



**Pontificia Universidad Católica de Valparaíso
Laboratorio de Patógenos Acuícolas
Laboratorio de Genética e Inmunología Molecular**

INFORME

“ENSAYO DE COMPARACIÓN INTERLABORATORIO PARA LA EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LOS LABORATORIOS REGISTRADOS PARA DETECTAR EN FORMA ESPECÍFICA LA VARIANTE HPRO DEL VIRUS DE LA ANEMIA INFECCIOSA DEL SALMÓN (ISAV) MEDIANTE RT-qPCR.”

“RING TEST ISAV HPRO”

Valparaíso, noviembre de 2023



Índice

1. Introducción.....	2
2. Objetivo.....	3
3. Materiales y Métodos.....	3
4. Resultados y Discusión.....	9
5. Conclusiones.....	16

1. Introducción

El Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (Sernapesca) designó al Laboratorio de Patógenos Acuícolas (LPA), perteneciente al Laboratorio de Genética e Inmunología Molecular de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso (GIM-PUCV) como Laboratorio de referencia para el virus ISA (RES.EX. N°1448 de 06.06.2011).

Entre las funciones delegadas a éste, en el marco de la referencia se encuentra la evaluación técnica y continua de la red de laboratorios de diagnóstico registrada por Sernapesca mediante rondas de comparación interlaboratorio y procesos de auditoría técnica.

Dado lo anterior y tomando en cuenta la importancia que tiene para la acuicultura nacional y el Programa Sanitario Específico de Vigilancia y Control de la Anemia Infecciosa del Salmón (PSEVC-ISA) el actual sistema de diagnóstico y diferenciación de variantes utilizado para el ISAV basado en un PCR de tiempo real según lo publicado por Snow *et al.*, en el año 2006 acoplado a un RT-qPCR específico para la variante HPRO del virus presente en el sexto segmento genómico viral, es que se diseñó y desarrolló este ensayo.

Sin duda, el tener un sistema nacional de intercomparación permitirá su ejecución periódica, como también es un primer paso en la posibilidad de evaluar ensayos de RT-PCR en tiempo real orientados a la detección de otros patógenos que afectan la acuicultura nacional.

2. Objetivo

Determinar la capacidad de los laboratorios de diagnóstico registrados por Sernapesca para detectar en forma específica la presencia de la variante HPRO del Virus de la Anemia Infecciosa del Salmón (ISAV) en muestras de material genético que contienen fragmentos genómicos correspondientes a los marcos de lectura abierto (ORF's del inglés Open reading frame) de los segmentos genómicos virales usados para la detección y caracterización de las diferentes variantes del ISAV en torno al HPR, dichos segmentos son el segmento 8 y el segmento 6 de algunas de las diferentes variantes virales prevalentes en Chile durante los últimos años (HPR0a, HPR2a, HPR3a, HPR7b, HPR8a y HPR14a)¹.

Este ensayo fue diseñado para evaluar la capacidad del laboratorio para discriminar específicamente entre una serie de muestras positivas a ISAV, cuales corresponden a la variante HPRO.

La información de este ensayo será codificada para cada laboratorio participante y los resultados no podrán ser utilizados, por este Laboratorio o por terceros, para efectos de ranking u otra medición, tendiente a destacar unos laboratorios respecto de otros.

3. Materiales y Métodos

Descripción del Ensayo

Para llevar a cabo este ensayo, Sernapesca envió una invitación a participar a los laboratorios de diagnóstico registrados y a los que se encuentran en vías de registro. Esta invitación fue aceptada y se inscribieron para participar en ella 17 laboratorios en total, 16 laboratorios participantes más el LPA PUCV como ejecutor. A los participantes se les envió el instructivo del ensayo, el formulario para el reporte de resultados y además se les invitó a participar de una reunión virtual, previa al ensayo, en la cual se discutieron las dudas y observaciones que se presentaron al estudiar el instructivo.

Cabe mencionar que dicho instructivo contenía los requisitos, tanto técnicos como administrativos para participar del ensayo, un pequeño resumen del ensayo y los procedimientos necesarios para participar del ensayo. Asimismo, definía los plazos y las vías de comunicación.

El ensayo consideró un total de 30 muestras ciegas divididas en 3 lotes (10 muestras cada uno), los cuales fueron analizadas en días o corridas diferentes (tres corridas), dichas muestras contenían cargas variables de un producto amplificado del ORF completo del segmento 8 y del ORF completo del segmento 6 de diferentes variantes del virus ISA.

De las 30 muestras que conformaban el panel de muestras ciegas del ensayo, 9 correspondían a diluciones de la variante HPRO, para las cuales se esperaban resultados positivos al RT-qPCR de ISAV (Snow, Seg 8) y positivos al RT-qPCR específico para virus ISA HPRO (Seg 6) y 15 muestras corresponden a variantes distintas a HPRO, para las cuales se esperaban

¹ Nomenclatura de acuerdo con Cárdenas et al 2017

resultados positivos al RT-qPCR ISAV (Snow, Seg 8) y negativos al RT-qPCR específico para virus ISA HPR0 (Seg 6) y finalmente 6 muestra contenían agua (blanco), para las que se esperaban todos los resultados negativos.

