

**Aprueban protocolo para certificación
y monitoreo con fines de detección de
virus causantes de diversas enferme-
dades en langostinos peneidos**

**RESOLUCION MINISTERIAL
N° 245-99-PE**

Lima, 5 de agosto de 1999

CONSIDERANDO:

Que mediante Decreto Supremo N° 009-99-PE de fecha 12 de junio de 1999 se suspendió por un período de 180 días calendario la importación de diversos organismos y productos de países en que se haya comprobado la presencia de los virus que producen las enfermedades llamadas de la "Mancha Blanca" (WSSV) y "Cabeza Amarilla" (YHV);

Que el Artículo 8° del mencionado Decreto Supremo faculta al Ministerio de Pesquería a que mediante Resolución Ministerial pueda prorrogar o levantar, según sea el caso, la suspensión establecida en su Artículo 1°, así como a dictar las normas complementarias que sean necesarias para su debida implementación, quedando conjuntamente con la Superintendencia Nacional de Aduanas, encargados de su cumplimiento en el ámbito de sus respectivas competencias;

Que el Artículo 6° del precitado Decreto Supremo indica que el Instituto del Mar del Perú - IMARPE determinará el protocolo a seguir para el desarrollo de las pruebas necesarias para la expedición del Certificado Sanitario/Patológico a que se hace referencia en el Artículo 4° del citado Decreto Supremo, así como en el monitoreo del medio acuático y de los organismos que se presumen actúen como vectores de las enfermedades llamadas de la "Mancha Blanca" (WSSV) y "Cabeza Amarilla" (YHV);

Que mediante Oficio N° DE-100-175-99-IMP/PE de fecha 20 de julio de 1999, el Instituto del Mar del Perú - IMARPE, alcanzó a la Dirección Nacional de Acuicultura una propuesta de protocolo para la certificación y monitoreo con fines de detección de los virus causantes de las enfermedades de la "Mancha blanca" y de la "Cabeza amarilla" en langostinos Peneidos;

Estando a lo informado por la Dirección Nacional de Acuicultura y con la visación de la Oficina General de Asesoría Jurídica;

De conformidad con lo establecido en el Decreto Ley N° 25977 - Ley General de Pesca, su Reglamento aprobado por Decreto Supremo N° 01-94-PE y en el Decreto Supremo N° 009-99-PE; y,

Con la opinión favorable del Viceministro;

SE RESUELVE:

Artículo 1°. - Aprobar el protocolo para la certificación y monitoreo con fines de detección de los virus causantes de las enfermedades de la "Mancha blanca" y de la "Cabeza amarilla" en langostinos Peneidos, que en anexo forma parte integrante de la presente Resolución.

Artículo 2°. - La Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y los laboratorios autorizados por el Ministerio de Pesquería quedan obligados a implementar el precitado protocolo; y si como consecuencia de los estudios, se encuentran indicios de la presencia de los virus de la "mancha blanca" o de la "cabeza amarilla", deberán informar de este hecho inmediatamente a la Dirección Regional de Pesquería de Tumbes, adjuntando copia del respectivo análisis (reporte de laboratorio).

Regístrese, comuníquese y publíquese.

GUSTAVO CAILLAUX ZAZZALI
Ministro de Pesquería

PROTOCOLO PARA LA CERTIFICACION Y MONITOREO CON FINES DE DETECCION DE LOS VIRUS CAUSANTES DE LAS ENFERMEDADES DE LA "MANCHA BLANCA" Y DE LA "CABEZA AMARILLA" EN LANGOSTINOS PENEIDOS

1. PROTOCOLO PARA LA EMISION DEL CERTIFICADO SANITARIO

Para la detección de los virus que producen la enfermedad de la "mancha blanca" (White Spot Syndrome Virus - WSSV) y la enfermedad de la "cabeza amarilla" (Yellow Head Virus - YHV), en los organismos y productos que se importen con fines de acuicultura y para consumo humano directo, se utilizará la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction - PCR).

