacciones en cadena de la polimerasa [PCR] en tiempo real, recuento de agentes patógenos, etc.) y cualitativas (cultivo bacteriano, identificación de parásitos, aislamiento de virus, PCR de punto final, inmunofluorescencia, etc.).

La determinación del MU está bien definida en las ciencias de medición *cuantitativa* (ANSI, 1997). Se puede dar como una expresión numérica de la fiabilidad y normalmente se indica como un intervalo establecido. La desviación estándar (DE) y el intervalo de confianza (IC) son ejemplos de la expresión del MU, como por ejemplo la Densidad Óptica de un ELISA expresado como n SD, donde n suele ser 1, 2 o 3. El Intervalo de Confianza (normalmente del 95%) da un intervalo estimado en el cual es probable que se encuentre el resultado, que se calcula a partir de un conjunto determinado de datos analíticos.

La aplicación de los principios del MU al análisis *cualitativo* no está tan bien definida. La determinación y expresión del MU no se ha estandarizado para los laboratorios de análisis veterinario (así como tampoco para los de análisis médico, alimentario ni medioambiental), pero existe cierta orientación y a media que la acreditación adquiere importancia se van desarrollando aplicaciones. La norma ISO/IEC 17025 reconoce que algunos métodos analíticos pueden impedir metrológicamente y estadísticamente un cálculo válido de la incertidumbre de la medición. En estos casos, el laboratorio debe intentar identificar y estimar todos los componentes de incertidumbre en base al conocimiento del rendimiento del método y utilizando la experiencia previa, los datos de validación, los resultados del control interno, etc.

Muchas organizaciones técnicas y organismos de acreditación (como AOAC internacional, ISO, NATA, A2LA, SCC, UKAS, Eurachem o CITAC) dan cursos y/o proporcionan orientación sobre el MU a laboratorios que deseen conseguir acreditación.

El requisito de la norma ISO/IEC 17025 para los “procedimientos de control de calidad para el seguimiento de la validez de las pruebas” implica que el laboratorio debe utilizar procedimientos de control de calidad que cubran las principales fuentes de incertidumbre. No es necesario que cubra cada componente por separado. Los laboratorios pueden establecer especificaciones, criterios e intervalos aceptables, etc. en los puntos de control críticos de cada componente del proceso analítico. A continuación, el laboratorio puede implementar medidas de control de la calidad adecuadas en estos puntos críticos, o intentar reducir o eliminar el efecto de la incertidumbre de cada componente. Los componentes de las pruebas con fuentes de incertidumbre son los siguientes:

- i) La obtención de las muestras;
- ii) La contaminación;
- iii) Las condiciones de transporte y almacenaje de las muestras;
- iv) El procesado de las muestras;
- iv) La calidad, preparación y almacenaje de los reactivos;
- vi) El tipo de material de referencia;
- vii) Las manipulaciones volumétricas y de peso;
- viii) Las condiciones ambientales;
- ix) Los efectos del equipo;
- x) El sesgo del analizador u operario;
- xi) La variabilidad biológica;

xii) Efectos desconocidos o aleatorios.

Los errores o sesgos sistemáticos que se determinen en la validación deben corregirse mediante cambios en el método, que deberá ajustarse a estos matemáticamente, o bien anotando el sesgo como parte de la redacción del informe.

Si se lleva a cabo un ajuste en una prueba o procedimiento para reducir la incertidumbre o corregir el sesgo, se está introduciendo una nueva fuente de incertidumbre (la incertidumbre de la corrección). Esta debe considerarse parte de la estimación del MU.

Puede encontrarse información adicional sobre el análisis de la incertidumbre en Las Guías Eurachem de Cuantificación de la Incertidumbre en las Mediciones (Eurachem, 2000) y de Uso de la información sobre la incertidumbre en la evaluación de la competencia (Eurachem, 2007).

e) Implementación y uso del método analítico

La formación debe ser una actividad planificada y estructurada con pasos destinados a garantizar que se mantiene una suficiente supervisión mientras los analistas se están formando. Antes de producir resultados que se consideren definitivos, los analistas deben ser capaces de demostrar eficiencia en el uso del método analítico, y también en controles periódicos.

El laboratorio debe ser capaz de demostrar trazabilidad para todos los pasos acreditados, y este principio debe aplicarse a todas las pruebas, tanto si están acreditadas como si no. Esto cubre todas las actividades relacionadas con la selección, desarrollo, optimización, estandarización, validación, implementación, informe, persona que la realice, control de calidad y garantía de calidad de la prueba. La trazabilidad se logra aplicando una gestión del proyecto adecuada y documentada, manteniendo registros, gestionando los datos y utilizando sistemas de archivo.

8. Planificación estratégica

Los laboratorios deben disponer de evidencias de su mejora continua, que es un requisito obligatorio para los laboratorios acreditados. El laboratorio debe estar informado y al día de las normas de gestión de calidad y técnica y de los métodos que se utilizan para demostrar la competencia del laboratorio y para establecer y mantener la validez técnica. Todo ello puede demostrarse mediante:

- i) La asistencia a conferencias, así como la organización de reuniones internas o externas sobre la gestión del diagnóstico y de la calidad;
- ii) La participación en organizaciones locales e internacionales;
- iii) La participación en la redacción de normas nacionales e internacionales (por ejemplo, en los comités de la ILA o la ISO);
- iv) El conocimiento de publicaciones actuales, así como la redacción y revisión de publicaciones sobre métodos de diagnóstico;
- v) Programas de formación, incluyendo visitas a otros laboratorios;
- vi) Llevando a cabo investigación;
- vii) La participación en programas cooperativos (por ejemplo, el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura);
- viii) El intercambio de procedimientos, métodos, reactivos, muestras, personal e ideas;
- ix) Un desarrollo profesional y una formación técnica planificados y continuos;
- x) Revisiones de la gestión;
- xi) El análisis de la retroalimentación al cliente;
- xii) Un análisis de las causas últimas de las anomalías y la implementación de acciones correctoras, preventivas y de mejora.

BIBLIOGRAFÍA

ANSI (AMERICAN NATIONAL STANDARDS INSTITUTE) (1997). ANSI/NCSL² Z540-2-1997, US Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, First Edition. American National Standards Institute, www.ansi.org.

EURACHEM (2000). Eurachem/CITAC³ Guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, Second Edition. Eurachem Secretariat. www.eurachem.org.

EURACHEM (2007). Eurachem/CITAC Guide: Use of Uncertainty Information in Compliance Assessment, First Edition. Eurachem Secretariat. www.eurachem.org.

ILAC (2007). G13:08/2007 Guidelines for the Requirements for the Competence of Providers of Proficiency Testing Schemes. International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC). www.ilac.org

ISO (2004) ISO/TS 21748. Guidance for the use of Repeatability, Reproducibility and Trueness Estimates in Measurement Uncertainty Estimation. International Organization for Standardisation (ISO), www.iso.org.

ISO (2008). ISO 9001:2008. Quality Management Systems – Requirements. International Organization for Standardization (ISO), www.iso.org.

ISO/IEC (2004). ISO/IEC 17000:2004. Conformity Assessment – Vocabulary and General Principles. International Organization for Standardization (ISO), www.iso.org.

ISO/IEC (2004a). ISO/IEC 17011:2004. Conformity Assessment – General requirements for accreditation bodies accrediting conformity assessment bodies. International Organization for Standardization (ISO), www.iso.org.

ISO/IEC (2005). ISO/IEC 17025:2005. General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories. International Organization for Standardization (ISO), www.iso.org.

ISO/IEC (2010). ISO/IEC 17043:2010. Conformity Assessment – General Requirements for Proficiency Testing. International Organization for Standardization (ISO), www.iso.org

OIE (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH) (2008). Standard for Management and Technical Requirements for Laboratories Conducting Tests for Infectious Animal Diseases. *In*: OIE Quality Standard and Guidelines for Veterinary Laboratories: Infectious Diseases, Second Edition. World Organisation for Animal Health (OIE: Office International des Epizooties), 12 rue de Prony, 75017 Paris, France. www.oie.int.

*
* *

2 NCSSL:- *National Conference of Standards Laboratories*

3 CITAC – Cooperación para la Trazabilidad Internacional en Química Analítica.

CAPÍTULO 1.1.2.

PRINCIPIOS Y MÉTODOS DE VALIDACIÓN DE LAS PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO DE LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS

INTRODUCCIÓN

La validación es un proceso que determina la idoneidad de una prueba¹, que se ha desarrollado, optimizado y estandarizado adecuadamente para un propósito concreto. Todas las pruebas de diagnóstico (pruebas de laboratorio y de campo) deben validarse para la especie en la que se utilizarán. La validación incluye estimaciones de las características de rendimiento analítico y diagnóstico de una prueba. En el contexto de este capítulo, una prueba que ha superado las tres primeras etapas de la validación (véase la Figura, 1 abajo), incluida la caracterización del rendimiento, puede designarse como “validada para el objetivo inicial deseado(s)”. Pero para que una prueba siga estando validada, es necesario realizar un cuidadoso seguimiento del rendimiento de la misma en las condiciones habituales de uso, a menudo controlando el comportamiento de los controles de la prueba a lo largo del tiempo. Esto garantiza que la prueba, según la validación original, mantenga siempre sus características de rendimiento. En el caso de que empiece a dar resultados que no concuerden con los datos de la validación original, la prueba podría no ajustarse al propósito/s deseado/s. Así, una prueba validada se evalúa continuamente para garantizar que mantiene su idoneidad para el propósito deseado, mediante una evaluación de los resultados de los controles de la prueba y mediante una evaluación continua durante el uso sistemático en la población de destino.

Las pruebas realizadas en individuos o en poblaciones tienen varios propósitos, tales como: documentar la ausencia de una determinada enfermedad en un país o región, evitar su propagación a través del comercio, contribuir a erradicar una infección de una zona o país, confirmar el diagnóstico de los casos clínicos, estimar la prevalencia de una infección para facilitar el análisis del riesgo, identificar a los animales infectados con vistas a implementar medidas de control, y clasificar los animales según su salud o estado inmunitario tras la vacunación. Una única prueba puede validarse para uno o varios propósitos deseados optimizando sus características de rendimiento para cada uno, como por ejemplo, fijando una alta sensibilidad diagnóstica (Dse), asociada a una baja especificidad diagnóstica (DSp) para una prueba de cribado, o por el contrario, fijando una DSp alta asociada a una DSe más baja para una prueba confirmativa.

El siempre cambiante repertorio de nuevos y específicos reactivos de diagnóstico, junto con la existencia de muchos nuevos formatos y protocolos analíticos ha precipitado debates sobre cómo validar adecuadamente estas pruebas. Para orientar a los usuarios de pruebas en cuanto a la validación de pruebas más complejas, como las de detección de ácido nucleico, ya no basta con ofrecer simples ejemplos de pruebas serológicas, como el enzimoimmunoanálisis. Con el fin de aportar coherencia al proceso de validación para todos los tipos de pruebas, este capítulo se centra en los criterios que deben cumplirse durante la realización y la validación de pruebas de cualquier tipo. La inclusión de la ejecución de la prueba como parte del proceso de validación de la misma puede parecer contra-intuitiva, pero en realidad, tres de los criterios de validación requeridos (definición del/los objetivo/s buscado, optimización y estandarización) que deben evaluarse para llegar a la validación de una prueba incluyen pasos de su proceso de ejecución. Según esto, el proceso de ejecución de la prueba da lugar a un sistema de validación de la misma, y ambos contienen criterios de validación que deben cumplirse. Además, se aportan otras

1 “Prueba,” “método analítico,” y “prueba” son sinónimos a los efectos de este capítulo, y por lo tanto se utilizan indistintamente.

directrices en una serie de Directrices de Validación de la OIE² que se adaptan a varios tipos de prueba que en esencia son distintos (por ejemplo, la detección de ácido nucleico, anticuerpos o antígenos) y aportan más información sobre temas específicos relacionados con la validación de pruebas de diagnóstico. Para información específica relativa a especies de fauna salvaje, consúltese la Directriz de la OIE sobre validación 3.6.7³: Principios y métodos para la validación de pruebas de diagnóstico de enfermedades infecciosas aplicables a la fauna salvaje. La información que se aporta en esta Directriz de la OIE sobre validación 3.6.7, que es específica de especies de fauna salvaje, también podría ser de utilidad para la validación de pruebas realizadas en animales domésticos, por ejemplo, cuando se disponga de un escaso número de muestras.

CONSIDERACIONES PRELIMINARES EN EL DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE PRUEBAS

Todos los laboratorios deben cumplir los requisitos establecidos en los Capítulos 1.1.1 (*Manual Acuático*) o 1.1.4 (*Manual Terrestre*) sobre *Gestión de la calidad en los laboratorios de pruebas veterinarias*. Con ello, se minimizará la influencia de factores que no dependen de la prueba en sí, como el instrumental, errores del operario, la elección del reactivo (químico o biológico) y la calibración, los recipientes y plataformas de reacción, la calidad del agua, el pH y la ionicidad de tampones y diluyentes, las temperaturas y duraciones de incubación, y los errores en el rendimiento técnico de la prueba.

El primer paso en el desarrollo de una prueba es definir el objetivo de la prueba, ya que esto guiará todos los pasos subsiguientes del proceso de validación. Los criterios de validación de la prueba son los rasgos característicos de una prueba que constituyen factores decisivos, mediciones o estándares en los cuales se basa un juicio o decisión. Si tenemos en cuenta las variables que pueden afectar al rendimiento de una prueba, podremos apreciar más claramente los criterios que deben tenerse en cuenta para su validación. Estas variables pueden agruparse en categorías: (a) relativas a la muestra: si son individuales o agrupadas, la composición de la matriz, y las interacciones hospedador/organismo que afecten al analito en cuestión cuantitativa o cualitativamente; (b) relativas al sistema analítico – que incluyen factores físicos, químicos, biológicos y técnicos que afectan a la capacidad de la prueba de detectar en la muestra un analito específico; y (c) relativos a la interpretación del resultado de la prueba – es decir, la capacidad del sistema analítico de predecir de forma precisa el estado del individuo o de la población en relación con el propósito con el cual se aplica la prueba.

La elección, obtención, preparación, conservación y manejo de las muestras son variables cruciales en el diseño y desarrollo de una prueba para garantizar resultados analíticos válidos. Otras variables, como el transporte, la cadena de custodia, la rastreabilidad de las muestras y el sistema de gestión de la información del laboratorio también son fuentes clave de variación/error que se convierten en especialmente importantes cuando la prueba se implementa para un análisis sistemático. La integridad de los resultados experimentales durante la ejecución y validación de una prueba será como mucho igual de buena que la calidad de las muestras que se utilicen. Antes de iniciar las tareas de validación de una prueba, es importante prever los factores que pueden afectar negativamente a la calidad de la muestra. Las muestras de referencia que se utilicen en la ejecución y validación de una prueba deberán encontrarse en la misma matriz que se va a utilizar en la prueba (por ejemplo, suero, tejido o sangre total) y deberán ser representativas de la especie que vaya a analizarse mediante dicha prueba. Los materiales de referencia deberán representar adecuadamente el intervalo de concentraciones de analito a detectar mediante la prueba. En los capítulos 1.1.1 y 1.1.2 del *Manual Terrestre* se encuentra información sobre la obtención, preparación, conservación, manejo y transporte de las muestras.

La matriz (suero, heces, tejido, etc.) en la que puede residir el analito buscado puede contener inhibidores endógenos o exógenos que impidan el funcionamiento de ciertas pruebas. Esto es especialmente importante en el caso de pruebas que dependen de enzimas, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o el enzimoimmunoanálisis (ELISA). Otros factores que también influyen en la concentración y en la composición de un analito buscado (en concreto anticuerpos) en la muestra son en su mayor parte atribuibles al hospedador y pueden ser factores inherentes (como la edad, el sexo, la raza, el estado nutricional, la gestación o la capacidad de respuesta inmunitaria), o bien adquiridos (como la adquisición pasiva de anticuerpos o la inmunidad activa obtenida por la vacunación o la infección). Otros factores que no dependen del hospedador, como la contaminación o el deterioro de la muestra, también pueden llegar a afectar a la capacidad de la prueba de detectar el analito buscado en la muestra. También es importante que los reactivos biológicos estén libres de agentes extraños que, de encontrarse presentes, pudieran conducir a resultados erróneos.

2 Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/GUIDELINE_3.6.0_INTRODUCTION.pdf
3 Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/GUIDELINE_3.6.7_WILDLIFE.pdf

CRITERIOS DE DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE PRUEBAS

El rendimiento de la prueba se ve afectado por muchos factores, empezando por la optimización de la prueba. Tras la optimización inicial para un propósito determinado, se comprobarán las características de rendimiento de la prueba. Es posible que la prueba requiera una optimización adicional o que se observe que es apta para un determinado propósito en base a los resultados del trabajo de validación.

Criterios para el Desarrollo y Validación de una Prueba

1. Definición del/los propósito/s
2. Optimización
3. Estandarización
4. Repetibilidad
5. Sensibilidad analítica
6. Especificidad analítica
7. Umbrales
8. Sensibilidad diagnóstica
9. Especificidad diagnóstica
10. Reproducibilidad
11. Idoneidad para el/los propósito/s

A. FASE DE DESARROLLO DE LA PRUEBA

1. Definición de los propósitos deseados en una prueba

La *Norma de la OIE sobre Gestión y Requisitos Técnicos para los Laboratorios que Realizan Pruebas para las Enfermedades Infecciosas* (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2008)⁴ establece que los métodos analíticos y los procedimientos relacionados deben ser adecuados para las aplicaciones diagnósticas específicas a fin de que los resultados de las pruebas tengan utilidad. En otras palabras, la prueba debe adecuarse al propósito deseado. La capacidad de evaluación cualitativa y cuantitativa de la capacidad de un resultado positivo o negativo de una prueba de predecir de forma precisa si un animal o población de animales están o no infectados o han estado o no expuestos es el criterio definitivo para la validación de dicha prueba. Esta capacidad depende de que una prueba, desarrollada mediante una cuidadosa optimización y estandarización (Apartado A.2.5) ofrezca, mediante la acumulación de datos de validación, confianza en la capacidad de la prueba de rendir de acuerdo con el propósito pretendido. Con el fin de asegurar que los resultados de la prueba proporcionan útiles inferencias diagnósticas sobre animales o poblaciones de animales respecto al propósito deseado, el proceso de validación abarca documentación sobre el desarrollo inicial y la realización de la prueba, así como una evaluación continua de los programas de control y garantía de calidad. La Figura 1 muestra el proceso de validación de la prueba, desde el diseño hasta las fases de desarrollo y validación y la implementación, despliegue y mantenimiento del mismo.

El primer paso del desarrollo de una prueba consiste en escoger un tipo de prueba que sea adecuada y que tenga posibilidades de ser validada para un uso concreto (idoneidad para el propósito deseado).

Los propósitos más frecuentes son los siguientes:

- 1) Contribuir a demostrar la ausencia de infección en una población definida (país/zona/compartimiento/rebaño) (prevalencia aparente del 0%):
 - 1a) “Libre” con y/o sin vacunación,
 - 1b) Restablecimiento de la ausencia después de los brotes
- 2) Certificar la ausencia de infección o presencia del agente causal en animales concretos o productos utilizados para el comercio o el transporte.
- 3) Contribuir a la erradicación de la enfermedad o eliminación de la infección en poblaciones definidas.

4 Esta es una interpretación específica de los requisitos establecidos de forma más general en la norma internacional de calidad ISO/IEC 17025:2005 para laboratorios de análisis (2005). Esta publicación también establece que para que un método analítico se considere apropiado debe estar validado adecuadamente, y que esta validación debe respetar los principios descritos en este documento, la Norma de Validación de la OIE.

- 4) Confirmar el diagnóstico de casos clínicos o sospechosos (incluye la confirmación de un resultado positivo en una prueba de cribado).
- 5) Estimar la prevalencia de la infección o exposición para facilitar el análisis de riesgos (encuestas, estatus sanitario del rebaño, medidas para el control de la enfermedad).
- 6) Determinar el estado inmunitario de animales determinados o de poblaciones (después de la vacunación).

Estos fines incluyen muchas aplicaciones más acotadas y específicas de las pruebas (para más detalles véanse las Directrices de Validación de la OIE para cada tipo de prueba). Tales aplicaciones específicas y sus fines concretos deben ser claramente definidos en el contexto de una prueba completamente validada.

