



Organisation
Mondiale
de la Santé
Animale

World
Organisation
for Animal
Health

Organización
Mundial
de Sanidad
Animal

Original: inglés
Enero de 2018

INFORME DE LA REUNIÓN ELECTRÓNICA DEL GRUPO *AD HOC* DE LA OIE SOBRE EL VIRUS DE LA TILAPIA DEL LAGO¹

Noviembre de 2017-enero de 2018

El grupo *ad hoc* sobre el virus de la tilapia del lago (TiLV) se estableció en noviembre de 2017 con el fin de evaluar los métodos de diagnóstico y validación de este virus.

En su reunión de septiembre de 2017, la Comisión de Normas Sanitarias para los Animales Acuáticos (Comisión para los Animales Acuáticos) revisó la evaluación del virus de la tilapia de lago (TiLV) a partir de los nuevos criterios enunciados en el Capítulo 1.2. *Criterios para la inclusión de las enfermedades de los animales acuáticos en la lista de la OIE del Código Acuático* y tomó nota de que una versión revisada de dichos criterios se había adoptado en la Sesión general de 2017. La Comisión también consideró la nueva información científica publicada desde su última reunión en febrero de 2017.

La Comisión para los Animales Acuáticos volvió a evaluar las muestras relativas al tercer criterio de inclusión de una enfermedad en la lista de la OIE: «Se dispone de una definición de caso precisa y existen métodos de detección y diagnóstico fiables». La Comisión analizó la información de una publicación reciente en la que se describe una nueva prueba de diagnóstico para el TiLV (Dong *et al.*, Emergence of tilapia lake virus in Thailand and an alternative semi-nested RT-PCR for detection. *Aquaculture*, doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.04.019). Concluyó que esta información adicional no permitía satisfacer el criterio debido a la falta de datos sobre la sensibilidad y la especificidad de diagnóstico de la prueba.

Debido a la actual propagación del TiLV en el mundo, la Comisión para los Animales Acuáticos decidió establecer un grupo *ad hoc* electrónico encargado de evaluar los métodos de diagnóstico y su validación y presentar un informe a consideración de la Comisión para los Animales Acuáticos, antes de su reunión de febrero de 2018.

Conclusiones y recomendaciones del grupo *ad hoc*

Se aconseja seguir evaluando y comparando las pruebas moleculares. Los métodos de la prueba PCR en tiempo real suelen tener mayor sensibilidad y especificidad y, por lo tanto, se recomiendan para la validación.

El material utilizado en el marco de las comparaciones interlaboratorio podría prepararse en el laboratorio australiano de sanidad animal (Australian Animal Health Laboratory o AAHL), que posee la pericia requerida al igual que la certificación ISO 17043 para la producción, análisis y elaboración de informes sobre el control de calidad de las pruebas realizadas por paneles en el marco de programas de pruebas nacionales e internacionales. Esta actividad forma parte integrante del mandato del AAHL como centro colaborador de la OIE para la ciencia de validación de las pruebas de diagnóstico y para las enfermedades nuevas y emergentes.

Una vez se disponga de información suficiente sobre la pertinencia de las pruebas comparativas en estudio con respecto al uso esperado, la validación deberá incluir tanto los resultados obtenidos con los tejidos recomendados como con otros tipos de muestras como el mucus (Liamnimitr *et al.*, 2018). El muestreo deberá representar las distintas etapas del ciclo de vida y determinar la pertinencia de la mezcla de pruebas.

Se requieren estudios de validación más completos para determinar la sensibilidad y la especificidad de las pruebas de diagnóstico en animales que presenten signos clínicos y, en particular, que estén sanos en apariencia. Por ejemplo, Senapin *et al.* (2018) publicaron los resultados obtenidos a partir de casos de infección sin manifestación clínica del TiLV.

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

Por consiguiente, se solicita que la Comisión para los Animales Acuáticos examine los resultados que figuran en este informe y apruebe las recomendaciones formuladas por el grupo *ad hoc*.