1.1 Tamaño de la muestra

a) Para organismos vivos

A efecto de llevar a cabo el muestreo de los lotes correspondientes de langostinos vivos, en cualquiera de sus fases de desarrollo, excepto reproductores; de acuerdo al valor establecido para una prevalencia del 2% y un nivel de confianza del 95%, se tomará del lote el número de organismos indicados en la tabla siguiente:

Tamaño del lote	Tamaño de la muestra
50 - 100	50
101 - 250	75
251 - 500	110
501 - 1000	130
1001 - 2000	140
2001 - 10000	145
>10000	150

Quando se trate de reproductores, todos los organismos deberán ser analizados para garantizar la detección precisa de los patógenos causales de las enfermedades materia de la certificación.

b) Para organismos en estado latente, productos y subproductos

b1) Artemia (Artemia spp.)

Presentada en latas, deshidratada, liofilizada o en hojuelas, el tamaño de muestra será del 1% del contenido. En presentación congelada, se tomará una muestra que represente el 5% del lote.

En ambos casos las muestras se tomarán por triplicado.

b2) Langostino congelado

Por cada lote deberá tomarse un bloque de 20 x 20 cm.

b3) Poliquetos

Por cada lote se tomará una muestra que represente el 5% de éste.

1.2 Método de obtención de la muestra

a) Para organismos vivos

Será extraída en forma no aleatoria, es decir deberá ser sesgada. Primero se tendrá que seleccionar los individuos que se muestren débiles o moribundos (tantos como se pueda) y se completará el tamaño de muestra con especímenes aparentemente sanos extraídos al azar. Para la obtención de estos últimos, y dependiendo de su tamaño, previamente a la extracción deberán ser distribuidos de manera homogénea en el mismo volumen de agua del recipiente que los contenga, mediante un movimiento circular suave.

Para el caso de postlarvas (PL), con el fin de facilitar la selección, serán sometidas a una prueba de estrés con formalina mediante el siguiente procedimiento:

- Colocar los individuos en recipientes, a una densidad de 1000 PL/l.

- Airear fuertemente el agua.

- Añadir formalina al agua hasta una concentración de 100 - 150 ppm y mantener por 30 minutos.

- Hacer circular el agua en remolinos para concentrar en el centro a las PL débiles (presuntamente enfermas).

- Extraer a los individuos que se observen estar débiles o moribundos.

b) Para organismos en estado latente, productos y subproductos

En el caso de las muestras de artemia, langostinos congelados y poliquetos, se deberán tomar de manera aleatoria, de tal manera que sean representativas con respecto al lote.

1.3 Preparación y envío de las muestras

a) Para organismos vivos

Para nauplios, larvas y postlarvas de langostinos, se procurará que las muestras constituidas de ejemplares vivos lleguen a su destino en tal condición; enviándose al laboratorio debidamente empacadas y rotuladas.

Alternativamente, las muestras podrán prepararse de acuerdo a cualquiera de los siguientes procedimientos:

- Colocando los individuos completos en recipientes de tamaño adecuado que contengan etanol al 96%.

- Disecando los órganos blanco y colocándolos en hielo seco. En su defecto, se puede utilizar hielo normal en suficiente cantidad y empacarlos en recipientes herméticos.

- Disectando los órganos blanco, macerándolos a continuación y colocándolos en recipientes de tamaño adecuado previamente llenados con etanol al 96% en una relación 1:10.

Se recomienda que una parte sea preservada en hielo seco y la otra en alcohol etílico 96%.

En el caso de reproductores o langostinos de suficiente talla, extraer hemolinfa o pleópodos del organismo siguiendo las técnicas recomendadas por Lightner (1996). Para el caso de la hemolinfa utilizar una jeringa de tamaño proporcional al ejemplar, colocando a continuación la hemolinfa extraída en un tubo con cierre hermético debidamente tratado con un anticoagulante (EDTA, citrato de sodio o heparina). Los tubos, debidamente rotulados, deberán colocarse en una hielera con suficiente cantidad de hielo para su envío al laboratorio.

b) Para organismos en estado latente, productos y subproductos.