Además de definir la prueba en cuanto al propósito deseado, debe definirse también en cuanto a la especie de destino, al/los agente/s patógeno/s o trastornos y al tipo de matriz en el que se encuentra la muestra.

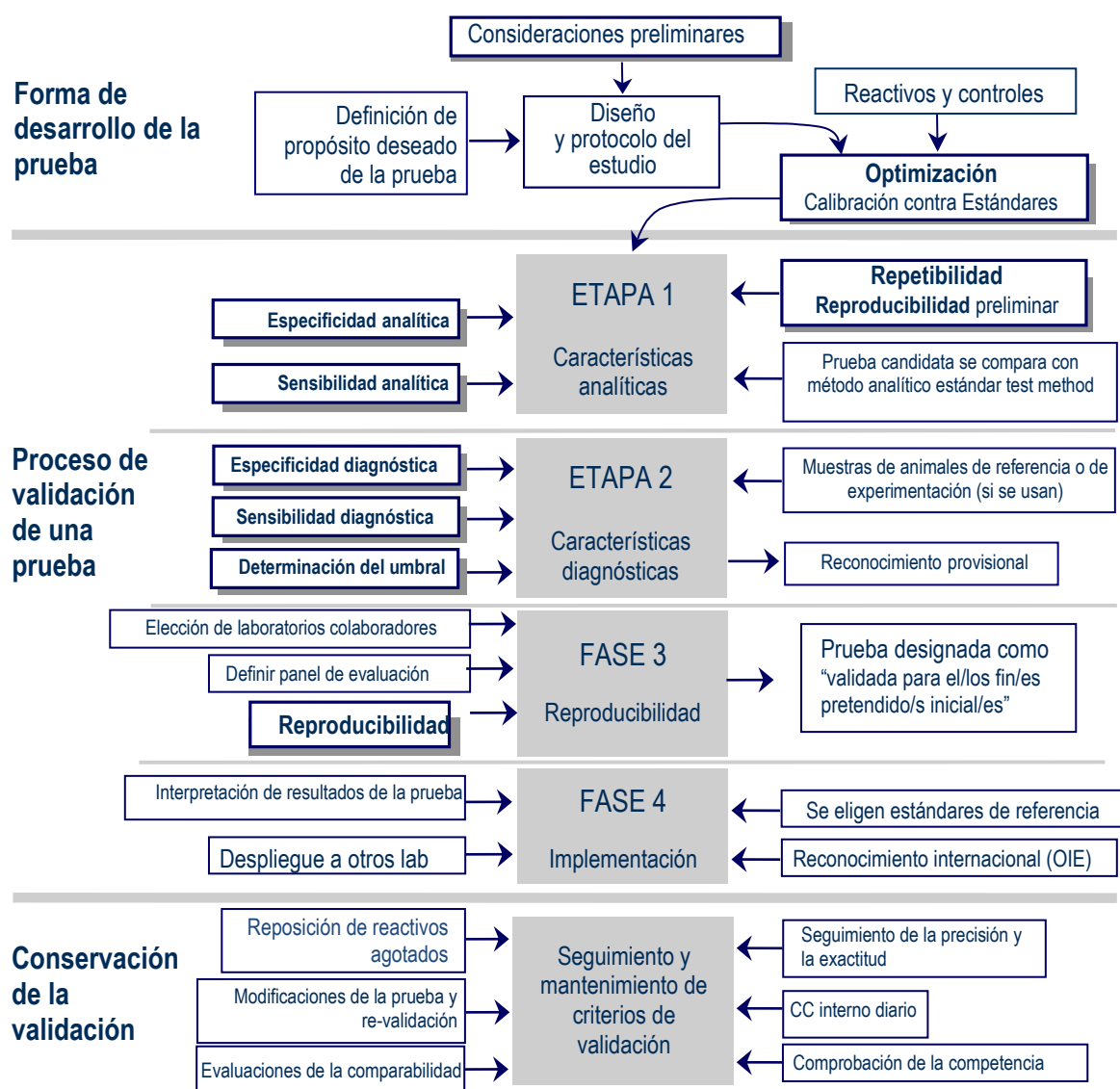


Figura 1. Las fases de desarrollo y validación de la prueba con los criterios de validación de la misma destacados en negrita en los recuadros sombreados.

2. Desarrollo de la prueba – los estudios experimentales

2.1 Diseño y demostración del método analítico

Para el diseño de todos los pasos de una nueva prueba todavía no validada, o de una prueba existente que se esté modificando, son necesarios un conocimiento previo, así como una buena reflexión y planificación. Se ofrece orientación las Directrices de la OIE sobre Validación (véase la nota 2 a pie de página), que cubren las mejores prácticas para el desarrollo y validación de las pruebas destinadas a la detección de distintos analitos (como anticuerpos, antígenos o ácido nucleico).

El desarrollo de todas las pruebas depende de las muestras de referencia del analito, que representan el analito buscado, la matriz en la que se encuentra el mismo y la población a la que se destina la prueba. Las muestras de referencia pueden ser sueros, líquidos (incluidos jugos de carne) o tejidos que contengan el analito de interés o una estructura genómica que concuerde con el analito buscado. Estos materiales de referencia se utilizan en experimentos llevados a cabo durante todo el proceso de desarrollo y también en la validación de la prueba.

2.2 Intervalo de funcionamiento de la prueba

El intervalo de funcionamiento de una prueba es el intervalo de concentraciones o títulos del analito en el cual el método aporta una exactitud y precisión idóneas. La exactitud es la cercanía de un valor analítico al valor esperado (real) (media o mediana) para un reactivo estándar de referencia de concentración o título conocidos. La precisión⁵ es el grado de dispersión (varianza, desviación estándar o coeficiente de variación) dentro de una serie de mediciones de la misma muestra analizada en unas condiciones especificadas. Durante el desarrollo de la prueba, se determinan los límites inferior y superior del intervalo de funcionamiento. Para determinar formalmente este intervalo, se selecciona una muestra de referencia positiva alta (lo ideal es que esta muestra se encuentre entre las tres muestras descritas en “Optimización”, a continuación). Se lleva a cabo una dilución seriada de esta muestra positiva alta hasta la extinción de respuesta de la prueba en una matriz sin analito que tenga la misma constitución que la matriz de muestra de los animales de la población a la que se destina la prueba. Los resultados se trazan en una “curva de respuesta”, en la que la respuesta (por ejemplo, la densidad óptica, el ciclo umbral, los recuentos, etc.) es función de la concentración (cantidad) de analito. La curva establece el intervalo de funcionamiento de la prueba. Si se observa que el intervalo es inaceptable para el propósito deseado, tal vez sea necesaria una mayor optimización. La curva de calibración típica para la mayoría de pruebas tiene una forma sigmoidea. Los datos se transforman para aproximar una relación lineal entre la respuesta y la concentración empleando un algoritmo adecuado (Findlay y Dillard, 2007).

2.3 Estandarización y optimización

La optimización es el proceso mediante el cual la mayor parte de parámetros físicos, químicos y biológicos de una prueba se evalúan y se ajustan para garantizar que las características de rendimiento de la prueba se adapten mejor a la aplicación pretendida. Es útil seleccionar por lo menos tres muestras de referencia bien definidas, que contengan el analito abarcando resultados desde positivo alto a negativo (por ejemplo, positivo alto, positivo bajo y negativo). En teoría, las muestras deberían representar tanto a los animales que se consideran infectados como a los no infectados dentro de la población que finalmente va a ser objeto de la prueba. Sin embargo, no siempre es posible obtener estas muestras de referencia, sobre todo en el caso de las pruebas de detección de ácido nucleico y antígeno. La alternativa de preparar muestras de referencia a las que se hayan añadido agentes patógenos de cultivo o sueros positivos no es tan adecuada, puesto que estas muestras no representan exactamente la interacción entre matriz y agente que tiene lugar en condiciones naturales (véase también la Directriz de la OIE sobre Validación 3.6.6⁶ *Selección y utilización de muestras y paneles de referencia*). Cuando no existe otra alternativa, tal vez la única posibilidad sea añadir a la muestra una cantidad conocida del analito o agente derivado del cultivo, o bien diluir un suero positivo alto en suero negativo de la misma especie. En cualquier caso, es imprescindible que la matriz a la que se añade o en la que se diluye el analito sea idéntica o se parezca lo máximo posible a la de las muestras que finalmente se analizarán mediante la prueba. Lo ideal es que las muestras de referencia estén bien caracterizadas por una o, preferiblemente, al menos dos metodologías alternas. Estas muestras pueden utilizarse en experimentos para determinar si la prueba es capaz de distinguir diferentes cantidades del analito, distinguir los analitos buscados de

5 Las fuentes de variación que pueden afectar a la precisión de una prueba en el laboratorio son las siguientes: 1) en una misma ejecución de una única prueba, 2) entre ejecuciones consecutivas, 3a) entre ejecuciones de la prueba en distintos momentos del mismo día o en distintos días en condiciones similares, 3b) entre ejecuciones de la prueba en distintos días con distintos operarios, 4) entre laboratorios. En este capítulo, las categorías 1-3 son estimaciones de la repetibilidad, y la categoría 4 es sinónimo de reproducibilidad.

6 Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/GUIDELINE_3.6.6_REFERENCE_SAMPLES.pdf

otros que estén estrechamente relacionados con ellos, y optimizar las concentraciones de reactivos y perfeccionar el protocolo. En principio, para todos los tipos de prueba es muy conveniente preparar y almacenar una cantidad suficiente de cada muestra de referencia en alícuotas para su uso en cada ejecución de la prueba candidata, ya que se evalúa a lo largo de todo el proceso de desarrollo y validación. Cambiar las muestras de referencia durante el proceso de validación introduce una variable difícil de resolver que puede socavar gravemente la interpretación de los datos experimentales y, por tanto, la integridad del proceso de desarrollo y validación.

El laborioso proceso de optimización de una prueba es fundamental y crítico para lograr un rendimiento analítico fiable y predecible. La evaluación científica y la aplicación de las mejores prácticas científicas, como se indican en las Directrices de la OIE sobre Validación (véase la nota 2 a pie de página), se recomiendan para guiar la optimización de todos los elementos del desarrollo y validación de una prueba. El enfoque descrito proporciona una base firme para el desarrollo de una prueba fiable. A menudo se han desarrollado prototipos de pruebas utilizando los reactivos y el equipo que se tenían a mano en el laboratorio. Sin embargo, si la prueba ha sido diseñada para su ser utilizada con fines diagnósticos en múltiples laboratorios, la estandarización se vuelve crucial. Deben describirse detalladamente todas las formulaciones de sustancias químicas y tampones. Todos los reactivos deben ser definidos con respecto a la pureza y al grado (incluida el agua). Debe establecerse y documentarse cuáles son los intervalos de trabajo aceptables para parámetros como el pH, la molaridad, etc. De igual forma, para los productos biológicos también deben definirse los estándares de calidad, pureza, concentración y reactividad. Tanto en productos químicos como en productos biológicos también deben tenerse en cuenta los periodos de validez y las condiciones de almacenamiento. También deben establecerse los intervalos aceptables de los tiempos de reacción y las temperaturas. Debe describirse detalladamente el equipo esencial para optimizar el rendimiento de la prueba, incluyendo especificaciones de funcionamiento y de calibración. El control del proceso (calidad) debe formar parte de la optimización y debe tenerse en cuenta desde el principio, y no al final del desarrollo de la prueba, como suele ocurrir. Además de lo anterior, otros aspectos posteriores, como la obtención, manipulación e interpretación de los datos también pueden requerir estandarización y optimización. Finalmente, todos estos parámetros, una vez optimizados, deben describirse en detalle en el protocolo del método analítico.

Durante la optimización de la una prueba, es importante tomar nota de los pasos del procedimiento y de los parámetros de la prueba cuyo intervalo de valores en el que la prueba ofrece un rendimiento óptimo es estrecho, ya que son puntos críticos que en último término afectan a la fiabilidad de la prueba (véase el apartado A.2.7). En el caso de ciertos tipos de prueba, determinados pasos del procedimiento pueden influir más que otros en el rendimiento final de la prueba (véase el apartado B.5 abajo y la Directriz de Validación de la OIE 3.6.8⁷ *Comparabilidad entre pruebas tras pequeños cambios en un método analítico validado* para información adicional sobre cómo establecer la comparabilidad cuando se cambian reactivos o procesos).

En los siguientes apartados se presentan varias muestras de referencia de analitos y otros controles del proceso que se incluyen sistemáticamente en cualquier sistema analítico. Estos proporcionan las funciones críticas de seguimiento de la prueba que requieren atención especial durante la optimización del mismo. Además, para asegurar la estabilidad tienen que garantizarse la preparación y el almacenamiento adecuados de todos los reactivos biológicos y materiales de referencia (véase el capítulo 1.1.1 del Manual Terrestre).

2.4 Factores inhibidores en la matriz de la muestra

Cada matriz que vaya a utilizarse en una prueba debe emplearse en el proceso de validación. Algunas matrices de muestra incluyen factores inhibidores que interfieren con el rendimiento de determinados tipos de prueba. El suero, en concreto si está hemolizado, puede contener factores tóxicos para las células utilizadas en las pruebas de neutralización de virus, mientras que las sustancias endógenas que se encuentran en algunos tejidos y líquidos pueden interferir con las pruebas basadas en la fijación de ligandos y en enzimas, como el ELISA, o bien inhibirlas. Las muestras de heces, tejidos autolisados y semen tienden a contener más sustancias que interfieren y, por lo tanto, son más problemáticas para el rendimiento analítico que el suero, la sangre o los tejidos frescos.

2.5 Robustez

La robustez es la capacidad de una prueba de no resultar afectada por pequeñas variaciones en las situaciones en que se lleva a cabo el análisis, que podrían tener lugar durante la ejecución de la prueba dentro de un mismo laboratorio. La evaluación de la robustez debe comenzar durante las

7 Nota para el lector: La Directriz de la OIE sobre Validación 3.6.8. *Comparabilidad entre pruebas tras pequeños cambios en un método analítico validado*, una vez finalizada, se publicará en la página web de la OIE.

etapas de desarrollo y optimización de la prueba. Las variaciones intencionadas en los parámetros del método pueden abordarse en los experimentos una vez establecidas las condiciones óptimas de una prueba. Sin embargo, cuando se utilizan valoraciones multifactoriales de los reactivos para optimizar la prueba, pueden aparecer indicios de problemas en la robustez. Si pequeñas diferencias en las condiciones o en las concentraciones de reactivo causan una variabilidad inaceptable, lo más probable es que la prueba no sea robusta. Conocer cuanto antes esta situación constituye un punto crítico de la toma de decisiones para determinar si vale la pena seguir con la validación de la prueba, porque si esta no es robusta en un laboratorio en condiciones bastante ideales, es improbable que sea reproducible cuando se transfiera a otros laboratorios.

Los factores que con mayor probabilidad afectarán a la robustez de la prueba son el pH, la temperatura, el lote de los reactivos o la marca de las placas de microtitulación y factores relacionados con la matriz acuosa u orgánica (Dejaegher y Vander Heyden, 2006). Una vez se ha terminado la optimización, la robustez de la prueba deviene parte de la evaluación de la repetibilidad.

2.6 Calibración de la prueba frente a reactivos estándar

2.6.1. Estándares de referencia a nivel internacional y nacional

Lo ideal es que los estándares de referencia a nivel internacional de la OIE y otros, que contienen una concentración o título conocidos del analito, sean los reactivos frente a los cuales todas las pruebas están estandarizadas (véase la Directriz n° 3⁸ de la OIE y también la Directriz de la OIE sobre Validación 3.6.6 [nota 6 a pie de página]). Estos estándares los preparan y distribuyen Laboratorios de Referencia de la OIE y otros laboratorios de referencia a nivel internacional. Los estándares de referencia a nivel nacional se calibran por comparación con un estándar de referencia a nivel internacional siempre que ello es posible, y los prepara y distribuye un laboratorio de referencia a nivel nacional. En ausencia de un estándar de referencia a nivel internacional, un estándar de referencia a nivel nacional se convierte en el estándar de comparación para la prueba candidata. Estos estándares se caracterizan con gran detalle mediante un exhaustivo análisis, y es preferible optar por métodos de caracterización, preparación y almacenamiento que hayan sido publicados en publicaciones revisadas por expertos.

2.6.2. Estándar interno

Un estándar de referencia interno en general debe calibrarse frente a un estándar internacional o nacional. En ausencia de cualquiera de los calibradores y en la medida de lo posible, el estándar interno se caracteriza con gran detalle de igual forma que los estándares internacionales y nacionales (Directriz de la OIE sobre Validación 3.6.6 [nota 6 a pie de página]). Este estándar interno local, por tanto, se convierte en el mejor estándar disponible, y se mantiene en volúmenes de alícuotas suficientes para un uso periódico como el estándar frente al cual se deberán calibrar los estándares de trabajo.

2.6.3. Estándar de trabajo

Se calibran uno o más estándares de trabajo, a menudo denominados controles del analito o del proceso, frente a un estándar internacional, nacional o interno, se preparan en grandes cantidades, en alícuotas, y se guardan para poder utilizarlos cada vez que se ejecute la prueba con fines de diagnóstico.

2.7. “Normalización” de los resultados de la prueba frente a un estándar de trabajo

Debido a la variación inherente en los resultados brutos de la prueba que se observan con frecuencia entre las ejecuciones de una misma prueba o entre laboratorios utilizando pruebas iguales o similares, es casi imposible comparar directamente datos (semi-)cuantitativos. Para mejorar visiblemente la comparabilidad de los resultados de la prueba, tanto intra como entre los laboratorios, se utiliza uno o más reactivo/s estándar de trabajo en cada ejecución de la prueba. A continuación, los valores brutos de la prueba para cada muestra problema pueden convertirse en unidades de actividad respecto al estándar/es de trabajo mediante un proceso denominado “normalización”. Los valores “normalizados” se pueden expresar de muchas maneras, como en porcentaje de un control positivo (por ejemplo, en un ELISA), o como la concentración o título estimados de un analito derivado de una curva estándar. Es una buena práctica el incluir estándares de trabajo en todas las ejecuciones de la prueba durante el desarrollo y validación de la prueba, ya que esto permite una “normalización” de los datos, lo cual proporciona un medio válido para la comparación directa de los resultados entre las ejecuciones de una prueba. Es indispensable controlar la variación (absoluta) de los estándares de normalización, puesto que de lo contrario la normalización puede introducir un sesgo. En las Directrices de la OIE

sobre Validación 3.6.1⁹ *Desarrollo y optimización de las pruebas de detección de anticuerpos*, 3.6.2¹⁰ *Desarrollo y optimización de las pruebas de detección de antígeno* y 3.6.3¹¹ *Desarrollo y optimización de las pruebas de detección de ácidos nucleicos*, se ofrece más información.

2.8. Estudio provisional de la repetibilidad

La evaluación de la repetibilidad debe empezar durante las fases de desarrollo y optimización de la prueba. Conocer inicialmente esta situación resulta fundamental para determinar si vale o no la pena seguir adelante con la validación de la prueba.

La repetibilidad se vuelve a verificar durante la Etapa 1 de la validación de la prueba (apartado B.1.1). Cuando la prueba optimizada se ejecuta en un laboratorio de rutina o en condiciones de campo (Fase 4 de la validación de la prueba), se realiza un seguimiento continuo de la repetibilidad como parte de los procedimientos de control del proceso a lo largo de toda la prueba (véase el apartado B.5.1).

B. FASE DE VALIDACIÓN DE LA PRUEBA

La “validación” es un proceso que determina la idoneidad de una prueba que se ha desarrollado, optimizado y estandarizado adecuadamente para un/os objetivo/s determinado/s. La validación incluye estimaciones de las características de rendimiento analítico y diagnóstico de una prueba. En el contexto de este documento, una prueba que ha superado las tres primeras etapas de la validación (Figura 1), incluida la caracterización del rendimiento, puede designarse como “validada para el/los propósito/s inicial/es deseado(s)”

1. Etapa 1 - Las características del rendimiento analítico

Lo ideal es que el diseño de los estudios descritos en los siguientes apartados se lleve a cabo con la ayuda de un estadístico y de un experto en enfermedades para asegurarse de que el tamaño de la muestra y el enfoque experimental sean válidos. Es posible diseñar experimentos que de manera eficiente proporcionen información sobre fuentes probables de variación en la precisión de la prueba intra e interlaboratorio (véase la nota 5 a pie de página, en el Apartado A.2.2, arriba), lo cual definirá las características de rendimiento de la prueba. La elección de los microorganismos, las cepas o los serotipos para evaluar la sensibilidad y la especificidad analíticas deberá reflejar el conocimiento actual y, por lo tanto, informar sobre cuál es el mejor diseño experimental posible para detectar analitos determinados.