Recomendaciones específicas del Grupo *ad hoc* sobre el virus de la tilapia del lago:

1. La sede de la OIE deberá comunicarse con los Delegados de los Países Miembros donde se ha notificado la presencia del TiLV y solicitarles que envíen material de control positivo al Dr. Collin, del Centro Colaborador para las Enfermedades Nuevas y Emergentes (Australian Animal Health Laboratory) para que se pueda realizar la evaluación de las pruebas moleculares y los estudios de comparación interlaboratorio (consultar el Anexo I para obtener las señas del laboratorio).
2. La Comisión para los Animales Acuáticos deberá analizar el mandato del grupo *ad hoc* con el fin de desarrollar un plan de trabajo detallado para que se pueda efectuar el trabajo descrito en los puntos 3, 4 y 5 de su mandato. Si el grupo *ad hoc* acepta la forma en que se han realizado las pruebas, el mandato ampliado también podrá incluir disposiciones relativas a las muestras utilizadas en el marco de las pruebas interlaboratorio para el TiLV y que estarán destinadas a los países que suministran el material.
3. La OIE deberá tomar nota de los recursos adicionales requeridos por el grupo *ad hoc* para llevar a cabo el trabajo propuesto.

.../Anexos

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

Noviembre de 2017-enero de 2018

Lista de participantes

MIEMBROS DEL GRUPO AD HOC ELECTRÓNICO

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

Dr. Hong Liu
Director
The National Key laboratory of Aquatic
Animal Diseases
Animal and Plant Inspection and
Quarantine Technical Centre
Shenzhen Exit & Inspection and
Quarantine Bureau
General Administration of Quality
Supervision, Inspection and Quarantine
(AQSIQ) of P. R. China
Room 702 of Inspection and
Quarantine Building
1011 of Fuqiang Road, Futian Qu,
Shenzhen City, Guangdong Province,
518045
P. R. CHINA
Tel.: 86-755-25588410
LiuHong@szciq.gov.cn
709274714@qq.com

Dra. Mona Dverdal Jansen
Veterinarian, Researcher, PhD
Norwegian Veterinary Institute
PO Box 750 Sentrum
NO-0106 Oslo
NORUEGA
Tel.: + 47 23 21 64 79
Tel.: + 47 934 99 808
mona-dverdal.jansen@vetinst.no
www.vetinst.no
Dr. Sergio Hernán Marshall González
Pontificia Universidad Católica
de Valparaíso
Av. Brazil 2950
Valparaíso
CHILE
Tel.: +55 32-2273444
sergio.marshall@pucv.cl

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

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

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

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

REPRESENTANTE DE LA COMISIÓN DE NORMAS SANITARIAS PARA LOS ANIMALES ACUÁTICOS

Dr. Edmund Peeler
(Vicepresidente)
Group Manager Aquatic Pest & Pathogens
CEFAS
Barrack Road, Weymouth
Dorset, DT4 8UB UK
REINO UNIDO
ed.peeler@cefass.co.uk

SEDE DE LA OIE

Dr. Stian Johnsen
Comisionado
Departamento de Normas
s.johnsen@oie.int

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

MANDATO

Finalidad del grupo *ad hoc*

El grupo *ad hoc* electrónico sobre el virus de la tilapia del lago (TiLV) efectuará la evaluación de los métodos de detección del TiLV, publicados o no. Para cada uno de dichos métodos, describirá su grado de progresión dentro del proceso de validación y determinará exigencias adicionales en cuanto a la validación. Recomendará el desarrollo de pruebas complementarias que considere necesarias y facilitará el suministro y distribución de material de control positivo bien caracterizado para la evaluación de los métodos, su implementación y las comparaciones interlaboratorio.

Contexto

En la reunión de septiembre de 2017, la Comisión para los Animales Acuáticos efectuó la evaluación de la infección por el virus de la tilapia del lago en función de los criterios de inclusión en la lista de las enfermedades que figuran en el Capítulo 1.2. *Criterios para la inclusión de las enfermedades de los animales acuáticos en la lista de la OIE del Código Acuático*.

La Comisión analizó la información científica disponible a partir del tercer criterio de inclusión de una enfermedad en la lista de la OIE: «Se dispone de una definición de caso precisa y existen métodos de detección y diagnóstico fiables». Concluyó que este criterio no se cumplía debido a la falta de información sobre la sensibilidad y la especificidad analítica y de diagnóstico de las pruebas.

Mandato

El grupo *ad hoc* electrónico deberá:

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

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

EVALUACIÓN DEL GRUPO *AD HOC* SOBRE EL VIRUS DE LA TILAPIA DEL LAGO

1. Revisión crítica de la literatura existente que trate los métodos de detección del TiLV y de los métodos que no se hayan publicado y que también puedan estar disponibles

La revisión de la literatura² permitió identificar tres métodos moleculares que podrían potencialmente ser candidatos para posteriores estudios de validación:

- a) Prueba convencional RT-PCR semi-anidada (RT-nPCR), descrita por Dong *et al.* (2017a). Los primers utilizados son los diseñados por Eyngor *et al.* (2014), con las modificaciones indicadas por Tsofack *et al.* (2017).
- b) Prueba RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR) con el colorante fluorescente SYBR, descrito por Tattiyapong *et al.* (2017b).
- c) Prueba basada en una sonda RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR), sin publicar al día de hoy, y comunicado al grupo *ad hoc* por el Dr. Hong.