En el caso de las muestras de Artemia, langostinos congelados y poliquetos, se deberán colocar en bolsas de plástico con cierre hermético, las que se empacarán en cajas de poliuretano con hielo seco.

Las muestras, tanto de organismos vivos como las de organismos en estado latente, productos y subproductos, deberán ser remitidas inmediatamente a los laboratorios

seleccionados por el usuario y acreditados por el Ministerio de Pesquería.

1.4 Análisis del ADN mediante la técnica de PCR

a) Preparación de la muestra

Realizar la extracción de ácidos nucleicos en amortiguador, proteinasa K y sarkocil, continuándose con la extracción normal basada en fenol, cloroformo y etanol. Se recomienda el uso de un buffer de digestión.

Cuando vaya a ser procesado el cefalotórax del langostino, se deposita en un tubo estéril de microcentrífuga (1.5), homogeneizándose con un pistilo en solución amortiguadora tris-NaCl 1X o en un buffer de KCL 50 mM, tris-HCL 10 mM a pH 8.3, 0.1 mg/ml de gelatina, nonidet P 40 0.45%, Tween 20 0.45% y proteinasa K 80 microgramos por mililitro.

El volumen de buffer de digestión dependerá del tamaño del langostino, recomendándose usar 75 microlitros para cefalotórax de postlarvas de aproximadamente 15 mm. de longitud total y un volumen de más de 400 microlitros para juveniles de aproximadamente 50 mm. de longitud total.

Después de digerir la muestra, se calienta a 60 °C durante una hora, y luego a 95 °C por diez minutos. A continuación, se centrifuga a 12 000 rpm durante dos minutos, transfiriéndose el sobrenadante a un tubo nuevo, el cual será conservado en hielo.

Enseguida, se transfieren 50 microlitros del digerido y se diluyen con 150 microlitros de buffer TE (10 mM tris-HCL, pH 8.0; 0.1 mM EDTA), procediéndose a continuación a la extracción de proteínas con 200 microlitros de fenol, alcohol isoamílico, cloroformo (PIC) (25:1:24). Después de agitar la muestra por cinco segundos, el tubo de reacción se incuba durante cinco minutos a temperatura ambiente, centrifugándose a 12 000 rpm por dos minutos.

Al final, se formará una fase acuosa y una orgánica, la primera (fase superior), que contiene los ácidos nucleicos, se transfiere a un tubo nuevo de 0.5 ml, teniendo precaución de no tocar la interfase ni la fase inferior, a efecto de no contaminar la muestra.

Para precipitar el ADN se agregan y mezclan 20 microgramos de glicógeno, medio volumen de acetato de amonio 7.5 M (85 microlitros) y tres volúmenes de etanol absoluto, incubando a temperatura ambiente durante una hora.

Cada muestra se centrifuga a 12 000 rpm durante cinco minutos, enjuagando enseguida con 200 microlitros de etanol al 70% y dejando secar por diez minutos, para disolver a continuación en 30 microlitros de buffer TE. En el caso de no utilizarse esta última solución podrá conservarse en refrigeración hasta el momento de su uso.

La concentración de ADN se determina por los métodos de corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1% en buffer TDE, o bien por espectrofotometría, realizando las lecturas a 260 nm.

b) Procesamiento de la muestra

Se efectúa en un volumen de reacción de 10 microlitros, el cual contiene: KCL 5 mM, TRIS HCL 10 mM (pH 9) MgCL₂ 1.5 mM, triton X-100 0.1%, 0.2 mM de cada dNTP, 15 pmol de cada primer (5' ATC TGA TGA GAC AGC CCA AG 3'; 5' GGG AAT GTT AAA TAT GTA TGC G 3'), aproximadamente 10 ng de templado o molde (ADN extraído del langostino con probable infección) y 1 ul de TAQ polimerasa.

Sobre este volumen de reacción se agregan 25 microlitros de aceite mineral y se procede a realizar la amplificación por 30 ciclos. El paso de desnaturalización se realiza a 94 °C durante 30 segundos; el de anillamiento a 55 °C por 45 segundos y el de extensión a 72 °C durante 45 segundos.