1.1 Repetibilidad

La repetibilidad es el nivel de concordancia entre resultados de réplicas de una muestra tanto intra como entre ejecuciones del mismo método analítico en un laboratorio determinado. La repetibilidad se calcula mediante la evaluación de la variación en los resultados de varias réplicas. El número de réplicas debe determinarse preferiblemente consultando a un estadístico, y se sugiere un mínimo de tres muestras que contengan una actividad del analito que se sitúe en el intervalo de funcionamiento de la prueba. A continuación, de cada una de estas muestras se toman alícuotas y se depositan en un recipiente individual como réplicas idénticas de la muestra original que contienen las concentraciones originales de analito y matriz (véase la Directriz de la OIE sobre Validación 3.6.6 [nota 6 a pie de página]). Después, cada réplica se procesa pasando por todos los pasos de la prueba, incluidos la creación de la dilución de trabajo, como si fuera una muestra problema procedente de la población objeto de la prueba. No resulta aceptable preparar una dilución final de trabajo de una muestra en un solo tubo a partir del cual se pipeteen alícuotas diluidas a vasos de reacción, ni crear réplicas de una extracción de ácido nucleico en lugar de extraer cada réplica antes de llevar a cabo la dilución en el interior de los vasos de reacción. Estas “muestras” no constituyen réplicas válidas para los estudios de repetibilidad. Se analiza la variación entre diferentes ejecuciones de la misma prueba utilizando las mismas muestras en múltiples ejecuciones llevadas a cabo por dos o más técnicos, preferiblemente en varios días. La variación en los resultados de las distintas réplicas se puede expresar como desviaciones estándar, coeficientes de variación (desviación estándar ÷ media de réplicas), u otras opciones posibles (véase la Directriz de la OIE sobre Validación 3.6.4¹² *Medición de la incertidumbre* para las evaluaciones de la repetibilidad).

1.2. Especificidad analítica

La especificidad analítica (ASp) es la capacidad de la prueba de distinguir entre el analito buscado (como un anticuerpo, microorganismo o secuencia genómica) y analitos no buscados, incluidos componentes de la

9 Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/GUIDELINE_3.6.1_ANTIBODY_DETECT.pdf

10 Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/GUIDELINE_3.6.2_ANTIGEN_DETECT.pdf

11 Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/GUIDELINE_3.6.3_NAD_ASSAYS.pdf

12 Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/GUIDELINE_3.6.4_MEASUREMENT_UNCERT.pdf

matriz. La evaluación es cualitativa y la elección y procedencias de los tipos de muestra, microorganismos y secuencias escogidos para evaluar la ASp deben reflejar el propósito de la prueba y el tipo de prueba. En las Directrices de la OIE sobre Validación nº 3.6.1, 3.6.2 y 3.6.3 (notas 9, 10 y 11 a pie de página) se ofrece información sobre pruebas de anticuerpos, antígenos y ácidos nucleicos, respectivamente. La ASp se documenta durante la validación de la Etapa 1, y se identifican reacciones cruzadas. La reactividad cruzada (ASp inferior al 100%) puede ser aceptable en función del uso propuesto de la prueba. La influencia de la reactividad cruzada se documenta en mayor medida durante la Etapa 2 (establecimiento de la DSp) y se evalúa en el momento de implementar la Fase 4.

1.2.1. Selectividad

La selectividad es el grado en que un método puede cuantificar con exactitud el analito buscado en presencia de: 1) interferentes, tales como componentes de la matriz (por ejemplo, inhibidores de enzimas en la mezcla de reacción); 2) productos de degradación (por ejemplo, factores tóxicos); 3) una unión inespecífica de los reactivos a una fase sólida (por ejemplo, conjugado de un ELISA adsorbido a un pocillo de la placa de microtitulación); 4) anticuerpos contra la vacunación, que pueden confundirse con anticuerpos contra la infección activa. Estos interferentes pueden causar falsas reducciones o incrementos en las respuestas de la prueba que afectarán negativamente a su especificidad analítica. Vessman, *et al* (2001) aportaron una útil visión general de la selectividad según se define para la química analítica, de la cual se dedujo una modificación aquí descrita para la aplicación a las pruebas diagnósticas.

1.2.2. Exclusividad

La exclusividad es la capacidad del método analítico de detectar un analito o secuencia genómica que es propia del microorganismo buscado, y excluye todos los demás microorganismos conocidos que pudieran dar una reacción cruzada. Esto también definiría una prueba confirmativa.

1.2.3. Inclusividad

La inclusividad es la capacidad de una prueba de detectar varias cepas o serovariedades de una especie, varias especies de un género o una agrupación similar de microorganismos o anticuerpos estrechamente emparentados. Caracteriza el ámbito de aplicación de una prueba de cribado.

1.3 Sensibilidad analítica

El límite de detección (LOD) es una medida de la sensibilidad analítica (ASe) de una prueba. El LOD es la cantidad estimada de analito en una matriz determinada que produciría un resultado positivo por lo menos durante parte del tiempo. Habitualmente, el LOD se estima añadiendo analito a la matriz problema. La elección del/los analito/s (por ejemplo, especies o cepas) forma parte de la definición de la ASe y debe especificarse adecuadamente. Pueden diseñarse estas pruebas en función de la estimación precisa y exacta del nivel de probabilidad (por ejemplo, 50% o 100%), pero en determinadas circunstancias puede ser aceptable una estimación conservadora del LOD (por ejemplo, del 100%). Por ejemplo, en una titulación en la que se empleen diluciones decimales, todas las réplicas a todas las diluciones podrían mostrar una respuesta o bien del 100% o bien del 0%. En este caso existirían dos opciones. La última dilución que presente una respuesta del 100% puede aceptarse como estimación conservadora del límite inferior de detección. Una estimación más exacta puede conseguirse mediante una prueba de segunda fase empleando intervalos más estrechos en el esquema de dilución, centrándose en la región situada entre el 100% y el 0%. En la Directriz de la OIE sobre Validación 3.6.5¹³ *Enfoques estadísticos para la validación* se muestran los métodos de evaluación estadística de los datos del LOD.

1.4 Exactitud analítica de las pruebas o procedimientos complementarios

Algunos métodos o procedimientos analíticos pueden ser calificados para su uso como herramientas analíticas en el laboratorio de diagnóstico. Estas suelen ser pruebas o procedimientos complementarios secundarios que se aplican a un analito que se ha detectado en una prueba primaria. El propósito de tales instrumentos de análisis es caracterizar en mayor grado el analito detectado en la prueba primaria. Algunos ejemplos de pruebas complementarias abarcan desde la neutralización vírica hasta la tipificación o la secuenciación molecular de un virus aislado.

Estas pruebas complementarias deben validarse en cuanto a las características de rendimiento analítico (Apartados A.2 a B.1.3, arriba), pero difieren de las pruebas diagnósticas en que no requieren validación

13 Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/GUIDELINE_3.6.5_STATISTICAL_VALIDATION.pdf

relativa a las características de rendimiento diagnóstico (Apartados B.2 a B.4, abajo) si sus resultados no se utilizan para establecer un diagnóstico final respecto al propósito deseado. La exactitud analítica de estas herramientas se puede definir por comparación con un reactivo estándar de referencia, o por las características inherentes a la propia herramienta (como la titulación a punto final). En todos estos ejemplos, el análisis en cuestión se caracteriza en mayor medida cuantitativa o cualitativamente mediante la herramienta analítica.

2. Etapa 2 – Rendimiento diagnóstico de la prueba

Las estimaciones de la DSe (proporción de muestras de animales de referencia que se sabe que están infectados y que dan positivo en una prueba) y de la DSp (la proporción de muestras de animales de referencia que se sabe que no están infectados y que dan negativo en una prueba) son los indicadores principales del rendimiento establecidos durante la validación de una prueba. Estas estimaciones son la base del cálculo de otros parámetros a partir de los cuales se realizan inferencias sobre los resultados de la prueba (por ejemplo, los valores predictivos de los resultados positivos y negativos de la prueba). Por consiguiente, es muy importante que las estimaciones sobre la sensibilidad y la especificidad diagnósticas sean tan exactas como sea posible. Lo ideal es que deriven del análisis de un conjunto de muestras procedentes de animales de referencia, cuyos antecedentes y estado en cuanto a la enfermedad/infección en cuestión se conozcan y sean relevantes para el país o región en los cuales se va a utilizar la prueba. Una estimación del área bajo la curva característica operativa del receptor (ROC) es una herramienta útil para estimar la DSe y la DSp de una prueba diagnóstica cuantitativa porque evalúa la exactitud global teniendo en cuenta todos los posibles valores de la misma (Greiner *et al.*, 2000; Zweig & Campbell, 1993). Este enfoque se describe en detalle en la Directriz de la OIE sobre Validación 3.6.5 (nota 13 a pie de página).

El número designado de muestras que se sepa que son positivas y muestras que se sepa que son negativas dependerá de cuáles sean los valores probables de DSe y de DSp de la prueba candidata y del nivel de confianza deseado para las estimaciones (Tabla 1 y Jacobson, 1998). En la Tabla 1, se indican dos conjuntos de las cantidades teóricas de muestras necesarias, permitiendo un error del 5% o del 2% en las estimaciones de la DSe o la DSp. La comparación de un error del 5% frente a un error del 2% presenta una considerable reducción en el número de muestras necesarias. Para lograr una confianza alta (habitualmente, del 95%) en las estimaciones de DSe o DSp se requieren muchas muestras cuando se desea un margen de error pequeño en la estimación. Por ejemplo, al pasar de un error del 2% a un error del 5% para una DSe o DSp probables del 90% y un 95% de confianza se observa un aumento considerable (864 frente a 138) en el número de muestras necesarias. Las limitaciones logísticas y financieras podrían requerir que se evaluara un tamaño de muestra inferior al exigido estadísticamente, en cuyo caso el intervalo de confianza calculado para la DSe y la DSp indicarán menor confianza diagnóstica en los resultados. El tamaño de la muestra también puede resultar limitado por el hecho de que no se disponga de las poblaciones de referencia ni los estándares de referencia de la OIE (para más detalles, véase la Directriz de la OIE sobre Validación 3.6.5 [nota 13 a pie de página]). Por lo tanto, inicialmente puede ser necesario utilizar una cantidad subóptima de muestras. Sin embargo, puede ser muy deseable potenciar la confianza y reducir el margen de error permitido en las estimaciones de la DSe y la DSp añadiendo más muestras (de estado equivalente respecto al conjunto original) a medida que se dispone de ellas.

Tabla 1. Cantidad teórica de muestras procedentes de animales que se sabe si están o no infectados, necesaria para establecer las estimaciones de sensibilidad (DSe) y especificidad (DSp) diagnósticas en función del valor probable de DSe o DSp y del margen de error y el nivel de confianza deseados

Estimación de DSe o DSp	2% de error permitido en la estimación de la DSe y la DSp			5% de error permitido en la estimación de la DSe y la DSp		
	Confianza			Confianza		
	90%	95%	99%	90%	95%	99%
90%	610	864	1493	98	138	239
92%	466	707	1221	75	113	195
94%	382	542	935	61	87	150
95%	372	456	788	60	73	126
96%	260	369	637	42	59	102
97%	197	279	483	32	45	77
98%	133	188	325	21	30	52
99%	67	95	164	11	15	26

Los siguientes son ejemplos de poblaciones y metodologías de referencia que pueden ayudar a determinar las características de rendimiento de la prueba que está siendo validada.

2.1. Poblaciones de animales de referencia

Teóricamente, la selección de animales de referencia requiere que variables importantes del hospedador de la población estudiada estén representadas en los animales escogidos para ser infectados por el agente en cuestión o expuestos al mismo, o que nunca hayan sido infectados ni expuestos. Las variables a destacar son, aunque no exclusivamente, la especie, la edad, el sexo, la raza, el estadio de la infección, el historial de vacunación y el historial de enfermedades relevantes en el rebaño (para más información, véase la Directriz de la OIE sobre Validación 3.6.6 [nota 6 a pie de página]).

2.1.1. Muestras de referencia negativas:

Puede ser difícil localizar muestras que se haya comprobado que son negativas, de animales que no hayan tenido posibilidad de infección ni exposición al agente en cuestión. A menudo es posible obtener estas muestras de países o zonas en los que la enfermedad en cuestión se ha erradicado o nunca ha existido. Estas muestras son útiles siempre que la población objeto de la prueba sea suficientemente similar a la población de la que procede la muestra.

2.1.2. Muestras de referencia positivas:

En general es problemático hallar cantidades suficientes de animales de referencia verdaderamente positivos, comprobados mediante el aislamiento del agente patógeno. Puede ser necesario recurrir a muestras de animales que se hayan identificado mediante otras pruebas de exactitud suficientemente alta, como las pruebas validadas de detección de ácido nucleico. La prueba candidata se aplica a estas muestras de referencia y los resultados (positivos y negativos) se clasifican de forma cruzada en una tabla 2x2. Esto se ha denominado “modelo de referencia” porque en él se considera que el estándar de referencia es perfecto. En la Tabla 2 del apartado B.2.5 se muestra un cálculo de la muestra.

2.2. Muestras de animales que no se sabe si están infectados

Cuando el denominado estándar de referencia es imperfecto, que es lo habitual en cualquier prueba de diagnóstico, las estimaciones de la DSe y de la DSp para la prueba candidata que se basen en este estándar no serán perfectas. Una forma de superar este problema es llevar a cabo un análisis de clases latentes de los resultados conjuntos de ambas pruebas asumiendo que ninguna prueba es perfecta.

Los modelos de clases latentes no parten de la suposición de una prueba de referencia perfecta sino que estiman la exactitud de la prueba candidata y del estándar de referencia con los resultados analíticos conjuntos (Branscum *et al.*, 2005; Enøe *et al.*, 2000; Georgiadis *et al.*, 2003; Hui y Walter, 1980). Si se utiliza un análisis de clases latentes bayesiano, puede incorporarse al análisis la información de la que se disponga previamente sobre el rendimiento de la prueba de referencia y de la prueba candidata.

Dado que estos modelos estadísticos son complejos y requieren suposiciones críticas, debe solicitarse la ayuda de expertos en estadística para orientar el análisis y describir el muestreo de la/s población/es de destino y las características de otras pruebas incluidas en el análisis, y para elegir correctamente el modelo y los métodos de estimación en base a bibliografía revisada por expertos (más información en la Directriz de la OIE sobre Validación 3.6.5 [nota 13 a pie de página]).

2.3 Animales de referencia infectados experimentalmente o vacunados

Las muestras obtenidas secuencialmente a partir de animales infectados experimentalmente o vacunados son útiles para determinar la cinética de las respuestas de anticuerpos o la presencia/ausencia de antígeno o microorganismos en muestras de dichos animales. Sin embargo, los resultados múltiples adquiridos de forma seriada antes y después de la exposición de animales individuales no son aceptables para establecer estimaciones de la DSe y la DSp porque se infringe el requisito estadístico de las observaciones independientes. Puede aceptarse el muestreo de animales de experimentación realizado en un solo momento (por ejemplo, una muestra tomada aleatoriamente de cada animal). No obstante, es importante tener en cuenta que en el caso de los métodos indirectos de detección del analito, la exposición a microorganismos en condiciones experimentales o la vacunación pueden desencadenar respuestas de anticuerpos que podrían no ser cuantitativa y cualitativamente típicas de la infección natural en la población estudiada (Jacobson, 1998). La cepa del microorganismo, la dosis y la vía de administración a los animales de experimentación son ejemplos de variables que pueden inducir a error cuando se extrapolan las estimaciones de

sensibilidad y especificidad diagnósticas a la población estudiada. Si debido a que es prácticamente imposible obtener muestras de referencia adecuadas de animales expuestos de forma natural se hace necesario utilizar muestras de animales de experimentación para los estudios de validación, las mediciones resultantes de DSe y de DSp deben considerarse estimaciones subóptimas de las verdaderas DSe y DSp.

2.4 Determinación de los umbrales (puntos de corte)

Para obtener estimaciones de la DSe y la DSp de la prueba candidata, que se mide en una escala continua, en primer lugar los resultados de la prueba deben agruparse en categorías: dos (positivos o negativos) o tres (positivos, intermedios [dudosos] o negativos). Esto se consigue insertando uno o dos puntos de corte (umbrales o límites de decisión) en la escala de resultados de la prueba. Los puntos de corte escogidos deben reflejar el objetivo pretendido de la prueba y su aplicación, y deben respaldar la DSe y la DSp requeridas para la prueba. Existen opciones y métodos descriptivos para determinar la mejor forma de expresar la DSe y la DSp (Branscum *et al.*, 2005; Georgiadis *et al.*, 2003; Greiner *et al.*, 19954; Greiner *et al.*, 2000; Jacobson, 1998; Zweig y Campbell, 1993 y Directriz de la OIE sobre Validación 3.6.5 [nota 13 a pie de página]). Si se produce una superposición considerable en las distribuciones de los valores de las pruebas realizadas en animales que se sepa si están o no infectados, resulta imposible seleccionar un único punto de corte que permita clasificar adecuadamente a estos animales con relación a su estado de infección. En lugar de un único punto de corte, se pueden seleccionar dos puntos de corte que definan una DSe alta (por ejemplo, que incluya el 99% de los valores de los animales infectados), y una DSp alta (por ejemplo, que incluya el 99% de los valores de los animales no infectados) (Greiner *et al.*, 1995).

La principal dificultad de establecer puntos de corte basados en las características del rendimiento diagnóstico es el no conocer el número necesario de muestras bien caracterizadas. Se explican alternativas en el Apartado B.2.6 sobre la aceptación provisional de una prueba durante la recogida de datos para mejorar las estimaciones de la DSe y de la DSp.

2.5. Cálculo de la DSe y de la DSp basado en los resultados del análisis de muestras de referencia

Un método habitual de determinación de las estimaciones de la DSe y la DSp es analizar las muestras de referencia con la prueba nueva, y tabular de forma cruzada los resultados categóricos de la prueba en una Tabla de 2 x 2. En un ejemplo hipotético, supongamos que el técnico que ejecutó la prueba eligió un tamaño de muestra suponiendo que los valores más probables de DSe y de DSp de la prueba nueva son del 97% (DSe) y del 99% (DSp), respectivamente, con una confianza deseada del 95% en ambas estimaciones. La cantidad de error permitido en las estimaciones se fijó en el 2%. La Tabla 1 indica que se necesitan 279 muestras de animales que se sepa que están infectados para evaluar la DSe, y que se necesitan 95 muestras que se sepa que son negativas para establecer la estimación de la DSp. A continuación, se analizaron las muestras mediante la prueba nueva. La Tabla 2 es un conjunto hipotético de resultados a partir de los cuales se han obtenido las estimaciones de la DSe y de la DSp.

Tabla 2. Estimaciones de la sensibilidad y la especificidad diagnósticas calculadas a partir de un conjunto hipotético de resultados de muestras analizadas procedentes de poblaciones que se sabe que están infectadas o de poblaciones que se sabe que no están infectadas.

		Cantidad de muestras de referencia necesarias*	
		Que se sabe que son positivas (279)	Que se sabe que son negativas (95)
Resultados de la prueba	Positivos	270 VP	7 FP
	Negativos	9 FN	88 VN
		Sensibilidad diagnóstica*	Especificidad diagnóstica*
		VP/(VP + FN)	VN/(VN + FP)
		96,8% (94,0 – 98,5%)**	92,6% (85,4 – 97,0%)**

*Basado en la Tabla 1 para una prueba con los siguientes parámetros:

1. Antes del análisis, DSe estimada del 97% y DSp estimada del 99%
 2. 95% = confianza necesaria en las estimaciones de la DSe y la DSp
 3. 2% = Error permitido en las estimaciones de la DSe y la DSp
- VP y FP = Verdadero Positivo y Falso Positivo, respectivamente
VN y FN = Verdadero Negativo y Falso Negativo, respectivamente

** Intervalo de confianza binomial exacto del 95% para los valores calculados de DSe y DSp (véase la Directriz de la OIE sobre Validación 3.6.5 [nota 13 a pie de página] para información sobre límites de confianza)

En este ejemplo, las estimaciones de la DSe son las previstas, pero la DSp es muy inferior (92%) al valor previsto del 99%. Como consecuencia, la amplitud del intervalo de confianza para la DSp es muy superior a la esperada. Al volver a examinar la Tabla 1, se observa que son necesarias 707 muestras para lograr un margen de error de $\pm 2\%$ para una DSp del 92%, pero este aumento del tamaño de la muestra podría no ser factible (véase la Directriz de la OIE sobre Validación 3.6.5 [nota 13 a pie de página] para más información).