Se evaluó la aplicabilidad del primer y de la sonda para las pruebas moleculares y se consideraron apropiados para el trabajo de validación posterior mediante el análisis *in silico* de las secuencias del TiLV disponibles en libre acceso y que contienen sitios de unión para los primers y las sondas en estudio.

Se ha descrito el aislamiento del virus a través de su cultivo en líneas celulares E-11, aplicando procedimientos normalizados. Es posible procurarse la línea celular E-11 en los bancos internacionales de líneas celulares como la European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC).

El detalle de la información recogida en los artículos seleccionados figura en el documento Excel adjunto que indica a) la finalidad del estudio, b) la fuente de suministro de los animales, c) la descripción de la PCR, d-g) la sensibilidad y especificidad de los análisis, la sensibilidad y especificidad del diagnóstico, h) la naturaleza del tejido (muestra), i) las especies de tilapias (domésticas o silvestres) y j) los comentarios.

2. Recomendaciones sobre las exigencias requeridas en materia de desarrollo de los métodos adicionales

El Dr. Marshall sugirió que se desarrollara un método LAMP (*loop-mediated amplification*) para completar la gama de pruebas moleculares puestas a disposición de los laboratorios para la detección del TiLV. Propuso desarrollar este método.

3. Recomendaciones sobre las exigencias requeridas para los métodos de validación

Los métodos moleculares indicados en el anterior punto 1 presentan niveles de progresión variados dentro del proceso de validación. En general, sólo se ha analizado un pequeño número de muestras, extraídas localmente de tilapias con signos clínicos. No se ha finalizado la determinación de la sensibilidad y de la especificidad del análisis, de la sensibilidad y la especificidad del diagnóstico, para cada una de las pruebas. También se podría incluir una prueba LAMP para la detección del TiLV en su evaluación inicial detallada a continuación.

Las recomendaciones sobre los futuros trabajos de validación se pueden aplicar junto con las recomendaciones sobre los estudios de comparaciones interlaboratorio que figuran en el punto 5 a continuación. Una evaluación inicial de las pruebas permitiría determinar:

- a) la sensibilidad de los análisis de cada uno de los métodos moleculares por medio de diluciones decimales de soluciones cuantificadas de ARN transcrito a partir de plásmidos;
- b) la comparabilidad de los resultados de análisis obtenidos por los distintos métodos moleculares, utilizando diluciones decimales de ARN genómico de TiLV;

² Se identificaron doce artículos por medio de motores de búsqueda en línea como «Web of Science» y «PubMed». Los integrantes del grupo *ad hoc* y la OIE presentaron diez artículos revisados por pares y uno de la FAO.

Anexo III (cont.)

- c) la especificidad analítica para cada uno de los métodos moleculares utilizando los virus de los peces puestos a disposición por los laboratorios de los miembros del grupo *ad hoc*;
- d) la especificidad de los análisis para cada uno de los métodos moleculares aplicados a los aislados de TiLV proveniente de distintas localizaciones geográficas. Previamente, estos aislados se caracterizarán por medio de una prueba PCR convencional y la secuenciación de los segmentos 1, 5 y 9;
- e) las estimaciones preliminares iniciales de la reproductibilidad y la repetibilidad.

Si la evaluación inicial antes propuesta, en asociación con estudios de comparaciones interlaboratorio, arroja resultados aceptables, entonces será posible planificar y realizar estudios de validación más completos para determinar la sensibilidad y la especificidad de los diagnósticos de las pruebas destinadas a animales clínicamente afectados y aparentemente sanos.

4. Fuentes de suministro de material de control positivo bien caracterizado, viable o no viable, para la evaluación de los métodos y su implementación en los laboratorios

El Dr. Nadav indicó que Israel podía suministrar el material de control positivo. Dos investigadores, el Dr. Avi Eldar del Instituto Veterinario de Kimron (Kimron Veterinary Institute) y el profesor Eran Bacharach de la Universidad de Tel Aviv (Tel Aviv University), estudian el virus desde su primera descripción.