El producto amplificado se examina en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE. El producto amplificado debe ubicarse en la posición correspondiente a 365 bp, con respecto al marcador de peso molecular.

Para el caso del virus causante de la enfermedad de la "Cabeza Amarilla" (YHV) mediante el uso de transcriptasa reversa se convierte el ARN en cADN, el cual puede ser trabajado con la metodología ya descrita para ADN.

2. PROTOCOLO PARA EL MONITOREO DEL AMBIENTE ACUATICO Y DE LOS ORGANISMOS VEC-TORES

2.1 Zonas de muestreo

Para la ejecución del monitoreo en mención se deberá establecer puntos o estaciones de muestreo estratégicos en el ámbito natural de la zona geográfica en la cual se encuentran ubicadas las langostineras.

Estas estaciones de muestreo estarán ubicadas en:

- Principales esteros de donde se bombea agua a los estanques de las langostineras y/o adonde se evacuan luego de su uso.
- Zonas en el mar cercanas a los desagües de las plantas de procesamiento de langostinos y otros productos hidrobiológicos.
- Zonas costeras cercanas a las anteriormente mencionadas.

Estas estaciones de muestreo deberán ser establecidas en mayor número en la zona colindante con Ecuador.

Se recomienda que en las estaciones se midan algunos parámetros como temperatura y salinidad, los cuales ayudarán en la interpretación epidemiológica en posibles futuros casos de presencia de especímenes portadores de los virus materia de este protocolo.

2.2 Monitoreo del medio acuático

En las estaciones establecidas y en la capa subsuperficial se tomarán las muestras haciendo un lance en el agua usando redes con abertura de malla de 1mm. y de 300 micrómetros.

El material obtenido será colocado en recipientes de tamaño adecuado y fijado con alcohol etílico al 95% en una relación 1:10, llevado al laboratorio para el análisis de los organismos presentes y posteriormente de los extractos de DNA mediante la técnica de PCR.

2.3 Monitoreo de los organismos silvestres

En las mismas estaciones se obtendrá especímenes vivos de crustáceos de la fauna silvestre (langostinos, cangrejos reptantes y nadadores, jaibas, mysidáceos, etc.) para su análisis en laboratorio mediante la técnica de PCR.

a) Tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra deberá dar una probabilidad del 95% de detectar a los portadores en la totalidad de la captura, asumiendo una prevalencia de portadores en la población del 2% (ver tabla 3.1 a).

b) Método de muestreo

El muestreo será aleatorio dentro de las estaciones establecidas.

c) Preparación y envío de la muestra

Los extractos de ADN deberán ser obtenidos de muestras de hemolinfa, branquias o apéndices, los cuales pueden provenir de especímenes individuales o de "pools" de varios individuos.

Las muestras, tanto del medio acuático como de los organismos silvestres, deberán ser remitidas inmediatamente a los laboratorios seleccionados por el usuario y acreditados por el Ministerio de Pesquería.

2.4 Análisis mediante la técnica de PCR

El procedimiento para el análisis tanto del material obtenido del monitoreo del medio acuático como del monitoreo de las especies silvestres, será el mismo indicado en el punto 1.4 correspondiente al Protocolo de Muestreo para la Certificación. Se recomienda que la cantidad de ADN a usar para el templado o molde sea 10 ng.

3. PROCESAMIENTO DE DATOS Y DESTINO DE LA INFORMACION SOBRE LOS MONITOREOS

Los resultados obtenidos de los análisis, así como los datos concernientes a las muestras procesadas, serán registrados en formatos ad hoc elaborados por el laboratorio autorizado.

Para el caso de los monitoreos, la información que se obtenga deberá ser periódicamente alcanzada a la Dirección Regional de Pesquería de Tumbes, excepto cuando se detecte la presencia del virus de cualquiera de las enfermedades que son materia del mismo, en que se comunicará inmediatamente.

10159