2.6 Reconocimiento de prueba provisional¹⁴

En determinadas situaciones no se puede o no se debe pasar a la Etapa 2 del Proceso de Validación porque no se dispone de suficientes muestras adecuadas de la población estudiada y es difícil acceder a los animales (por ejemplo, debido a enfermedades infecciosas transfronterizas o a enfermedades de la fauna salvaje).

La experiencia ha mostrado que el principal obstáculo para pasar a la Etapa 2 del Proceso de Validación es la cantidad de muestras específicas necesarias para calcular la DSe y la DSp. La fórmula se conoce bien y existe tablas para determinar el número de muestras necesarias para estimar distintos niveles de DSe y DSp, en función del margen de error y del nivel de confianza deseados en las estimaciones (Tabla 1 y Jacobson, 1998). En la fórmula se da por supuesto que está contemplada la infinidad de factores relacionados con el hospedador/microorganismo que pueden influir en el resultado de la prueba. Dado que este supuesto puede ser cuestionable, los tamaños de muestra estimados en el mejor de los casos son muy pequeños. En el caso de una enfermedad que no sea endémica ni esté diseminada, inicialmente podría ser imposible obtener el número de muestras requerido, pero con el tiempo, la acumulación de datos adicionales permitirá el ajuste del punto de corte (umbral) o, en el caso de que no se precise ajuste, una mejora de la confianza en las estimaciones.

El reconocimiento provisional define una prueba en cuya Etapa 1 se han evaluado parámetros básicos (ASE, ASp y repetibilidad) y, además, se ha realizado una estimación preliminar de la DSp y la DSe basada en un conjunto pequeño de muestras bien caracterizadas que contengan el analito de interés y una estimación preliminar de la reproducibilidad. Esto supone haber terminado parte de la Etapa 2. Pueden llevarse a cabo estimaciones preliminares de la reproducibilidad de la prueba candidata empleando el grupo escogido de muestras bien caracterizadas para mejorar el estado de aceptación provisional de la prueba. A continuación, el método analítico candidato se duplica en laboratorio de al menos dos centros distintos, y el conjunto de muestras se evalúa empleando la muestra candidata en cada uno de estos laboratorios, utilizando el mismo protocolo, los mismos reactivos que se han descrito en el protocolo y un equipo comparable. Es una versión reducida del estudio de reproducibilidad de la Fase 3 de la validación de la prueba. Siguiendo este procedimiento de reconocimiento provisional, el protocolo de la prueba no debe variar.

El reconocimiento provisional de una prueba por parte de autoridades estatales o nacionales significa que no se han evaluado las características de rendimiento diagnóstico de la prueba. Así, el laboratorio debe desarrollar y seguir un protocolo para añadir y evaluar muestras, a medida que se disponga de ellas, con el fin de cumplir este requisito. Teóricamente, este proceso debe limitarse a un periodo de tiempo concreto en el cual esta recopilación de muestras tendría por objetivo cumplir las Fases 2 y 3 del proceso de validación, y se reservaría a situaciones determinadas (emergencias, especies menores, situaciones en las que no se disponga de ninguna otra prueba, etc.).

3. Etapa 3 - Estimaciones de la reproducibilidad y del aumento de la repetibilidad

3.1 Reproducibilidad

La reproducibilidad es la capacidad de un método analítico de que sus resultados sean coherentes, según las estimaciones de la precisión, al aplicarlo a alícuotas de las mismas muestras analizadas en distintos laboratorios, preferiblemente situados en regiones o países distintos utilizando exactamente la misma prueba (protocolo, reactivos y controles). Para evaluar la reproducibilidad de una prueba, cada uno de al menos tres laboratorios debe analizar el mismo conjunto de un mínimo de 20 muestras (sin saber cuáles son), con idénticas alícuotas para cada laboratorio (véase la Directriz de la OIE sobre Validación 3.6.6 [nota 6 a pie de página]). Este ejercicio también genera datos preliminares sobre efectos no aleatorios atribuibles a la utilización de la prueba en otros laboratorios. Además, las estimaciones de la repetibilidad intra-laboratorio aumentan por las réplicas que se utilizan en los estudios de reproducibilidad. Pueden estimarse las mediciones de la precisión de los datos tanto de

14 El reconocimiento de prueba provisional no implica la aceptación por parte de la OIE. No obstante, reconoce una decisión informada de las autoridades a nivel local, estatal, nacional o internacional de que aprueba de forma condicional una prueba validada parcialmente.

reproducibilidad como de repetibilidad (en la Directriz de la OIE sobre Validación 3.6.4 [nota 12 a pie de página] se explica en mayor detalle este tema y su aplicación).

En el caso de las pruebas de campo, la reproducibilidad debe evaluarse en las condiciones en que pretenda utilizarse.

3.2. Designación de prueba validada

Al terminar la validación de Fase 3, suponiendo que las fases anteriores se hayan superado total y satisfactoriamente, la prueba puede considerarse “validada para el propósito inicial deseado”. El que se mantenga esta designación depende de si se lleva a cabo un seguimiento continuo del rendimiento de la prueba, como se describe en el apartado 5.1.

4. Etapa 4 – Implementación del programa

Cuando una prueba funciona bien, se obtiene información adicional y útil de su rendimiento respecto a las expectativas. Además, la prevalencia (real) del rasgo diagnóstico en la población en estudio es un factor importante que debe tenerse en cuenta como se describe abajo.

4.1. Idoneidad para el uso previsto

Aunque este capítulo trata la validación y la idoneidad para un propósito determinado desde el punto de vista científico, también debe tenerse en cuenta que existen otros factores que podrían influir en la utilidad de una prueba para la aplicación prevista. Estos factores son no solo la idoneidad diagnóstica de la prueba, sino también su aceptabilidad por parte de las comunidades científica y reguladora, la aceptabilidad para el cliente y la viabilidad dados los recursos de laboratorio de los que se disponga. En algunas enfermedades, tal vez se disponga de varias pruebas que puedan utilizarse junto con programas de control y vigilancia de la enfermedad, en cuyo caso, la utilidad de la prueba tal vez tenga que valorarse evaluando incrementos graduales en los valores de la DSe, la DSp y predictivos de las dichas pruebas combinadas.

Cuando resulta imposible cumplir los requisitos de funcionamiento de una prueba, dicha prueba no resultará idónea para el propósito deseado. Estos requisitos pueden ser costes de funcionamiento, disponibilidad de equipo, nivel de sofisticación técnica y de capacidad de interpretación, disponibilidad de kits/reactivos, periodo de validez, requisitos de transporte, seguridad, bioseguridad, rendimiento de la muestra, tiempo necesario para la entrega de resultados, aspectos del control de calidad y de la garantía de calidad, y si es viable llevar a cabo la prueba en otros laboratorios. Los kits de las pruebas utilizados sobre el terreno son muy deseables en el sentido de que son muy fáciles de utilizar, pero dado que se usan fuera del entorno controlado de un laboratorio, deben añadirse precauciones para que sigan siendo adecuados para la finalidad en cuestión (Crowther *et al.*, 2006).

4.2. Interpretación de los resultados de la prueba

Valores predictivos de los resultados de las pruebas: El valor predictivo positivo (PPV) es la probabilidad de que un animal que haya dado positivo en la prueba realmente sea positivo según el diagnóstico real. El valor predictivo negativo (NPV) es la probabilidad de que un animal que ha dado negativo en la prueba de hecho sea negativo según el diagnóstico real.

Los valores predictivos de los resultados de una prueba son una aplicación del teorema de Bayes y se calculan del siguiente modo:

$$PPV = \frac{P \times DSe}{P \times DSe + (1 - P) \times (1 - DSp)}$$

y

$$NPV = \frac{(1 - P) \times DSp}{P \times (1 - DSe) + (1 - P) \times DSp}$$

Donde:

PPV = Valor predictivo de un resultado positivo en una prueba
NPV = Valor predictivo de un resultado negativo en una prueba
P = Prevalencia de infección
DSe = Sensibilidad diagnóstica
DSp = Especificidad diagnóstica

Contrariamente a lo que ocurre con la DSe y la DSp, los valores predictivos están influidos por la prevalencia real del estado diagnóstico real de la población en estudio. En otras palabras, los valores predictivos no son características inherentes a una prueba diagnóstica determinada, sino una función de su DSe y su DSp y de la prevalencia local de infección en una población definida en un momento determinado.

Los valores predictivos resultan de gran importancia para que los veterinarios de campo interpreten los resultados. Por ejemplo, un PPV de 0,9 significa que un animal que ha dado positivo en la prueba tiene un 90% de probabilidad de estar realmente infectado y un 10% de probabilidad de ser un falso positivo.

El valor predictivo de un resultado positivo también es muy importante para los servicios veterinarios responsables de la gestión de los programas de control o erradicación. En cuanto a la inversa del PPV (es decir, 1/PPV), da la información sobre cuánto dinero se gasta en el desvío de verdaderos y falsos positivos por cada animal realmente positivo que se detecta mediante las actividades de vigilancia. Dicho de otra forma, si el PPV es 0,67, significa que dos de cada tres animales positivos son realmente positivos y que el restante es un falso positivo. Dado que durante la aplicación de un programa de control, la prevalencia de infección está cambiando continuamente, el seguimiento del PPV es una forma de evaluar los costes del programa.

Además, durante la aplicación de un programa de control, normalmente es aconsejable cambiar la sensibilidad de las pruebas utilizadas; en base a la variación de la prevalencia de infección en la población estudiada y al objetivo del programa, el PPV puede utilizarse para aplicar cambios en la DSe y la DSp en función de aspectos económicos. En otras palabras, cuando surge la necesidad de aplicar un cambio en la DSe y la DSp de la prueba, pueden fijarse varios umbrales posibles a lo largo de la curva ROC de validación de la prueba, y pueden utilizarse los valores pertinentes de DSe y DSp para cada punto de corte para evaluar el coste esperable del desvío de cada animal infectado.

Si el propósito es establecer evidencia de la ausencia de enfermedad, el NPV es la medición más importante. El NPV depende totalmente de la DSe.

4.3. Reconocimiento internacional

Tradicionalmente, la OIE ha reconocido pruebas a nivel internacional cuando están diseñadas como pruebas prescritas o alternativas para fines comerciales. Esto a menudo se ha basado en la evidencia de su utilidad a nivel nacional, regional o internacional. En el caso de los kits de diagnóstico comerciales que han pasado por el procedimiento de la OIE de validación y certificación de pruebas de diagnóstico, el paso final es incluir la prueba en el Registro de la OIE. Las pruebas incluidas en el Registro están certificadas como adecuadas para un propósito concreto si han superado las etapas de Validación 1, 2 y 3. El Registro tiene por objetivo proporcionar a los posibles usuarios de la prueba una fuente informada e imparcial de información sobre el kit y sus características de rendimiento para un propósito determinado. Este Registro puede consultarse en la página web de la OIE: <http://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/certification-de-pruebas-de-diagnostico/registro-de-pruebas-de-diagnostico/>.

4.4. Utilización de la prueba

La prueba definitiva de la utilidad de una prueba es/son su/s aplicación/es con éxito en otros laboratorios y su inclusión en programas nacionales, regionales y/o internacionales de control o vigilancia. Los laboratorios de referencia desempeñan un papel crucial en este proceso. En el avance natural de las mejoras diagnósticas y/o tecnológicas, nuevas pruebas se convertirán en el nuevo método de referencia frente al cual se compararán las demás. Como tales, poco a poco obtendrán el reconocimiento nacional, regional e internacional. Como estándares reconocidos, estas pruebas también se utilizarán para elaborar reactivos de referencia con fines de control de calidad, eficiencia y armonización. Esos reactivos de referencia también pueden convertirse en estándares internacionales.

Debe repetirse una evaluación de la reproducibilidad cuando la prueba se transfiere del laboratorio al campo, tanto para su uso en laboratorios locales como en aplicaciones a pie de explotación. Los cambios predecibles, como extremos de temperatura y niveles de experiencia del técnico, deben evaluarse como fuentes adicionales de variación en los resultados de la prueba que pueden afectar a las estimaciones de la reproducibilidad.

5. Seguimiento del rendimiento de la prueba tras la validación inicial

5.1. Seguimiento de la prueba

Para que una prueba siga considerándose validada, es necesario asegurarse de que la misma conserva las características de rendimiento tal como se definieron durante la validación, lo cual puede determinarse mediante un programa de garantía de calidad que se caracterizará por un seguimiento cuidadoso del rendimiento diario de la prueba, principalmente con estimaciones de la precisión y la exactitud obtenidas al analizar los controles internos, así como de la tendencia a dar datos atípicos. Puede realizarse un seguimiento del rendimiento gráficamente marcando en diagramas de control los resultados obtenidos con los controles¹⁵. Deben estudiarse las desviaciones respecto al rendimiento esperado para poder aplicar medidas correctivas si es necesario. Este seguimiento aporta evidencias cruciales de que la prueba conserva su calificación de “validada” durante la fase de implementación de la prueba. La reproducibilidad se evalúa mediante programas de control de calidad externos, como la comprobación de la competencia. En caso de que la prueba empiece a dar resultados que no concuerden con los datos de la validación inicial, deberá clasificarse como no adecuada para el propósito deseado. Así, las pruebas validadas deben someterse a una evaluación continua para asegurarse de que siguen siendo adecuadas para el propósito en cuestión.

5.2 Modificaciones y mejoras - consideraciones a tener en cuenta para aplicar cambios en la prueba

Con el tiempo, es probable que sea necesario aplicar modificaciones en la prueba para abordar posibles cambios en el propósito de la prueba, en los analitos estudiados (es decir, modificaciones en la prueba para ajustar el rendimiento diagnóstico) o bien en las características técnicas, con el fin de mejorar la eficiencia o la relación coste-eficacia de la prueba. En caso de que se produzca un cambio en el propósito de la prueba, será obligatoria una validación revisada desde la Etapa 2 en adelante.

Si la prueba va a aplicarse a otra región geográfica y/o población, es recomendable volver a validarla en las nuevas condiciones. Se sabe que los linajes o sublinajes de los agentes infecciosos de los animales varían en función de la región geográfica, lo cual implica tener que revalidar la prueba para cada población en estudio. Esto es especialmente cierto en el caso de los sistemas de detección de ácido nucleico (DAN) y es muy frecuente que se produzcan mutaciones puntuales en muchos agentes infecciosos (sobre todo, en virus de ARN). Las mutaciones, que pueden tener lugar en puntos del cebador o de la sonda, pueden afectar a la eficiencia de la prueba e incluso invalidar las características de rendimiento establecidas. También es aconsejable confirmar periódicamente la secuencia de acceso en las regiones genómicas escogidas de cepas nacionales o regionales de los agentes infecciosos. Esto es especialmente cierto para los puntos del cebador y de la sonda, para garantizar que permanecen estables y que la DSe y la DSp de la prueba no resultan comprometidas. Pueden surgir cuestiones similares con las pruebas basadas en la inmunología, tanto para detección de antígenos como de anticuerpos.

Puede producirse una situación similar con el surgimiento de nuevos subtipos de agentes patógenos existentes. En tales circunstancias, las pruebas DAN existentes tal vez tengan que modificarse.

5.2.1. Modificaciones técnicas y evaluaciones de la comparabilidad

Lo habitual es que las modificaciones técnicas realizadas en una prueba validada, como los cambios de instrumental o de los protocolos de extracción, así como la conversión de una prueba en un sistema semiautomático o totalmente automático utilizando la robótica, no exijan una completa revalidación de la prueba. En lugar de ello, se lleva a cabo una comparación de los métodos para determinar si las modificaciones relativamente pequeñas de la prueba afectan a las características de rendimiento documentadas con anterioridad. La comparabilidad puede establecerse ejecutando el procedimiento modificado y el original en paralelo, con el mismo conjunto de muestras en ambos, y realizando varias ejecuciones. El conjunto de muestras escogido para esta comparación debe representar el intervalo completo de funcionamiento de ambas pruebas. Si se determina que los resultados del procedimiento modificado y del método original validado son comparables en un experimento basado en un criterio pre-especificado, la prueba modificada sigue considerándose validada para el propósito deseado. Véase la Directriz de la OIE sobre Validación 3.6.8 (una vez disponible, véase la nota 7 a pie de página) para una descripción de experimentos que son adecuados para comprobar la comparabilidad, y la y Directriz de la OIE sobre Validación 3.6.6 (nota 6 a pie de página) sobre conjuntos de muestras de referencia.

15 *Gráfico de control*: Es una representación gráfica de datos obtenidos de la medición repetida de una o varias muestras control analizadas en distintas ejecuciones de la prueba a lo largo del tiempo.

5.2.2. Modificaciones biológicas y evaluaciones de la comparabilidad

Puede haber situaciones en que sea necesario y/o esté justificado realizar cambios en algunas de las sustancias biológicas utilizadas en la prueba. Estos cambios pueden realizarse en la muestra en sí (por ejemplo, una tejido distinto o incluso otra especie animal), en los reactivos (por ejemplo, la sustitución de un antígeno recombinante por un antígeno derivado de cultivo celular, o de un antígeno conjugado a anticuerpo por otro de especificidad inmunológica similar en un ELISA). La dificultad de cualquier modificación radica en el hecho de que debe determinarse si el cambio requiere una revalidación completa de la prueba tanto a nivel de laboratorio como de campo. Como mínimo, toda modificación requiere se evalúen los “requisitos analíticos” apropiados de la Etapa 1. La decisión más difícil es la relativa al “rendimiento diagnóstico” de la Etapa 2. Para facilitar dicha decisión, en primer lugar la prueba original (de referencia) debe compararse con la prueba modificada (candidata) en un ensayo controlado en el que se empleará un conjunto definido de muestras diagnósticas positivas y negativas. Véase la Directriz de la OIE sobre Validación 3.6.8 (una vez disponible: véase la nota 7 a pie de página) para una descripción de la evaluación de la comparabilidad. Si la evaluación de la comparabilidad no sugiere un cambio en el rendimiento diagnóstico, la prueba modificada se puede pasar a la fase de uso sistemático. Si, por el contrario, se observan diferencias en la DSp y la DSe, para adoptar la prueba modificada se requerirá otra Etapa 2 o una validación sobre el terreno.

5.2.3. Reposición de reactivos agotados

Cuando un reactivo, como una muestra control o un estándar de trabajo, está a punto de agotarse, es fundamental preparar y analizar repetidamente un reactivo de repuesto antes de que aquellos se agoten. La futura muestra control debe incluirse en múltiples ejecuciones de la prueba paralelamente con el control original para establecer su relación de proporcionalidad. Siempre que sea posible, es importante cambiar cada vez solamente un reactivo para evitar agravar el problema al tener que evaluar más de una variable.

5.3 Mejora de la confianza en los criterios de validación

Dado que muchas de las variables del hospedador influyen en el rendimiento diagnóstico de las pruebas, es muy deseable aumentar con el tiempo el número de muestras de referencia o de muestras adecuadas para un análisis de clases latentes. El diseño de la obtención, recogida, transporte y entorno en el que se analicen nuevas muestras deben ser los mismos que los aplicados al estudio de validación inicial. Al aumentar el número de muestras mejora la precisión de las estimaciones globales de la DSe y la DSp, y puede permitir cálculos de las estimaciones de la DSe mediante factores como la edad, el estadio de la enfermedad y la carga de microorganismos. Deben incluirse nuevos datos cada año en los dossiers de pruebas correspondientes.