El laboratorio AAHL puede recibir material infeccioso viable destinado a los trabajos *in vitro* e *in vivo* sobre agentes patógenos exóticos para Australia. El laboratorio del Dr. Moody está en capacidad de recibir cepas infecciosas del TiLV, que se cultivarán en líneas celulares E-11. Cuando se vuelvan no infecciosas, se enviarán a los laboratorios de los integrantes del grupo *ad hoc* para ser utilizadas en estudios de evaluación y comparación. Se requiere un cierto trabajo para determinar el nivel de degradación del ARN del TiLV expuesto a los rayos gamma. Sin embargo, los trabajos realizados por el AAHL con otros virus de los peces sugieren que este tratamiento no impide la utilización del material irradiado.

Una de las recomendaciones del grupo *ad hoc* es que la sede de la OIE se comunique con los Delegados de los Países Miembros que han notificado la presencia del TiLV y les solicite material de control positivo para utilizarlo en la evaluación de los métodos moleculares y en comparaciones interlaboratorio. Se concluirán acuerdos de transferencia de material para garantizar que se destinen únicamente a las actividades del grupo *ad hoc*.

5. Elaboración de un programa de trabajo para las comparaciones interlaboratorio

Idealmente, el material utilizado en los estudios comparativos interlaboratorio deberá ser representativo de los tejidos extraídos en el terreno y enviados al laboratorio para someterse a prueba. Sin embargo, debido a las dificultades inherentes al transporte transfronterizo de material infeccioso y al riesgo de la falta de homogeneidad asociado a la utilización de peces infectados, puede resultar oportuna la utilización del sobrenadante de las líneas celulares infectadas como fuente de abastecimiento alternativo para las pruebas interlaboratorio. Por lo tanto, las muestras del panel se someterán a prueba para asegurarse de que se cumplan las exigencias en materia de homogeneidad y estabilidad. El material se preparará en cantidad suficiente para permitir la distribución a otros laboratorios que deseen realizar las pruebas recomendadas por el grupo *ad hoc*, bajo reserva de que hayan sido aprobadas previamente por la Comisión para los Animales Acuáticos.

Cada uno de los paneles utilizados para comparación estará compuesto de 20 muestras positivas y 10 negativas, preparadas como sigue:

- a) 7 muestras obtenidas por dilución decimal en serie para permitir la estimación de la eficacia de los métodos moleculares en tiempo real;
- b) 2 muestras positivas (nivel intermedio);
- c) 2 muestras positivas (nivel bajo);
- d) 4 muestras obtenidas por dilución decimal de muestras con un nivel positivo intermedio y bajo;
- e) 5 muestras positivas con títulos virales variados;
- f) 10 muestras negativas, preparadas a partir del sobrenadante de los cultivos de líneas celulares no infectadas.

Los laboratorios participantes recibirán las muestras en forma de tubos numerados y las someterán a prueba a ciegas. Los paneles de muestras se someterán a prueba al menos tres veces. Los resultados se comunicarán al presidente del grupo *ad hoc* para que los compile y transmita en un formato sin codificar a los laboratorios participantes para poder iniciar el debate. La duplicación de las muestras y la utilización de diluciones decimales permiten efectuar el análisis estadístico que puede ser utilizado para la determinación de la repetibilidad y la reproductibilidad.

Los resultados de la evaluación de los métodos moleculares para la identificación del TiLV, la producción de los datos de validación preliminares, además de los estudios de comparaciones interlaboratorio serán objeto de presentaciones durante conferencias organizadas por la OIE. Además, se podrán publicar en la *Revista Científica y Técnica* de la OIE o en otras revistas científicas revisadas por pares.

Referencias:

Dong *et al.* (2017a). Emergence of tilapia lake virus in Thailand and an alternative semi-nested RT-PCR for detection. *Aquaculture*, 476:111.

Eyngor *et al.* (2014). Identification of a novel RNA virus lethal to tilapia. *J. Clin. Micro.*, 52(12): 4137.

Tattiyapong *et al.* (2017b). Development and validation of a reverse transcription quantitative polymerase chain reaction for tilapia lake virus detection in clinical samples and experimentally challenged fish. *J. Fish Dis.*, 12708.

Tsofack *et al.* (2017). Detection of Tilapia Lake Virus in clinical samples by culturing and nested reverse transcription-PCR. *J. Clin. Micro.*, 55(3): 759.

Liamnimitr *et al.* (2018). Non-lethal sampling for Tilapia Lake Virus by RT-qPCR and cell culture. *Aquaculture*, 486:75–80.

Senapin *et al.* (2018). Inapparent infection cases of tilapia lake virus (TiLV) in farmed tilapia. *Aquaculture*.