5.4. Verificación de pruebas existentes (validación interna)

Si un laboratorio está planteándose utilizar un kit comercial validado o una prueba candidata en base a la bibliografía publicada sobre datos de validación, será preciso algún tipo de verificación para determinar si dicha prueba cumple con lo afirmado por el fabricante o el autor respecto a los criterios de validación de la Etapa 1 y en el contexto de la aplicación pretendida. Ello puede requerir una verificación reducida tanto de la ASp como de la ASe empleando materiales de referencia de los que se disponga, tanto si se han adquirido fuera como dentro de la población en estudio. Una vez el laboratorio está seguro de que la prueba, desde el punto de vista analítico, está rindiendo como se ha descrito, para que pueda pasar a utilizarla de forma sistemática deberá plantearse el pasar antes por una Etapa 2 reducida en el contexto de la aplicación pretendida y de la población en estudio.

BIBLIOGRAFÍA

BRANSCUM A.J., GARDNER I.A. & JOHNSON W.O. (2005). Estimation of diagnostic-test sensitivity and specificity through Bayesian modelling. *Prev. Vet. Med.*, **68**, 145–163.

CROWTHER J.R., UNGER H. & VILJOEN G.J. (2006). Aspects of kit validation for tests used for the diagnosis and surveillance of livestock diseases: producer and end-user responsibilities. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **25** (3), 913–935.

DEJAEGER B. & VANDER HEYDEN Y. (2006). Robustness tests. *LCGC Europe*, **19** (7), online at <http://www.lcgeurope.com/lcgeurope/content/printContentPopup.jsp?id=357956>

- Enøe C., GEORGIADIS M.P. & JOHNSON W.O. (2000). Estimating the sensitivity and specificity of diagnostic tests and disease prevalence when the true disease state is unknown. *Prev. Vet. Med.*, **45**, 61–81.
- FINDLAY J.W.A. & DILLARD R.F. (2007). Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays. *AAPS J.*, **9** (2), E260-E267. (Also on-line as *AAPS Journal* [2007]; **9** [2], Article 29 [<http://www.aapsj.org>]).
- GEORGIADIS M., JOHNSON, W., GARDNER I. & SINGH R. (2003). Correlation-adjusted estimation of sensitivity and specificity of two diagnostic tests. *Appl. Statist.*, **52** (Part 1), 63–76.
- GREINER M., SOHR D. & Göbel P. (1995). A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. *J. Immunol. Methods*, **185**, 123–132.
- GREINER M., PFEIFFER D. & SMITH R.D. (2000). Principles and practical application of the receiver operating characteristic (ROC) analysis for diagnostic tests. *Vet. Prev. Med.*, **45**, 23–41.
- HUI S.L. & WALTER S.D. (1980). Estimating the error rates of diagnostic tests. *Biometrics*, **36**, 167–171.
- JACOBSON R.H. (1998). Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **17**, 469–486.
- VESSMAN J., STEFAN R., VAN STADEN J., DANZER K., LINDNER W., BURNS D., FAJGELJ A. & MULLER H. (2001). Selectivity in analytical chemistry. *Pure Appl. Chem.*, **73** (8), 1381–1386.
- WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) (2008). OIE Standard for Management and Technical Requirements for Laboratories Conducting Tests for Infectious Diseases. *In*: OIE Quality Standard and Guidelines for Veterinary Laboratories: Infectious Diseases. OIE, Paris, France, 1–31.
- ZWEIG M.H. & CAMPBELL G. (1993). Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin. Chem.*, **39**, 561–577.

*
* *

CAPÍTULO 1.1.3.

MÉTODOS DE DESINFECCIÓN DE LOS ESTABLECIMIENTOS DE ACUICULTURA

1. Principios generales

En los establecimientos de acuicultura, la desinfección se emplea como herramienta frecuente de tratamiento contra las enfermedades. Puede utilizarse como práctica sistemática en programas de bioseguridad diseñados para excluir enfermedades específicas, así como medida sanitaria habitual empleada para reducir la incidencia de una enfermedad en las piscifactorías, y también en los intentos de erradicación de enfermedades (sacrificio sanitario). El motivo concreto de desinfección determinará qué estrategia de desinfección escoger y cómo aplicarla.

Los principios generales relativos a la desinfección de establecimientos de acuicultura implican la aplicación de tratamientos químicos a concentraciones suficientes, y durante periodos suficientes, como para matar todos los microorganismos patógenos que, de lo contrario, llegarían a sistemas de agua circundantes. Dado que la toxicidad inherente a los desinfectantes impide que puedan ser utilizados de forma segura en aguas abiertas, así como en sistemas de aguas abiertas, solo puede aplicarse desinfección de forma razonable a viveros y a las instalaciones de viveros y de estanques. Además, dado que en ciertos establecimientos de acuicultura en general se utiliza agua marina, los compuestos producidos durante la desinfección de estas aguas (oxidantes residuales) también deben desecharse con cuidado.

En este capítulo se ofrece una visión general de los métodos de desinfección, pero es importante recordar que existen otros métodos alternativos. Consúltense los capítulos correspondientes de este *Manual Acuático* para conocer los métodos concretos, en el caso de que existan.

La elección de los procedimientos de desinfección depende del tamaño, el tipo y la naturaleza de los materiales e instalaciones que hay que desinfectar, así como de los productos de uso legal disponibles en cada país. Las superficies a desinfectar constan de tejidos o materiales entretejidos (vestidos, redes), superficies duras (plástico, cemento) o materiales permeables (tierra, grava). La desinfección es más difícil en el caso de las superficies permeables y requiere más tiempo.

Puesto que la presencia de materia orgánica reduce la capacidad de desinfección de la mayoría de desinfectantes, en estos casos se recomienda filtrar el agua. Además, todas las superficies deben lavarse a fondo antes de desinfectarlas. El detergente utilizado debe ser compatible con el desinfectante y ambos deben ser compatibles con la superficie que se esté tratando (por ejemplo, las soluciones yodadas en general son ácidas, de modo que no se pueden utilizar sobre cemento, que es alcalino). Es necesario asegurarse de que los residuos producidos durante el lavado sean desinfectados antes de ser eliminados. Es necesario cubrir por completo las superficies (por ejemplo, utilizando un spray de alta presión o empapándolas).

Deben establecerse cuáles serán los procedimientos de desinfección, y deben utilizarse de acuerdo con los objetivos de desinfección y con todos los riesgos identificados. Los animales acuáticos enfermos, los líquidos y tejidos de los animales (como vísceras, sangre, moco o heces), y su contacto con el equipo y los trabajadores suponen un riesgo de transmisión de agentes patógenos que podrían terminar infectando poblaciones de animales acuáticos sanas.

Los protocolos básicos de desinfección consisten en extraer todos los animales acuáticos (tanto vivos como muertos) de la instalación, aplicar un programa de limpieza que esté diseñado para eliminar toda la materia orgánica restante adherida a las superficies, utilizar desinfectantes en el equipo y las instalaciones, y por último, aplicar una neutralización utilizando productos químicos.

Al extraer animales acuáticos de las instalaciones antes de la desinfección, el vertido directo de poblaciones enfermas de animales acuáticos de cualquier fase de vida o edad a aguas receptoras es una práctica peligrosa que facilita la propagación de enfermedades de poblaciones de piscifactoría a poblaciones salvajes, o a piscifactorías vecinas que utilicen agua de la misma procedencia. Este vertido no debe permitirse. Cuando se tome la decisión de desechar una población debido a la presencia de enfermedad, la población debe extraerse o sacrificarse por medios humanitarios. En el caso de establecimientos de acuicultura en tierra, el tanque, el canal, el estanque, etc. deben desinfectarse antes de ser vaciados y de nuevo antes de ser repoblados.

Los procedimientos de lavado y desinfección deben incluir, como mínimo, las siguientes fases:

- a) Eliminación de residuos sólidos, etc., seguida de un prelavado,

- b) Limpieza y lavado a fondo,
- c) Desinfección,
- d) Aclarado.

Una persona técnicamente competente debe llevar a cabo un seguimiento exhaustivo del proceso, y deben mantenerse registros del mismo.

Es fundamental disponer de protección frente al contacto con sustancias peligrosas, como ropa protectora, mascarillas, protección ocular, etc., según corresponda.

Los desinfectantes deben guardarse de tal forma que no supongan un peligro directo ni indirecto para la salud animal ni humana, así como tampoco para el medio ambiente.

2. Aparición de enfermedades de la lista de la OIE

Cuando en una piscifactoría determinada aparece por primera vez una enfermedad de la lista de la OIE, o bien una enfermedad emergente importante pero que no esté en la lista (es decir, en una instalación de cuarentena), o bien en una zona o país que previamente se consideraban libres de dicha enfermedad, puede ser aconsejable, si no obligatorio, erradicar la enfermedad mediante la despoblación de la instalación y la aplicación de una profunda desinfección de toda la instalación o parte de la misma. Puede estar justificado un descanso de la instalación afectada durante un periodo definido de tiempo en ciertas situaciones (véase el Capítulo 4.4. Descanso de instalaciones de acuicultura, en el *Código Acuático*).

3. Prevención de la propagación de enfermedades a poblaciones salvajes

La eliminación directa de poblaciones enfermas de animales acuáticos (de cualquier edad; es decir, huevos fecundados o no, larvas, postlarvas, juveniles o adultos) o de productos residuales derivados de los mismos (es decir, residuos de plantas de procesamiento, como sangre, vísceras, caparazones, trozos rotos de camarones, etc.) a aguas receptoras (es decir, arroyos, ríos, estuarios, bahías, zonas litorales) es una práctica peligrosa que facilita la propagación de la enfermedad de poblaciones de piscifactoría a poblaciones de animales acuáticos salvajes a piscifactorías vecinas que utilicen agua de la misma procedencia, y debe prohibirse. En el caso de poblaciones de piscifactoría, cuando se toma la decisión de desechar una población (es decir, que se esté criando en un tanque de vivero o en un estanque de engorde) debido a la presencia de enfermedad (o a un mal rendimiento productivo, que puede deberse a una enfermedad no diagnosticada), la población del tanque o estanque debe extraerse y/o sacrificarse por medios humanitarios en el tanque o estanque. El agua del tanque o estanque debe desinfectarse antes de ser desechada. El tanque o estanque vacío debe desinfectarse antes de ser repoblado.

4. Higienización y bioseguridad sistemáticas

Muchos establecimientos de acuicultura, sobre todo aquellos en los que se crían las primeras fases de animales acuáticos, emplean medidas que aplican muchos métodos de desinfección para la prevención y control de las enfermedades. Estas medidas pueden formar parte de un programa de bioseguridad sistemático de la piscifactoría que puede estar diseñado para excluir enfermedades específicas, así como para servir de medidas generales de exclusión de plagas y enfermedades.

4.1. Desinfección de huevos y larvas

4.1.1. Directrices para la desinfección de huevos de peces

La desinfección de huevos con yodo es aplicable a distintas especies de peces, pero es más frecuente en huevos de peces de la familia Salmonidae (salmón, trucha y salvelino). Aunque en general es eficaz para la descontaminación de superficies de huevos embrionados y acabados de fecundar, el uso de desinfectantes, como los iodóforos, por sí mismo no es suficiente para prevenir la transmisión vertical de ciertos agentes patógenos bacterianos (como *Renibacterium salmoninarum*) o víricos (como el virus de la necrosis pancreática infecciosa) que pueden estar presentes en el huevo embrionado y acabado de fecundar.

4.1.2. Huevos embrionados de peces salmónidos

Existen varios protocolos que se utilizan normalmente para desinfectar huevos embrionados. En general, el pH de las soluciones del producto iodóforo debe ser de entre 6 y 8. A un pH de 6 o menos, la toxicidad de los huevos embrionados y acabados de fecundar aumenta, y a un pH de 8 o más, la eficacia de la desinfección disminuye. Por tanto, es fundamental controlar el pH, y deben añadirse al

agua 100 mg de NaHCO₃/ litro. Se recomienda que los huevos se laven en agua dulce limpia, o bien en agua salina al 0,9%, antes y después de la desinfección, y que se utilice una solución yodófora que contenga 100 ppm (partes por millón) de yodo libre en una solución salina al 0,9% sin materia orgánica, a modo de solución desinfectante. El tiempo de contacto para una solución yodófora de 100 ppm no debe ser inferior a los 10 minutos y la solución de utilizarse solo una vez.

4.1.3. Desinfección de huevos de salmónido acabados de fecundar mediante un proceso de endurecimiento del agua

Para la desinfección de huevos de salmónidos acabados de fecundar mediante un proceso de endurecimiento del agua con yodóforos, la concentración de yodo activo debe ser de 100 ppm. A continuación se describe un procedimiento para ello:

- Los huevos deben ser despojados y separados del líquido ovárico, lavados en solución salina al 0,9% (30-60 segundos), se les debe añadir esperma y se debe esperar 5-15 minutos para que tenga lugar la fecundación
- A continuación, los huevos deben enjuagarse en solución salina al 0,9% (30-60 segundos) para eliminar el exceso de esperma y otras sustancias orgánicas
- A continuación, los huevos deben lavarse en una solución de yodóforo de 100 ppm durante 1 minuto. Después, debe desecharse la solución y sustituirse por solución nueva de 100 ppm, y los huevos deben desinfectarse durante otros 30 minutos. Esta solución, y las soluciones de enjuagado, solo deben utilizarse una vez. La proporción de huevos respecto a solución de yodóforo debe ser, como mínimo, de 1:4
- Los huevos deben enjuagarse de nuevo en agua de vivero limpia o estéril durante 30-60 segundos
- El endurecimiento del agua debe terminar utilizando agua limpia.

Es importante que los huevos no sean fecundados en presencia de la solución yodófora, puesto que esta matará las células del esperma.

4.1.4. Huevos de otras especies de peces

En el caso de otras especies, deben llevarse a cabo pruebas preliminares para determinar en qué estadio del huevo y a qué concentración de yodóforo se puede llevar a cabo la desinfección de forma segura. La desinfección de huevos de especies marinas, como la platija, el bacalao o el mero, para los cuales están documentados varios efectos adversos de los yodóforos, pueden lograrse con glutaraldehído a una concentración de 400-600 mg/litro y un tiempo de contacto de 5-10 minutos. No obstante, esto no es eficaz contra los nodavirus, para los cuales se recomienda el uso de ozono a razón de 1 mg de O₃/ litro durante 30 segundos. Una concentración de ozono de 0,1-0,2 mg de O₃/litro durante 3 minutos también inactiva la mayoría de bacterias patógenas de los peces.

4.1.5. Límites de eficacia

La desinfección de huevos con yodóforos puede no ser siempre eficaz para prevenir la transmisión vertical del virus de la necrosis pancreática infecciosa, *Renibacterium salmoninarum* y el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa, para los cuales se desarrolló inicialmente este método. En algunos casos se ha demostrado la ineficacia de la desinfección con yodóforos mediante estudios epidemiológicos y pruebas de laboratorio.

4.1.6. Huevos y larvas de moluscos

La desinfección de huevos y estadios larvarios no se considera práctica en la mayoría de los sistemas de cultivo de moluscos. Además, existe poca información sobre procedimientos específicos de desinfección para agentes patógenos de moluscos (es decir, *Marteilia* spp., *Haplosporidium* spp., *Bonamia* spp., *Perkinsus* spp., iridovirus y niveles patógenos de microbios marinos) o agua marina. Por tanto, los desinfectantes y sus concentraciones se basan en la esterilización de agentes patógenos relacionados o de agua de mar. A los viveros pueden aplicarse tres fases de desinfección:

- a) pre-tratamiento del agua entrante, por ejemplo en los filtros (1,0 y 0,22 µm) o desinfección química para la protección de poblaciones de moluscos;
- b) tratamiento en las instalaciones (sobre todo en sistemas de reciclado) = protección de poblaciones de moluscos;
- c) tratamiento del agua saliente = protección del medioambiente.

4.1.7. Desinfección de huevos y larvas en viveros de camarones peneidos

Ciertas enfermedades víricas de los camarones peneidos (es decir, la baculovirus esférica, la baculovirus tetraédrica y la infección hepatopancreática por parvovirus) se transmiten por contaminación fecal de huevos desovados. Estas enfermedades, así como las infecciones debidas a ciertos virus de los camarones, como el virus de la enfermedad de las manchas blancas, y ciertos agentes patógenos bacterianos y fúngicos, pueden eliminarse o puede reducirse su incidencia mediante el uso sistemático de protocolos de desinfección cuando se aplican para desinfectar huevos de superficie y/o nauplias recién eclosionadas. Uno de los métodos más utilizados es el siguiente:

Para huevos fecundados¹

Se recogen huevos fecundados. Se enjuagan con agua marina corriente durante 1-2 minutos. Se sumergen los huevos por completo en 100 ppm de formalina durante 1 minuto. Se sumergen los huevos por completo en solución yodófora (0,1 ppm de yodo) durante 1 minuto. Se enjuagan en agua marina corriente durante 3-5 minutos. Se transfieren a tanques desinfectados de crecimiento de larvas.

Para las nauplias²

Utilizando la respuesta fototáctica, se recogen las nauplias con redes o mosquiteras. Se enjuagan con agua marina corriente durante 1-2 minutos. Se sumergen por completo las nauplias en 400 ppm de formalina durante 30-60 segundos. Se sumergen por completo las nauplias en solución yodófora (0,1 ppm de yodo) durante 1 minuto. Se lavan en agua marina corriente durante 3-5 minutos. Se transfieren a tanques desinfectados de crecimiento de larvas.

4.1.8. Precauciones

Al utilizar yodóforos deben aplicarse ciertas precauciones, puesto que los productos que se venden contienen cantidades variables de detergentes que pueden dar lugar a efectos tóxicos. Por tanto, se recomienda llevar a cabo pruebas preliminares con varios productos. Es aconsejable disponer de un stock del producto más satisfactorio, aunque debe tenerse en cuenta la fecha de caducidad. También es importante que todo producto químico que se utilice para la desinfección de huevos se utilice cumpliendo la normativa correspondiente de sanidad e inocuidad, así como de protección medioambiental del país donde se utilice. Por último, en el caso de los huevos que hayan sido transportados, el envase también deberá desinfectarse o, aun mejor, destruirse de tal forma que no suponga ningún riesgo de contaminación de agua ni un riesgo sanitario para otros peces en su destino final.

4.2. Material y equipo

Todo el equipo que se utilice para la alimentación, limpieza y retirada de animales acuáticos muertos debe ser exclusivo para cada unidad de cultivo.

Los recipientes donde se manipule el alimento en cada unidad deberán ser distintos de los que se utilicen para la recogida de peces muertos y deben lavarse y desinfectarse a fondo, siguiendo los protocolos establecidos, según se requiera, con los productos autorizados.

La maquinaria utilizada en un establecimiento de acuicultura nunca debe ser transportada a otro establecimiento de acuicultura, a no ser que el segundo no contenga animales acuáticos. Solo en casos excepcionales se permite transportar maquinaria, y solo después de haber sido lavada y desinfectada con productos autorizados.

El resto de maquinaria utilizada debe lavarse y desinfectarse con productos autorizados antes de entrar y de salir de la piscifactoría.

En el caso de los establecimientos de acuicultura situados en el mar, las redes nunca deben pasarse de un establecimiento de acuicultura a otro, por mucho que hayan sido lavadas y desinfectadas.

En el caso de los módulos, los espacios de cría flotantes y los sistemas automáticos de alimentación, deben lavarse y desinfectarse antes de cambiar de unidad. En el caso de las instalaciones de agua dulce, estos nunca deben pasarse de un establecimiento de acuicultura a otro.

¹ Los huevos fecundados son más sensibles a la formalina que las nauplias.

² En los viveros, las nauplias son mucho más fáciles de recoger que los huevos fecundados.

4.3. Redes

Todas las redes deben lavarse en cuanto se extraen del agua. Las redes que no han sido lavadas tras haber sido sumergidas en una masa de agua no deben volver a sumergirse en otra masa de agua. Una vez la red se ha extraído del agua, debe transferirse cuanto antes al punto de lavado de redes, lo cual evitará que contamine otras redes, equipo o zonas de trabajo. La transferencia de redes desde y hacia los puntos de lavado debe realizarse utilizando compartimientos o envoltorios impermeables adecuados, para prevenir una posible contaminación cruzada.

Las piscifactorías que precisen servicios de lavado e impregnado final de las redes con productos anti-óxido deben contratar servicios autorizados de limpieza de redes y compartimientos, cuando existan.

El proceso de lavado debe garantizar la eliminación de todos los elementos que se adhieran a las redes, como huevos y/o larvas de parásitos, moluscos, equinodermos, algas, materia orgánica, etc.

4.4. Vehículos

En cuanto a los vehículos, el responsable del establecimiento de acuicultura (o la persona designada por él o ella) debe garantizar que se cumplan los siguientes requisitos:

- solo los vehículos que sirven al establecimiento de acuicultura deben poder acceder a las zonas de producción o de tránsito, y pueden entrar en estas zonas solo para un determinado fin; los vehículos de servicios temporales, los de visitantes o los de los trabajadores no deben poder acceder a estas zonas,
- todos los vehículos que entren en las zonas de producción o de tránsito, sin excepción, deben desinfectarse cuando entren y cuando salgan del establecimiento de acuicultura, utilizando productos autorizados para ese fin,
- el responsable del establecimiento de acuicultura (o la persona designada por él o ella) debe exigir un “certificado de desinfección” o documento similar a todo vehículo de transporte que solicite el acceso a las unidades de producción. El certificado debe confirmar que los tanques del vehículo en los que se cargarán los animales acuáticos han sido desinfectados,
- toda persona que entre con un vehículo debe seguir los protocolos de desinfección establecidos para el establecimiento de acuicultura,
- los vehículos y contenedores que sirvan a más de un centro deben desinfectarse al salir de cada centro visitado, y debe exigirse periódicamente el “certificado de desinfección” o un documento similar que acredite el procedimiento,
- debe mantenerse un registro de todos los vehículos que entran en las instalaciones de la piscifactoría o zonas de tránsito. El registro deberá contener al menos la fecha, la hora, la empresa, el motivo de la visita, el nombre del conductor y el último centro visitado,
- No deben entrar en las instalaciones vehículos de distintos servicios a la vez, sobre todo en el caso de los vehículos que se utilicen para recoger animales acuáticos muertos (“camiones de animales muertos”).

Al escoger los productos y procedimientos deben tenerse en cuenta los siguientes aspectos:

- la eficacia de los detergentes y desinfectantes en los distintos tipos de materiales y superficies,
- la ubicación de las zonas o cosas a desinfectar dentro de la piscifactoría,
- la recomendación del fabricante en cuanto al detergente y/o desinfectante, y otras variables que puedan ser relevantes para el tipo y nivel de contaminación que pueda haber en la superficie.

4.5. Personal

Antes de entrar en una zona de producción, todo el personal debe ponerse su indumentaria protectora (por ejemplo, mono, bata, guantes, botas, delantal); a continuación, deben desinfectarse botas y manos. Debe estar estrictamente prohibido entrar en la zona sin la indumentaria protectora autorizada.

Nadie puede salir de las instalaciones sin haberse quitado la indumentaria de trabajo, por mucho que hayan pasado por la barrera sanitaria y se hayan desinfectado calzado y manos.

4.6. Tuberías y tanques

Es muy recomendable desinfectar de forma sistemática tuberías y tanques; la frecuencia de desinfección variará en función de la frecuencia de renovación de las poblaciones de animales acuáticos. Cuando hay una alta concentración de animales acuáticos, estas deben rotarse entre tanques desinfectados con tanta frecuencia como resulte práctico y/o mantenerse en agua que haya sido desinfectada con ozono o cloro y posteriormente neutralizada. Cada nuevo lote de animales acuáticos introducido en una instalación debe colocarse en unidades previamente desinfectadas.

Para la higienización sistemática, deben limpiarse, desinfectarse y secarse entre usos los viveros y los tanques de reproductores (es decir, los tanques de maduración de reproductores, de apareamiento, de desovado, de crecimiento de larvas y los precriaderos internos). Los tanques que se utilizan para los fines mencionados suelen ser tanques prefabricados de fibra de vidrio, o bien contruidos con cemento o madera y recubiertos o pintados con recubrimientos a base de resina (como epoxi o resina de fibra de vidrio), o bien revestidos internamente con capas de plástico fabricadas para este fin. Tras extraer la población del tanque, se retira todo el material suelto y de gran tamaño, como detritos orgánicos tipo algas, heces y restos de alimento. En el caso de los tanques relativamente pequeños, es aconsejable, tras retirar los peces, llenar el tanque al máximo, sumergir todo el equipo no poroso resistente a la corrosión (como líneas de aire, boyas, conductos, redes, recipientes de muestreo, etc.) en el tanque (véase también el apartado 4.11.iii), y a continuación añadir hipoclorito de calcio para conseguir un mínimo de 200 ppm de cloro libre. Debe dejarse sumergido durante toda la noche. Tras haber estado empapado en cloro durante el tiempo suficiente, el tanque se puede vaciar y enjuagar con agua clara. Antes de vaciar el sistema, el agua tratada deberá declararse, a no ser que se disponga de sistemas de recogida y tratamiento de aguas. Una vez el tanque ha sido enjuagado, debe dejarse secar por completo. En el caso de tanques grandes, debe aplicarse un lavado inicial para eliminar detritos sueltos, seguido de una desinfección con una solución concentrada (~1600 ppm de cloro) de hipoclorito de calcio. A continuación, debe aplicarse un spray de esta solución de cloro a todas las superficies, tanto internas como externas. Después, se debe dejar reposar el tanque varias horas antes de enjuagarlo, llenarlo y nivelarlo. El siguiente paso es cepillar las superficies para eliminar todo resto de material. Tras la desinfección con cloro, los tanques, pequeños o grandes, deben enjuagarse con agua clara, y después llenarse y nivelarse para asegurar que no quedan restos de cloro antes de poblarlo.

Como alternativa, las instalaciones de acuicultura con recirculación de agua, canales de cemento y todos los tanques no porosos pueden desinfectarse utilizando una solución de hidróxido de sodio y detergente biodegradable (por ejemplo, Teepol®³). Todas las superficies de los tanques deben lavarse a fondo con agua a presión o vapor para eliminar los restos orgánicos, y a continuación las superficies deben tratarse con spray de una solución de hidróxido de sodio al 1% que contenga un 0,1% de Teepol, a razón de 2,5 litros por metro cuadrado de superficie de tanque. En cuanto a las superficies húmedas, tras drenar la solución deben permanecer a un pH superior a 12. El agua residual que pueda quedar en el fondo de los tanques debe tratarse para elevar su pH a un valor superior a 12 durante un periodo de 24 horas. Una vez se hayan secado las superficies de los tanques se, pueden enjuagarse y los tanques pueden volver a llenarse. En las instalaciones de acuicultura con re-circulación de agua, las tuberías y tanques de filtros pueden desinfectarse con la misma solución de desinfectante. Tras el drenaje y la limpieza del sistema, lo habitual es que se llene con la solución un tanque de reserva del volumen suficiente como para llenar todo el sistema de tuberías, y que a continuación se bombee a todo el sistema durante 24 horas. El pH de la solución debe permanecer por encima de 12 al final de este periodo. La solución del tanque de reserva puede utilizarse para desinfectar todo el material de filtro, previamente lavado a fondo, los filtros y equipo auxiliar, como redes, cubos y pequeños tanques. Todo ello debe sumergirse de nuevo en la solución y dejarse ahí 24 horas. Tras la desinfección, todos los tanques y equipo deben enjuagarse bien y el sistema de recirculación debe irrigarse a fondo antes de volver a ser llenado. Cuando sea necesario, puede neutralizarse un gran volumen de la solución desinfectante mediante ácido clorhídrico antes de eliminarla. Toda persona que aplique o pueda contactar con la solución desinfectante deberá llevar indumentaria adecuada de protección ocular y cutánea.

También se recomienda secar al aire o por calor las tuberías (a diario) y los tanques y otro equipamiento (como garrafones de cultivo de algas), además de desinfectar sus superficies (sobre todo en el caso de brotes de enfermedades de etiología indefinida).

- a) El cloro se suele aplicar en forma de hipoclorito de sodio (como HTH®, Chlorox®, lejía doméstica, etc.). se llenan todas las tuberías con 50 mg de cloro/litro (=50 ppm). Se deja que actúe durante al menos 50

3 La referencia a productos comerciales concretos a modo de ejemplos no implica su aprobación por parte de la OIE. Esto es aplicable a todos los productos comerciales mencionados en este *Manual Acuático*.

minutos antes de nivelar con agua clara. Esta solución es eficaz contra la mayoría de agentes microbianos. El agua clorada debe neutralizarse antes de abandonar la instalación. La neutralización óptima se logra pasando carbón activado (elimina el exceso de cloro y de cloraminas). También pueden utilizarse agentes reductores, como tiosulfato de sodio (véase un ejemplo de uso en el apartado 5.2.1) o la aireación, aunque no elimina cloraminas tóxicas.

- b) Los iodóforos en general se aplican en forma de soluciones alcalinas (como Wescodyne® o Betadine®) a razón de 200-500 mg de yodo/litro (ppm) con un tiempo de contacto de al menos 10 minutos.

NOTA: Los iodóforos no son eficaces contra ciertos protozoos en suspensión; así, por ejemplo, *Labyrinthuloides halotidis*, en el abulón, tolera más de 1000 mg de yodo/litro. Los iodóforos pueden ser eficaces contra parásitos protozoarios tras el secado de superficies de tanques y de tuberías al aire o por calor.

4.7. Desinfección del agua entrante

Dado que varias de las enfermedades de los animales acuáticos que aparecen en el *Código Acuático*, así como otras varias enfermedades importantes, pueden ser introducidas en piscifactorías con el agua entrante cuando esta contiene vectores o portadores (como larvas de cangrejo o de camarón o peces salvajes infectados, etc.), algunas piscifactorías aplican planes de bioseguridad que incluyen provisiones para la desinfección del agua entrante. Esto puede conseguirse de distintas formas, que pueden incluir uno o varios de los siguientes procedimientos:

- a) Para la filtración del agua entrante, el agua entrante se bombea hacia un canal de suministro/sedimentación donde en primer lugar pasa por unos filtros de poro grande para retener los animales y detritos acuáticos más grandes. A continuación, el agua pasa por una serie de filtros de poros cada vez más pequeños, y se consigue el filtrado final pasando el agua entrante por una malla fina (150-250 µm de poro) antes de introducirla en un estanque de cultivo o un depósito de reserva.
- b) En lugar de utilizar redes de malla, algunas piscifactorías instalan estructuras de filtrado en el canal de suministro. Una serie de compartimientos dentro de estas estructuras se llenan de matrices de filtro, que empiezan con un poro grande para eliminar inicialmente los animales y detritos acuáticos más grandes, una parte intermedia que contiene una matriz de poro más pequeño para eliminar arena y gravilla, y la parte final que retiene arena fina.
- c) Para la cloración y declorado, el agua entrante es bombeada hacia un canal de suministro o directamente a los estanques de cultivo o depósitos de reserva (con o sin filtrado) y tratada con cloro suficiente como para matar todo posible vector o portador que contenga el agua entrante.
- d) Intercambio de agua “cero” o muy bajo: Algunas piscifactorías utilizan una aireación y re-circulación suplementaria del agua en los estanques de cultivo y dentro de los sistemas de suministro y descarga de una piscifactoría de camarones para reducir las necesidades de agua entrante. Esto reduce el volumen de agua entrante que tiene que ser desinfectada antes de su uso, y también reduce la pérdida de nutrientes de las piscifactorías, que se van con el agua saliente.

4.8. Desinfección del agua saliente

- a) Se ha utilizado ozono con éxito en el control del contenido microbiano del agua saliente de instalaciones de cuarentena. Los compuestos residuales, formados como consecuencia de la interacción del ozono con el agua de mar (oxidantes residuales), a niveles de 0,08–1,0 mg litro⁻¹ se consideran suficientes para reducir significativamente los microbios vivos (principalmente bacterias).

NOTA: La medición del ozono residual en agua de mar es problemática debido a la rápida y continua formación de productos oxidantes en la misma. Los residuos formados entre el ozono y el agua de mar (hipobromito, bromo o ácido hipobromico) son tóxicos para los primeros estadios de los animales acuáticos y deben eliminarse utilizando un filtro de carbón antes de pasar por una instalación de moluscos, o de salir de ella. Para completar la esterilización puede ser necesario el tratamiento del agua marina con luz UV post-ozonación, por ejemplo en instalaciones de cuarentena.

- b) El cloro administrado en forma de hipoclorito de sodio a una concentración de 25 mg de cloro/litro es eficaz contra ciertos protozoos (*L. halotidis*). Sin embargo, se recomiendan 50 mg de cloro por litro para una completa esterilización microbiana, aunque pueden utilizarse concentraciones más altas en ciertas condiciones (como en casos de cuarentena). No obstante, estas mayores concentraciones requieren tratamientos de neutralización proporcionalmente mayores y sistemas de salida de gases para eliminar los humos tóxicos producidos.

- c) Los iodóforos no son tan eficaces como los dos tratamientos anteriores para matar protozoos.

4.9. Desinfección de tanques grandes o lagos

La desinfección de estanques grandes con fondo de tierra, o bien de pequeños lagos (como instalaciones o piscifactorías donde se críen carpas) para la erradicación de agentes patógenos (como el VVPC –virus de la viremia primaveral de la carpa-) puede ser problemática debido a su tamaño y al volumen de agua dulce que contienen. No obstante, los fondos de tierra, cuando cuentan con drenajes suficientes y seguros, pueden tratarse con cal (en el apartado 5.1.2 se explica un ejemplo de método y de dosis).

4.10. Instalaciones

La pauta de desinfección que se utilice debe ser específica de las instalaciones en cuestión y debe basarse en el tipo de uso que se haga de las mismas.

- i) *Oficinas:* en estas instalaciones solo suele haber tránsito de calzado de personas que han estado en instalaciones contaminadas o zonas de cultivo. Por tanto, el principal foco de atención deben ser los suelos y las unidades de almacenaje frías de la instalación. Los suelos deben lavarse a fondo (si no son porosos) con detergentes y soluciones de lavado estándar, y a continuación deben dejarse secar por completo. Si los suelos están enmoquetados, debe pasarse la aspiradora y deben limpiarse con un detergente adecuado para moqueta, o bien limpiarse con vapor. En todas las demás zonas de estas instalaciones, como paredes, lavabos, mesas de despacho, neveras, congeladores, etc. debe comprobarse si contienen materiales potencialmente contaminados (como camarones congelados en los congeladores) y todo material de este tipo que se encuentre, así como su recipiente, debe limpiarse y desinfectarse o desecharse de forma sanitaria.
- ii) *Instalaciones de cultivo:* debe suponerse que estas instalaciones han estado en contacto directo con los agentes patógenos y, por tanto, deben tratarse de un modo distinto que las oficinas. La pauta de desinfección de estas instalaciones consistirá en dos pasos. En primer lugar, se barrerá bien y/o aspirará (cuando corresponda) para eliminar tantos detritus orgánicos e inorgánicos de gran tamaño como sea posible. A continuación, se lavará con solución detergente, y finalmente, como tercer paso, se tratará con cloro. Debe aplicarse una solución clorada (~1600 ppm), mediante spray, a todas las superficies que no puedan resultar corroídas por el cloro. Las superficies que no se puedan clorar, pueden ser empapadas en primer lugar con una solución de iodóforo que contenga un mínimo de 200 ppm de yodo, y cubrirse después con plástico o cualquier otro material protector. Los suelos se pueden empapar de cloro aplicando una capa de 5 cm profundidad de una solución de 200 ppm de cloro. Esta deberá dejarse actuar durante un mínimo de 48 horas. Si cualquiera de las superficies a las que se ha aplicado spray es susceptible a la corrosión por el cloro, puede enjuagarse con agua dulce tras el tratamiento de 48 horas.

En instalaciones donde la desinfección con cloro no es aplicable, debe plantearse la posibilidad de fumigar con gas de formaldehído. NOTA: es un método potencialmente peligroso y deben aplicarse procedimientos y normas de seguridad adecuados. Tras una limpieza general, puede iniciarse la fumigación de las instalaciones que puedan cerrarse herméticamente. El total del proceso, desde el momento en que la instalación se gasifica por primera vez hasta que puede ocuparse de nuevo, debe durar un máximo de 30-60 horas. La instalación debe estar totalmente cerrada durante la fumigación real, y el gas no debe poder escapar de ningún modo una vez aplicado. Si es posible, debe cortarse el suministro eléctrico. El ambiente necesario para la desinfección con gas de formaldehído es una temperatura mínima de 18°C con una alta humedad relativa (es mejor a nivel de saturación, es decir, los suelos deben estar húmedos, etc.). La generación de gas de formaldehído se consigue añadiendo 17,5 g de permanganato de potasio a cada 35 ml de formalina al 100% (una solución acuosa de gas formaldehído al 37%-39%) por cada 2,83 m³ de superficie. Lo ideal es que cada sala de la instalación disponga de su propia fuente de gas de formaldehído para garantizar que todas las zonas de la misma queden tratadas uniformemente. Debe pesarse la cantidad correcta de cada componente (permanganato de potasio y formalina) en recipientes independientes, y la formalina debe colocarse en un recipiente que no sea de plástico y cuyo volumen sea al menos 10 veces el volumen combinado de la formalina más el permanganato de potasio. (La persona que aplique el gas de formaldehído debe llevar indumentaria impermeable para protegerse la piel, así como una máscara de gas a prueba de formaldehído, y unas gafas o visera protectoras, todo ello reglamentario). A continuación, deben colocarse los recipientes con las cantidades correctas de los dos reactivos en el suelo, en el centro de la sala, sobre una gran estera protectora (de plástico) desechable. En este momento todavía no debe mezclarse la formalina con el permanganato de potasio. Una vez todas las salas dispongan de las cantidades adecuadas de los dos componentes, la instalación se haya cerrado por completo y el ambiente se haya modificado según corresponda, puede empezar la verdadera fumigación. La mezcla de ambos componentes debe llevarse a cabo muy rápidamente y con cuidado, puesto que la reacción es inmediata y algo violenta cuando se

emite gas de formaldehído. Se debe empezar en la sala más alejada de la puerta exterior, añadir el permanganato a la formalina y seguir con la siguiente sala. Una vez terminadas todas las salas, se cierra la puerta exterior y se aísla del exterior con cinta adhesiva. La instalación debe permanecer sellada durante un mínimo de 12 horas. Una vez terminado este periodo de desinfección, la instalación debe abrirse para que se ventile con aire fresco, durante 24-48 horas. Para que puedan volver a entrar personas no debe quedar olor detectable a formaldehído.

Un método alternativo para generar gas de formaldehído es la sublimación de paraformaldehído en polvo. Por cada 2,83 m³ de superficie, deben utilizarse unos 28 g de paraformaldehído. Puede sublimarse colocándolo en una sartén eléctrica, que se habrá calentado intensamente. Este procedimiento es algo más peligroso, porque el formaldehído es inflamable y una chispa de este dispositivo de calentamiento teóricamente podría inflamar el gas. Al utilizar paraformaldehído también deben aplicarse los procedimientos indicados anteriormente para la mezcla de formalina/permanganato en cuanto a salida de humos, etc.

- iii) *Instalaciones de procesamiento:* estas instalaciones se suelen construir para permitir una desinfección sistemática. Normalmente, los procedimientos permitidos en el funcionamiento diario de estas instalaciones son adecuados para una limpieza total (TCU), siempre que la instalación, sus salas frías y sus congeladores también se desinfecten y se sequen por completo. Si se considera necesario, puede llevarse a cabo una fumigación con formaldehído para garantizar la destrucción de los agentes patógenos preocupantes.
- iv) *Otras instalaciones:* las instalaciones como almacenes de alimento, naves de mantenimiento, salas de herramientas, etc. deben tratarse igual que las oficinas. Debe procurarse eliminar todos los detritos de gran tamaño, que en estos tipos de instalaciones normalmente son bastante abundantes. A continuación, debe aplicarse spray clorado a las superficies potencialmente contaminadas de estas instalaciones, y dejar que actúe durante 24-48 horas. Después se aplicará un enjuagado con agua dulce. Todo el equipo, que no debe estar expuesto a la acción corrosiva del cloro, debe extraerse antes de aplicar el spray, y debe desinfectarse mediante desinfección de superficie con una solución yodófora que contenga 200 ppm de yodo. Una vez desinfectado, el equipo puede volver a introducirse en la instalación. Otra opción para este tipo de instalaciones es la fumigación con gas de formaldehído.

4.11. Indumentaria y equipo

Para que la desinfección sea la adecuada, antes deben lavarse las superficies con detergente y desinfectantes.

- a) Pueden utilizarse yodóforos (como Wescodyne® o Betadine®) a razón de 200–250 mg yodo litro⁻¹ en forma de pediluvio. NOTA: Los yodóforos tiñen la ropa.
- b) El cloro (solución de lejía doméstica a 50 mg de cloro litro⁻¹) también es una opción para los pediluvios o para lavar la ropa.
- c) El hidróxido de sodio (NaOH al 1% + Teepol al 0,1% u otro detergente) constituye un eficaz pediluvio para botas de goma. NOTA: NO debe utilizarse para zapatos/botas de vestir. También puede utilizarse para la desinfección de instalaciones de viveros, instalaciones de acuicultura con re-circulación de agua, sistemas de canales de cemento y todos los tanques no porosos. Todas las superficies de los tanques deben lavarse a fondo con agua a presión o vapor para eliminar los restos orgánicos, y a continuación debe aplicarse spray con una solución de hidróxido de sodio al 1% que contenga un 0,1% de Teepol, a razón de 2,5 litros por metro cuadrado de superficie de tanque. La superficie húmeda de los tanques, tras el drenaje de la solución, debe permanecer a un pH superior a 12. El agua residual que pueda quedar en la base de los tanques debe tratarse para aumentar el pH por encima de 12 durante un periodo de 24 horas. Una vez las superficies de los tanques se han secado, pueden enjuagarse, y los tanques pueden volver a llenarse. En las instalaciones de acuicultura con re-circulación de agua, la desinfección del sistema de tuberías y tanques con filtros debe llevarse a cabo con la misma solución de desinfectante. Lo habitual, tras el drenaje y limpieza del sistema, es llenar con la solución un tanque de reserva, que tenga el volumen suficiente como para llenar todo el sistema de tuberías, que a continuación se bombeará a todo el sistema durante 24 horas. El pH de la solución debe permanecer por encima de 12 al final de este periodo. La solución de reserva puede utilizarse para desinfectar todo el material de filtro, previamente lavado a fondo, los filtros y material auxiliar, como redes, cubos y pequeños tanques. Todo ello se debe sumergir de nuevo en la solución y dejarse ahí 24 horas. Tras la desinfección, todos los tanques y equipo debe enjuagarse bien y el sistema de circulación debe irrigarse a fondo antes de volver a ser llenarlo. Cuando sea necesario, puede llevarse a cabo una neutralización con un gran volumen de solución desinfectante antes de la eliminación, utilizando ácido clorhídrico. Toda persona que aplique o que entre en contacto con la solución desinfectante deberá llevar protección ocular y cutánea adecuada.

4.12. Equipo y sistemas de apoyo de los cultivos de crustáceos

Se trata de unidades de funcionamiento de una piscifactoría de cultivo de camarones que puede albergar una instalación.

- i) *Sistemas para artemias*: todas las unidades y tanques de decapsulación y eclosión de quistes de *Artemia* deben tratarse de la misma forma que otros tanques. Deben lavarse para eliminar los restos orgánicos más grandes, llenarse hasta el tope con agua limpia y después añadir hipoclorito de calcio hasta lograr una concentración final de 200 ppm (cloro libre). La cloración debe dejarse actuar durante 24-48 horas. La parte externa de estos tanques puede clorarse mediante spray (1600 ppm de cloro). A continuación, los tanques tratados pueden declararse con tiosulfato de sodio, drenarse, enjuagarse con agua dulce y dejarse secar durante un mínimo de una semana. Los recipientes de quistes de *Artemia* de la instalación no abiertos pueden conservarse. No obstante, debe desinfectarse su superficie con cloro (200 ppm) o una solución yodófora (200 ppm).
- ii) *Sistemas para algas*: los recipientes, tanques, incubadoras y salas utilizados para producir algas para alimentar los estadios larvarios de camarones pueden manipularse y desinfectarse casi de la misma forma que otros sistemas de tanques. La única gran diferencia es que debe tenerse especial cuidado de que todo residuo de cloro se haya eliminado de las unidades antes de que estas se utilicen de nuevo. En el caso de los tubos, frascos y garrafones utilizados para el cultivo de algas, puede utilizarse una combinación de un enjuagado ácido (HCl al 10%) o esterilización con vapor en lugar de una desinfección con cloro o solución yodófora.

No se pueden desinfectar cultivos madre de algas vivas. La utilización de dicha desinfección es incuestionable, puesto que todo compuesto que pudiera matar el agente patógeno también mataría a las algas. Así pues, se han desarrollado dos métodos principales de minimización de la probabilidad de que los cultivos madre contengan agentes patógenos:

- Dilución: todos los cultivos madre pueden clonarse a partir de las poblaciones existentes. Cada cultivo debe diluirse mediante diluciones seriadas (en el caso de los cultivos de caldo) o bien mediante siembra de colonias (en el caso de los cultivos de agar). Todas las diluciones deben llevarse a cabo aplicando técnicas de estricta asepsia, esterilizando en autoclave todos los medios. No deben realizarse a partir de los cultivos madre hasta que la sala de cultivo de algas haya sido desinfectada mediante los procedimientos anteriormente descritos. Una vez un cultivo ha sido diluido y clonado por uno de los dos métodos anteriores, hasta el punto de que solo quede una célula del cultivo madre, el riesgo de que pueda haber un agente patógeno (de los camarones) es insignificante.
 - Nuevos cultivos madre: si los cultivos madre existentes se desechan en una TCU, deben comprarse nuevas poblaciones en laboratorios que suministren algas, o bien conseguirse en otros lugares donde sea improbable que haya contaminación por agentes patógenos (de los camarones), como por ejemplo aislando las especies deseadas de poblaciones salvajes de algas. No deben adquirirse nuevos cultivos madre de cualquier instalación que también cultive camarones, para evitar así la contaminación con agentes patógenos (del camarón) preocupantes.
- iii) *Equipo de piscifactoría*: en el caso de las redes, los cercos, los sistemas de tubos de líneas de aire porosas, etc., que sean relativamente baratos y fáciles de conseguir, deben desecharse y eliminarse de la instalación durante una TCU, puesto que no son fáciles de desinfectar y es probable que el cloro los dañe y acorte su vida útil.

El equipo imprescindible, como tubos de plástico flexibles de gran tamaño, bombas y tuberías, tanques de transferencia, jaulas, jaulas de recogida, mesas de recogida, discos Secchi, material de vidrio de laboratorio, etc. deben empaparse en solución de 200 ppm cloro de durante 24-48 horas. Esto se consigue más fácilmente colocando estos objetos en los tanques que se llenan con soluciones de 200 ppm de cloro. Debe tenerse cuidado de que se sumerjan por completo todos los objetos (pueden utilizarse objetos pesados para sumergir los más flotantes). Un buen consejo es colocar todas las cosas sueltas (excepto las que tengan que tirarse, o que puedan soltarse de su punto de amarre) en la solución de 200 ppm de cloro dentro de sus respectivos tanques.

En el caso de cosas similares que vayan asociadas a estanques, deben colocarse en una serie especial de tanques instalada cerca de sus respectivos estanques. Estos tanques deben llenarse con soluciones de 200 ppm de cloro. Tras la cloración, estas cosas deben dejarse secar y exponerse a esterilización mediante luz UV natural (luz solar). Se les debe dar la vuelta al menos una vez para exponer todas las caras a la luz solar directa.

Las herramientas y maquinaria, como tractores, camiones, herramientas eléctricas portátiles o fijas, etc. deben lavarse a fondo con soluciones de limpieza estándar. Todos los restos de barro, alimento de camarones, etc. deben eliminarse. A continuación, las superficies que puedan haberse contaminado durante su uso normal deberán enjuagarse con una solución yodófora (a una concentración de 200 ppm) o limpiarse con vapor.

Las herramientas e instrumentos pequeños, como básculas y balanzas, instrumentos analíticos, pequeñas herramientas eléctricas, etc., deben frotarse con cuidado con una solución de 200 ppm de cloro si son de plástico inerte, o bien con una solución de 200 ppm de yodo si no lo son. A continuación, deben devolverse a sus instalaciones respectivas durante la fumigación con formaldehído. El equipo analítico electrónico de alta precisión no debe exponerse a la fumigación, sobre todo si es poco probable que ni siquiera esté contaminado.

- iv) *Cañerías de "agua nueva"*: Todas las cañerías de agua nueva del interior de las instalaciones que estén contaminadas, sobre todo las que tengan extremos ciegos o terminen en colectores, deben llenarse con una solución de un mínimo de 200 ppm de cloro. La solución de cloro debe dejarse en las tuberías un mínimo de 24-48 horas, y a continuación estas deben enjuagarse con agua limpia. Las cañerías también pueden desinfectarse pasando agua caliente recirculante (>60°C) durante varias horas.
- v) *Uniformes, botas, etc.*: toda la indumentaria o cualquier cosa que utilicen los empleados debe desecharse o bien lavarse y desinfectarse a fondo. En el caso de la ropa, como los monos, será suficiente con un lavado normal que incluya lejía, sobre todo si va acompañado de un secado al sol. Otras cosas, como las botas, los guantes y otros elementos que no sean de ropa, pueden sumergirse en una solución de 200 ppm de cloro sin problema. Esto debe ir seguido de un enjugado con agua dulce. Estas cosas también deben estar en sus respectivas instalaciones durante la fumigación con formaldehído.
- vi) *Material alimentario*: todo el material alimentario, como piensos preparados o frescos (es decir, calamares, lombrices, artemias congeladas, moluscos bivalva, etc.) deben eliminarse de la instalación y ser sustituidos por alimento nuevo procedente de proveedores que se sepa que están libres de contaminación por agentes patógenos que afecten a los camarones.

5. Otros requisitos para los viveros e instalaciones de cría/mantenimiento de reproductores de crustáceos

Casi todos los viveros e instalaciones de cría/mantenimiento de reproductores de camarones peneidos utilizan agua marina que ha sido desinfectada para eliminar posibles agentes patógenos, plagas y agentes portadores de enfermedad mediante un filtrado mecánico, irradiación con rayos UV, y/o desinfección química. Esto puede lograrse mediante un filtrado pasivo del agua entrante (es decir, utilizando pozos de agua marina o sistemas de bombeo de agua marina) o mediante un filtrado mecánico utilizando bombas de alta presión y varios dispositivos de filtración de agua y tamaños de poro. Algunas instalaciones desinfectan el agua entrante mediante el filtrado junto con la desinfección por luz UV, mientras que otros utilizan métodos químicos de desinfección, utilizando la cloración y la decoloración o dosis altas de ozono y la posterior eliminación de oxidantes residuales. La desinfección química del agua entrante suele requerir el uso de uno o más reservorios de agua en los que el agua se trata y se detoxifica antes de ser utilizada en el vivero de camarones o en la instalación de reproductores de camarón. Existen varios manuales que indican con detalle cómo diseñar un vivero o instalación de reproductores de camarón y cómo hacer que un cultivo de camarones funcione, así como los métodos de desinfección del agua entrante.

5.1. Desinfección de los estanques de engorde

Tras la recogida sistemática de un lote de un estanque de engorde (o de un tanque grande o canal utilizado para el engorde de un lote), el fondo del estanque (o tanque) debe inspeccionarse. Los grandes depósitos de detritos orgánicos deben tratarse o eliminarse. Esto es fácil de llevar a cabo en tanques, canales o estanques con revestimiento interno (es decir, irrigando con una manguera a alta presión), pero supone un reto más complicado en estanques grandes de fondo de tierra. No obstante, se aplican muchos métodos de desinfección del fondo de los estanques y de tratamiento entre lotes. Estos métodos se indican en detalle en muchos manuales de piscifactorías de camarones, y algunos se indican aquí solo de forma resumida:

5.1.1. Cloración

Puede utilizarse cloración para el tratamiento sistemático de estanques entre lotes o cuando el objetivo sea erradicar una enfermedad. Tras drenar el estanque, se extrae (y elimina) la mayor cantidad posible de animales del sistema (esto puede ser difícil en sistemas de estanques, en los que podría no ser práctico extraer grandes cantidades de camarones muertos). Se vuelve a llenar parcialmente el estanque (o se llena hasta la capacidad requerida), se interrumpe la adición de agua nueva, se detiene la descarga de agua saliente, y se retiran todas las fuentes internas o externas de

aireación o dispositivos de aireación, que podrían sufrir corrosión. A continuación, se distribuye uniformemente hipoclorito de calcio suficiente (por ejemplo, Olin HTH™) para conseguir una concentración de cloro libre residual de 10 ppm en el agua de todo el sistema. (NOTA: La persona(s) que aplique(n) el cloro debe(n) llevar indumentaria de protección de la piel, y máscara antigás, y unas gafas o visera para protegerse los ojos, todo ello reglamentario). Se redistribuye hipoclorito de calcio adicional tan a menudo como sea necesario para mantener la concentración residual en 10 ppm o una cifra cercana. Se deja que el sistema repose durante un mínimo de 24-48 horas (sobre todo si se aplica a sistemas grandes) a esta concentración mínima de cloro. El cloro matará todos los camarones y la mayoría, sino todos, de los demás organismos que ocupen la columna de agua o que vivan en el estanque. Una vez el estanque haya sido tratado con cloro durante el periodo mínimo exigido, y antes de eliminar agua alguna, se neutraliza el cloro pasivamente exponiéndolo a luz solar y aire durante unas 48 horas más (sin añadir más cloro) o bien añadiendo tiosulfato de sodio a razón de cinco (5) moléculas de tiosulfato de sodio cada cuatro (4) moléculas de cloro (o de modo que el peso del tiosulfato de sodio sea 2,85 veces el peso del cloro que contiene el agua; véase un ejemplo en la tabla siguiente).

Tamaño del estanque	Profundidad media	Volumen	Dosis de cloro	Cloro necesario	HTH (Cl activo)	Tiosulfato necesario
1 hectárea	1 m	10.000 m ³	10 ppm	100 kg	154 kg	285 kg

Debe llevarse a cabo un análisis periódico del cloro residual, y no debe eliminarse agua hasta que se hayan alcanzado las 0 ppm. Una vez se haya comprobado que los niveles de cloro son de 0 ppm, el agua del sistema se puede vaciar sin problema al sistema de salida de la piscifactoría. En algunos sistemas de cultivo, en concreto en canales, tanques y estanques pequeños revestidos (es decir, los sistemas en los que la mayoría de los camarones no se han retirado antes de la desinfección), los camarones muertos deben recogerse para poder ser eliminados adecuadamente.

5.1.2. Tratamiento con cal

A los lechos de estanques secos debe aplicarse cal, que es óxido de calcio (cal viva), para que pueda atacar a todos los restos de materia orgánica mediante desecación/deshidratación, a razón de 4.000-5.000 kg/ha. Debe tenerse mucho cuidado de garantizar que la cal se esparza homogéneamente por la superficie del suelo. A continuación, se debe dejar reposar el estanque durante al menos una semana, o hasta que el suelo se haya secado hasta el punto de presentar grietas de unos 10-20 cm de profundidad. Una vez la cal lleve aplicada una semana, los estanques se llenan lentamente, en cuyo momento tiene lugar el efecto completo del pH y termina la desinfección. La cal viva también es eficaz cuando se utiliza en estanques húmedos, pero en estos casos solo funciona mediante el efecto del pH. Puede aplicarse cal adicional tras un arado (véase abajo) a razón de un 50% de lo que se prescribe normalmente. El estanque debe secarse de nuevo durante al menos una semana, en función del clima.

El hidróxido de calcio es menos eficaz para lograr un pH eficaz y no ejerce el mismo efecto de desecación que la cal viva ejerce en la materia orgánica.

5.1.3. Secado y arado

Tanto si un estanque ha sido tratado por cloración o con cal viva como si no, e incluso en el caso de que no haya sido tratado, el arado es un método utilizado con frecuencia para tratar el fondo del mismo para reducir su contenido en materia orgánica, mejorar el reciclado de nutrientes, tamponar el pH, eliminar plagas y lograr una desinfección mediante una combinación de degradación microbiana, exposición a la luz del sol, aireación y desecación. En algunas zonas, el secado y el arado de fondos de estanques secos solo son posibles durante la “estación seca”. Cuando el secado de un estanque es viable, el fondo del estanque debe dejarse secar hasta que la superficie presenta grietas de unos 10 cm. Una vez se ha alcanzado este nivel de secado, el suelo debe ararse a una profundidad de unos 20 cm con un arado, una caña, un cultivador, una grada de discos, una grada de púa o demás maquinaria agrícola similar. Los estanques tratados de esta forma deben dejarse reposar al menos una semana antes de volver a ser llenados y repoblados.

6. Neutralización de halógenos

El cloro y el yodo son muy tóxicos para los animales acuáticos, y con el fin de prevenir posibles accidentes graves derivados de un error en la manipulación, se recomienda neutralizar estos productos con tiosulfato de sodio (cinco moles de tiosulfato neutralizan cuatro moles de cloro). Las proporciones moleculares son las mismas para el yodo.

Según esta proporción, para inactivar cloro, la cantidad de tiosulfato debe ser de 2,85 veces la cantidad de cloro (en gramos):

Número de gramos de tiosulfato = $2,85 \times$ número de gramos de cloro.

En el caso del yodo, la cantidad de tiosulfato debe ser de 0,78 veces la cantidad de yodo, en gramos:

Número de gramos de tiosulfato = $0,78 \times$ número de gramos de yodo.

También se puede preparar una solución de tiosulfato al 1% por peso, en cuyo caso los volúmenes neutralizantes serán los siguientes (en ml):

1. en el caso del cloro:

$28,5 \times [\text{número de litros de la solución desinfectante} \times \text{concentración en mg litro}^{-1}] / 100$

2. en el caso del yodo:

Hay que multiplicar por 7,8 en lugar de por 28,5.

Tanto el cloro como el ozono producen compuestos oxidantes residuales de larga vida en el agua marina. El agua marina con una salinidad de 35 partes por mil (ppmil) contiene 60 ppm de ión bromuro, que produce hipobromito en presencia de ozono. El agua marina artificial desinfectada, a la misma salinidad, produce bromuro y ácido hipobromoso. Dado que estos, junto con otros compuestos residuales, son tóxicos para los animales acuáticos como las larvas de las ostras (y posiblemente también para otros moluscos), el agua de mar tratada debe pasarse por filtros de carbón activado antes de utilizarse para larvas vivas de moluscos.

Existen otros protocolos para la neutralización de halógenos que consisten en el tratamiento con tiosulfato de sodio o de potasio.

Debe llevarse a cabo un seguimiento de sustancias oxidantes residuales de forma periódica, sobre todo cuando se producen oscilaciones de temperatura. Dado que no puede medirse el ozono residual del agua marina, tal vez tengan que aplicarse otros protocolos de seguimiento, como un circuito de retroalimentación.

NOTA: También deben instalarse sistemas de salida de humos para eliminar gases tóxicos (producidos durante la desinfección) de zonas de trabajo cerradas. Al emitir gases tóxicos debe garantizarse el cumplimiento de la normativa local referente a la atmósfera.

7. Repoblación de las piscifactorías desinfectadas

Tras una TCU, la repoblación de las instalaciones o piscifactorías desinfectadas debe llevarse a cabo con poblaciones que se sepa que están libres de las enfermedades de la lista del *Código Acuático* u otras enfermedades emergentes o importantes que preocupen.

*
* *

PARTE 2

RECOMENDACIONES APLICABLES A ENFERMEDADES ESPECÍFICAS

PARTE 2.

RECOMENDACIONES APLICABLES A ENFERMEDADES ESPECÍFICAS

INTRODUCCIÓN GENERAL

A. DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA GESTIÓN SANITARIA DE LOS ANIMALES ACUÁTICOS

Un control sanitario exhaustivo de los animales de piscifactoría requiere:

- Una evaluación del estado sanitario de los animales acuáticos aplicando métodos basados en las directrices del *Código Acuático* y los objetivos relacionados de los sistemas de vigilancia de la Guía de la OIE para la Vigilancia Sanitaria de los Animales Acuáticos (2009).
- La obligación de repoblar aguas abiertas y piscifactorías solo con animales acuáticos cuyo estado sanitario sea superior o igual al de los animales que ya viven en las zonas en cuestión.
- La erradicación de la enfermedad en las piscifactorías siempre que sea posible, sacrificando las poblaciones infectadas, desinfectando las instalaciones y repoblando con animales acuáticos procedentes de orígenes libres de enfermedades específicas.
- La implementación de medidas de bioseguridad a nivel del lugar de producción; esto es importante en la gestión sanitaria y es necesario para la prevención de la entrada y la propagación de enfermedades de los animales acuáticos.
- La notificación, por parte de todos los países miembros y cuando lo pidan otros países con los que mantengan relaciones comerciales, de sus requisitos concretos, aparte de los que se indican en el *Código Acuático*, para la importación de animales acuáticos y de productos derivados de animales acuáticos.

Si se siguen los procedimientos anteriores, se puede dar una garantía suficiente del estado sanitario de los productos de la acuicultura respecto a enfermedades específicas, según su país, zona o compartimiento de origen.

La emisión de un certificado sanitario por parte de la autoridad oficial, en base a un informe del estado sanitario y a exámenes de los animales acuáticos, proporciona garantía suficiente de que los productos de la acuicultura de un lote determinado proceden de un país, zona o compartimiento libres de una o más enfermedades específicas de la lista del *Código Acuático* y posiblemente de otras enfermedades específicas (véase el modelo de certificado internacional en el *Código Acuático*, parte 4).

Otro objetivo de la vigilancia es determinar la presencia o distribución de enfermedades o infecciones endémicas, incluidos cambios en su incidencia o prevalencia (o los factores que contribuyen a que se produzcan), con el fin de proporcionar información para programas domésticos de control de enfermedades, así como proporcionar información relevante sobre la aparición de enfermedades para ser utilizada por parte de los países con los que se establezcan relaciones comerciales para que realicen una evaluación cualitativa y/o cuantitativa del riesgo. El tipo de vigilancia aplicada depende de los resultados deseados necesarios para respaldar una toma de decisiones. Los datos de vigilancia determinan la calidad de los informes del estado respecto a una enfermedad y deben satisfacer los requisitos de información para un análisis preciso del riesgo, tanto para el comercio internacional como para la toma de decisiones a nivel nacional.

La evaluación del estado sanitario de las poblaciones de animales acuáticos se basa en una inspección de los lugares de producción y un posterior examen de laboratorio de muestras procedentes de ejemplares tomados de una población definida de animales acuáticos. Ello requiere obtener la muestra y procesarla según métodos aceptados. Utilizando las directrices del *Código Acuático* y la *Guía de la OIE para la Vigilancia Sanitaria de los Animales Acuáticos* (2009) debe calcularse un tamaño de muestra en base a una metodología estadística, para la vigilancia o para la emisión de certificados sanitarios.

De entre varias técnicas aplicables a los agentes patógenos de los animales acuáticos, el *Manual Acuático* ha establecido dos tipos de procedimientos de examen que serán aceptables para este tipo de trabajo: 1) Métodos de detección sistemática, y 2) Métodos de diagnóstico. Los métodos aceptados se indican en los capítulos correspondientes sobre cada enfermedad. El tamaño de muestra necesario varía en función del objetivo del diagnóstico de la enfermedad o del método de detección del agente patógeno. Deben tenerse en cuenta la sensibilidad y especificidad de los métodos aceptados indicados en los capítulos correspondientes a cada enfermedad, sobre todo cuando una prueba se utiliza para demostrar la ausencia de una enfermedad.

Las directrices que se indican en los capítulos sobre cada enfermedad pueden aplicarse a todas las enfermedades de los animales acuáticos, a sus agentes patógenos y a las especies susceptibles, según se indica en el *Manual Acuático*, y están diseñadas para ayudar al desarrollo de métodos de vigilancia. Estas directrices también son aplicables a otras enfermedades de los animales acuáticos que no estén incluidas en el *Manual Acuático* pero que pueden ser importantes para un país o región, como enfermedades nuevas o emergentes. Siempre que sea posible, el desarrollo de sistemas de vigilancia utilizando estas directrices debe basarse en la información relevante de los capítulos sobre cada enfermedad.

A veces en un país/zona/compartimiento hay más de una especie susceptible. A no ser que se especifique lo contrario en los capítulos de este *Manual Acuático* sobre cada enfermedad concreta, para el muestreo deben tenerse en cuenta todas las especies susceptibles.

La evaluación del estado sanitario de las poblaciones de animales acuáticos se basa en la vigilancia, que incluye el muestreo y análisis de unidades epidemiológicas. Ello requiere el diseño e implementación de sistemas de vigilancia según se describen en la Guía de la OIE para la Vigilancia Sanitaria de los Animales Acuáticos (2009), el muestreo y la evaluación del estado sanitario de unidades epidemiológicas, como se describe en este capítulo, y el análisis de muestras según los métodos descritos en los capítulos sobre cada enfermedad.

B. AGENTES PATÓGENOS Y ENFERMEDADES OBJETIVO

En el Código Acuático se incluyen los agentes patógenos y las enfermedades de los animales acuáticos que se consideran objetivo según los siguientes criterios: que se haya observado que la enfermedad causa pérdidas importantes de producción a nivel nacional o multinacional (zonal o regional) o que afecta negativamente a poblaciones de animales acuáticos salvajes (o que existen pruebas científicas que así lo indican), o bien que el agente causal tenga importancia para la salud pública, y se haya demostrado que la enfermedad es de etiología infecciosa o que un agente infeccioso está intensamente relacionado con la enfermedad, pero la etiología todavía no se conozca, y exista probabilidad de propagación internacional, incluso mediante animales vivos, sus productos o fomites, y que varios países o países con zonas puedan ser declarados libres de la enfermedad en base a los principios generales de vigilancia destacados en el Capítulo 1.4. del *Código Acuático*, y que exista un medio repetible y robusto de detección/diagnóstico. En cuanto a las enfermedades de la lista actual de la OIE, por favor consúltese la edición actual del *Código Acuático*. Este *Manual Acuático* incluye capítulos sobre enfermedades específicas, incluidas todas las enfermedades de la lista del *Código Acuático*.

También puede desarrollarse vigilancia para enfermedades que no estén en la lista, sobre todo para enfermedades emergentes.

No sería práctico intentar desarrollar un sistema de vigilancia para todas las enfermedades conocidas de los animales acuáticos de un país. Por tanto, deberán priorizarse las enfermedades que se van a incluir en un sistema de vigilancia en base a lo siguiente:

- la necesidad de proporcionar una garantía sobre el estado respecto a la enfermedad a efectos comerciales,
- los recursos del país, teniendo en cuenta que por el hecho de que un país tenga pocos recursos no debe tener estándares de análisis distintos. Cumplir los estándares de comercio debe ser un requisito del comercio sujeto a variación solo cuando se acuerde con el país importador esté de acuerdo,
- El riesgo que supone cada enfermedad para el comercio exterior (país de destino) y los movimientos internos (distintas regiones/zonas del país de origen).

El concepto de riesgo engloba la probabilidad de aparición de la enfermedad, la capacidad de propagación y la gravedad de sus consecuencias. Estos aspectos se tratan en mayor detalle en el capítulo 2.2 sobre Análisis del Riesgo en las Importaciones.

C. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

1. Objetivos de la obtención de muestras

Existen al menos tres objetivos por los cuales pueden obtenerse muestras de poblaciones de animales acuáticos, que son los siguientes: 1) vigilancia; 2) emisión de certificados sanitarios, y 3) investigación de brotes de enfermedad. El número y tipo de muestras a tomar para el análisis y el procedimiento de toma de muestras varía en gran medida en función de cuál de estos objetivos sea aplicable.

2. Número de unidades epidemiológicas a muestrear

Utilizando las directrices del Capítulo 1.4 del *Código Acuático* (vigilancia sanitaria de los animales acuáticos) y la *Guía de la OIE para la Vigilancia Sanitaria de los Animales Acuáticos* (2009) debe calcularse un tamaño de muestra en base a una metodología estadística, para la vigilancia o para la emisión de certificados sanitarios.

Al llevar a cabo investigaciones de brotes de enfermedad, el número y estado de las unidades a muestrear deben determinarse de acuerdo con el capítulo correspondiente del *Manual Acuático*.

La obtención de animales acuáticos debe englobar un número estadísticamente suficiente de ejemplares, aunque es evidente que la falta de detección de ciertos agentes patógenos en la muestra no garantiza la ausencia de estos agentes en el ejemplar o población examinados. Esto es especialmente cierto en el caso de poblaciones de vida libre o asilvestradas en las cuales es difícil obtener una muestra representativa y aleatoria. No obstante, el riesgo de que un agente patógeno escape al sistema de vigilancia es escaso en instalaciones de producción en las que se haya comprobado si hay agentes patógenos durante un periodo de varios años (al menos 2), siempre que no estén expuestas a posible recontaminación por poblaciones asilvestradas.

En todas las enfermedades es muy recomendable planificar el programa de muestreo (es decir, un programa para cada explotación, teniendo en cuenta la estación, etc.) para que se tomen muestras del estadio(s) de vida en el momento en que sea más probable detectar el agente patógeno de interés. Esto es especialmente importante cuando los métodos de diagnóstico de los que se dispone se basan en la microscopía simple o son métodos histológicos y no incluyen métodos moleculares.

Todos los aspectos relacionados con la agrupación de infección, características analíticas y múltiples recursos de información, así como la garantía de calidad, se describen en la *Guía de la OIE para la Vigilancia Sanitaria de los Animales Acuáticos* (2009).

2.1. Obtención de muestras para demostrar la ausencia de enfermedad

Para demostrar la ausencia de enfermedad, deben escogerse animales acuáticos de tal forma que aumente la probabilidad de hallar el agente patógeno si lo hay, y aumentar por tanto la sensibilidad del método de diagnóstico adoptado. Así, por ejemplo, la obtención de muestras de crustáceos o peces que sean letárgicos o que se acerquen a los márgenes de los estanques, tanques y canales aumenta la probabilidad de hallar animales infectados. Por tanto, preferiblemente deben escogerse animales moribundos con signos clínicos compatibles con la enfermedad en cuestión, y el resto de la muestra debe comprender animales de la población de interés escogidos aleatoriamente. De forma similar, cuando se tenga información sobre los factores de riesgo de la enfermedad/infección en cuestión, la obtención de muestras debe realizarse en las unidades de mayor riesgo para aumentar la probabilidad de detectar el agente patógeno.

El objetivo de esta estrategia de obtención de muestras es aumentar la probabilidad pre-análisis de obtener muestras que contengan animales infectados. El efecto es “un sesgo” a favor de la detección de enfermedad. Es importante recordar que cuando el muestreo está sesgado, no pueden utilizarse resultados analíticos positivos a un agente patógeno para obtener una estimación exacta de la prevalencia de la enfermedad en la población estudiada. Por ejemplo, una muestra de 100 animales moribundos que contenga un solo animal positivo no necesariamente indica una prevalencia de un 1% en la población en general.

La sensibilidad y especificidad de la prueba son importantes para el cálculo del tamaño de la muestra, para el análisis de los resultados y para extraer conclusiones. La sensibilidad de la prueba es especialmente importante para demostrar la ausencia de enfermedad.

2.2. Obtención de muestras para evaluar la presencia y distribución de una enfermedad

Para evaluar la presencia de enfermedad (por ejemplo, para estimar la prevalencia o incidencia), las unidades epidemiológicas seleccionadas deben constituir una muestra representativa de la población de interés en cuanto al parámetro estimado. Esta muestra representativa solo se puede conseguir utilizando un muestreo de

basado en la probabilidad. Muestrear unidades en función de la comodidad o intentando crear a propósito una muestra representativa escogiendo las unidades no dará muestras representativas.

Aunque la elección de una muestra representativa de las piscifactorías es más factible utilizando métodos de muestreo aleatorio o muestreo geográfico, en acuicultura es muy infrecuente hallar oportunidades de tomar una muestra totalmente aleatoria. Así, por ejemplo, puede aplicarse un muestreo simple aleatorio si el animal acuático se puede identificar individualmente y enumerarse (esto a veces es posible en el caso de algunos animales reproductores).

Siempre que sea posible deben buscarse métodos innovadores de lograr aleatoriedad. Estos métodos son factibles cuando se puede acceder a todos los animales/unidades de la población. Por ejemplo, durante el procesamiento, cada animal puede, en ciertos casos, ser manipulado individualmente y puede diseñarse un esquema de muestreo aleatorio sistemático.

Aunque en acuicultura a menudo se utilizan muestras no aleatorias, técnicamente no pueden utilizarse en análisis estadísticos. En los casos en que no pueda obtenerse una muestra verdaderamente aleatoria, puede llevarse a cabo un muestreo por comodidad o al azar, aunque no podrá producir una muestra verdaderamente representativa y, por tanto, las estimaciones del parámetro estarán sesgadas, y a menudo no se sabrá en qué dirección. En el caso de los crustáceos, los métodos de muestreo no aleatorio que pueden producir resultados relativamente más representativos son, por ejemplo, el muestreo mediante esparavel. Debe evitarse el uso de bandejas de alimento o gránulos porque los animales escogidos serían comparativamente más sanos, y por tanto a menudo producirían una subestimación de la presencia y prevalencia de la enfermedad o agente patógeno en cuestión. Dado el sesgo recomendado por los procedimientos de muestreo detallados en este texto, es importante observar que los resultados no se pueden utilizar para determinar el riesgo de brote o porcentaje de brotes porque los datos están muy sesgados a favor de la prevalencia de la enfermedad. La evaluación del riesgo requiere un verdadero esquema de muestreo aleatorizado.

Cuando el objetivo es estimar la prevalencia de piscifactorías infectadas en un país, el proceso se llevará a cabo en dos pasos. En el primer paso, se escogerá una muestra representativa de piscifactorías utilizando métodos como los indicados en Survey Toolbox¹. En el segundo paso, se llevará a cabo un estudio en cada piscifactoría seleccionada para evaluar si la piscifactoría está libre de la enfermedad o no, utilizando los métodos que han sido indicados en la Guía de la OIE para la Vigilancia Sanitaria de los Animales Acuáticos (2009). La proporción de piscifactorías infectadas observada en este estudio se puede utilizar para estimar la prevalencia de piscifactorías infectadas en el país.

2.3. Obtención de muestras para investigar brotes sospechosos de una enfermedad

La investigación de un brote clínico requiere un enfoque lógico y sistemático, basado en la experiencia clínica, de selección de animales y de las pruebas diagnósticas correctas. Deben escogerse cantidades suficientes de animales moribundos (o con alto riesgo de serlo) para las pruebas de diagnóstico basadas en signos clínicos que sugieran la presencia de procesos que probablemente se deban a la enfermedad. Hay que recordar que muchas enfermedades requieren múltiples factores para que se creen las condiciones suficientes como para causar enfermedad clínica y que la identificación de un agente patógeno en animales moribundos por sí misma no confirma que el agente patógeno fuera la causa desencadenante del brote. Además, no significa que animales no moribundos de la misma población estén libres de este agente patógeno.

En episodios de enfermedad clínica, deben obtenerse ejemplares cuidadosamente seleccionados con lesiones representativas de entre animales vivos o moribundos. Debe hacerse todo lo posible por muestrear ejemplares que sean representativos de la enfermedad(es) que esté(n) afectando a la población de interés, y que sean moribundos o estén clínicamente enfermos. Debe evitarse obtener ejemplares muertos. Cuando las poblaciones de piscifactoría o salvajes presenten signos clínicos de una enfermedad activa que sean compatibles con cualquiera de las enfermedades de la lista de la OIE o que la sugieran, deben tenerse cuidado de asegurar que las muestras obtenidas sean conservadas adecuadamente para las pruebas diagnósticas previstas (véase el apartado 4 – Métodos de diagnóstico, en los capítulos sobre cada enfermedad).

Sean cuales sean los objetivos de la vigilancia, los métodos utilizados a cualquier nivel deben estar totalmente documentados y justificados.

1 *Survey Toolbox for Aquatic Animal Diseases* – Guía práctica y paquete de software. Cameron A.R. (2002). *Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR)*, Monografía nº 94, 375 pp. ISBN 1 86320 350 8. Versión impresa disponible en ACIAR (<http://www.aciar.gov.au>) Versión electrónica descargable gratuitamente en <http://www.ausvet.com.au>.

La sensibilidad e la prueba es importante para la investigación de los brotes de enfermedad, incluso si el número de falsos positivos es alto, porque identificar casos es de importancia crucial. Como se ha indicado anteriormente, la sensibilidad y la especificidad de la prueba también son importantes para el cálculo del tamaño de muestra, para el análisis de los resultados y para la extracción de conclusiones.

3. Protocolo de obtención de muestras

3.1. Selección de unidades epidemiológicas y métodos de obtención de muestras

Pueden obtenerse datos de vigilancia a partir de varias fuentes distintas.

En las instalaciones donde se crían animales acuáticos normalmente se dispone de registros de mortalidad. No obstante, en el caso de los lugares de cría de moluscos, casi nunca se dispone de ellos, o bien se dispone de registros con una menor frecuencia de observación (por ejemplo, se dispone de datos de mortalidad acumulada observada a lo largo de un periodo de 2 años). La existencia de registros puede utilizarse para identificar periodos de mortalidad inesperadamente alta o episodios inexplicados, lo cual dirigiría el muestreo a componentes de mayor probabilidad de la población o a periodos de tiempo de mayor probabilidad si el objetivo fuera detectar una enfermedad o infección específica.

Muchas enfermedades de los animales acuáticos tienen en común factores de riesgo relacionados con la introducción o transmisión de la enfermedad, como la exposición a grupos de distintas edades en una zona. Conocer las distribuciones de edades dentro de cada zona de producción ayuda a diseñar los estudios.

El valor de unidades determinadas en las instalaciones de producción acuícola a menudo justifica la realización de visitas de seguimiento sanitario sistemáticas. La interacción con el veterinario habitual de la piscifactoría o el especialista en sanidad de animales acuáticos constituye una útil fuente de información para identificar brotes y también para verificar la ausencia de episodios clínicos inexplicados que hayan tenido lugar en una población.

Los animales acuáticos que se tomen como muestras deben estar vivos en el momento de extraerlos, a no ser que en los capítulos sobre cada enfermedad se especifique lo contrario.

Durante los estudios de brotes de enfermedad, si en la población de la que se toman muestras hay animales moribundos, estos deben ser los primeros en escogerse y el resto de la muestra debe estar formada por animales acuáticos vivos escogidos aleatoriamente de todas las unidades de engorde que representen el lote que se desea estudiar. En el caso de poblaciones salvajes de animales sésiles (como los moluscos), es posible que una parte más sospechosa de la población esté formada por animales situados a gran proximidad de las zonas de mortalidad.

3.2. Procedimientos post-obtención de muestras

Deben tomarse muestras de órganos, tejidos y líquidos de animales acuáticos, y procesarse cuanto antes tras la obtención del ejemplar. Debe evitarse la congelación de las muestras si se va a precisar un examen histológico. No obstante, la congelación de las muestras es una posibilidad si se van a aplicar otras pruebas, como los bioanálisis de virus, el análisis mediante PCR, las pruebas de toxicología e incluso algunas pruebas bacteriológicas. Como consecuencia, las muestras más adecuadas deben conservarse de la forma más apropiada para la prueba(s) diagnóstica que se vaya a utilizar.

Las muestras deben enviarse al laboratorio y empaquetarse individualmente en recipientes asépticos refrigerados y herméticos o sobre hielo, cuando se puedan congelar (véase arriba), debe evitarse el contacto directo con el hielo o bloques de congelador. Sin embargo, es claramente preferible y recomendable obtener muestras de los animales acuáticos inmediatamente después de que hayan sido escogidos en el lugar de producción acuícola y guardar y procesar las muestras como se describe en los capítulos sobre cada enfermedad o en los capítulos introductorios para cada especie. Cada muestra debe ir identificada con una etiqueta que indique el lugar, hora y fecha de obtención de la muestra, así como la especie, la cantidad de muestras obtenidas y si los animales estaban muertos o moribundos en el momento de obtenerlos, y del nombre e información de contacto de la persona que ha tomado la muestra(s). para etiquetar las muestras debe utilizarse un rotulador indeleble (a prueba de agua y de alcohol) del número 2, y debe utilizarse papel duradero impermeable o plastificado.

BIBLIOGRAFÍA PARA LECTURA ADICIONAL

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). (2012). Chapter 1.4. Aquatic animal health surveillance. *In: Aquatic Animal Health Code*, fifteenth edition. OIE, Paris, France.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). (2009). *OIE Guide for Aquatic Animal Health Surveillance*. OIE, Paris, France.

*
* *

SECCIÓN 2.1.

ENFERMEDADES DE LOS ANFIBIOS

CAPÍTULO 2.1.0.

INFORMACIÓN GENERAL

CAPÍTULO EN PREPARACIÓN

*
* *