LPA realizó un análisis al panel de muestras una vez que este fue preparado, en forma previa a su preservación para el envío y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Resultados obtenidos por el LPA en el análisis de las muestras en forma previa a su envío (17-10-2023).

Muestra	Región HPR segmento 6 (específico HPR 0)		Segmento 8 (Snow)		Interpretación
	Ct 1	Int.	Ct 1	Int.	
HPR0a-1	19.28	Pos	18.82	Pos	ISAV(+) HPR0(+)
HPR0a-2	26.41	Pos	26.39	Pos	ISAV(+) HPR0(+)
HPR0a-3	29.46	Pos	29.44	Pos	ISAV(+) HPR0(+)
HPR7b	No Ct	Neg	20.6	Pos	ISAV(+) HPR0(-)
HPR14a	No Ct	Neg	19.48	Pos	ISAV(+) HPR0(-)
HPR8a	No Ct	Neg	20.64	Pos	ISAV(+) HPR0(-)
HPR3a	No Ct	Neg	20.72	Pos	ISAV(+) HPR0(-)
HPR2a	No Ct	Neg	31.35	Pos	ISAV(+) HPR0(-)
CN-1	No Ct	Neg	No Ct	Neg	ISAV(-) HPR0(-)
CN-2	No Ct	Neg	No Ct	Neg	ISAV(-) HPR0(-)
CP	22.5	Pos	26.6	Pos	ISAV(+) HPR0(+)
BL	No Ct	Neg	No Ct	Neg	ISAV(-) HPR0(-)

Los resultados obtenidos son los esperados para el tipo de muestras que se analizó y nos permiten aseverar lo siguiente:

- Región HPR segmento 6 (específico HPR0).** Los resultados obtenidos indican que muestras pertenecen a la variante HPR0a y cuáles no. Debe considerarse que, para la interpretación de dicho análisis el protocolo de nuestro laboratorio indica que se debe comparar el valor de Ct obtenido para este ensayo y el valor obtenido para el respectivo segmento 8 de la muestra, además debe considerarse la forma de la curva (exponencial).
- Segmento 8 (Snow).** Los resultados obtenidos nos indican que las muestras además de presentar segmento 6 presentan segmento 8 y en cantidades comparables, lo que hace posible y más real la detección de las variante HPR0a.

Procedimiento

El set de muestras problemas fue despachado en criotubos de 2 mL los que contenían 30 μ L de muestra cada uno. Estos tubos estaban contenidos y ordenados en un rack de cartón, el cual a su vez estaba contenido en una caja de polietileno con material refrigerante.

Cada tubo fue rotulado con un código compuesto por una letra mayúscula y 3 números, los que fueron usados para la trazabilidad de la muestra y el resultado (tabla 2)

Cabe mencionar que las muestras se acompañaron de una carta conductora, la cual fue recibida, completada con los datos solicitados firmada y devuelta al LPA mediante correo electrónico.

Tabla 2. Codificación de muestras enviadas.

Número	Lab	Muestra	Lote A	Lote B	Lote C	Número	Lab	Muestra	Lote A	Lote B	Lote C
1	LAB 1	HPR0a-1	A-192	B-132	C-190	1	LAB 2	HPR0a-1	A-073	B-012	C-049
2		HPR0a-2	A-090	B-143	C-072	2		HPR0a-2	A-031	B-054	C-132
3		HPR0a-3	A-146	B-105	C-035	3		HPR0a-3	A-170	B-160	C-131
4		HPR7b	A-009	B-004	C-174	4		HPR7b	A-141	B-032	C-057
5		HPR14a	A-055	B-173	C-167	5		HPR14a	A-103	B-010	C-138
6		HPR8a	A-037	B-142	C-182	6		HPR8a	A-078	B-048	C-056
7		HPR3a	A-105	B-137	C-090	7		HPR3a	A-071	B-118	C-162
8		HPR2a	A-008	B-185	C-195	8		HPR2a	A-187	B-091	C-084
9		CN-1	A-119	B-179	C-030	9		CN-1	A-023	B-188	C-046
10		CN-2	A-086	B-035	C-034	10		CN-2	A-102	B-181	C-198
1	LAB 3	HPR0a-1	A-094	B-150	C-113	1	LAB 4	HPR0a-1	A-171	B-095	C-136
2		HPR0a-2	A-043	B-075	C-026	2		HPR0a-2	A-089	B-056	C-050
3		HPR0a-3	A-122	B-047	C-075	3		HPR0a-3	A-108	B-040	C-036
4		HPR7b	A-121	B-107	C-161	4		HPR7b	A-079	B-126	C-179
5		HPR14a	A-158	B-190	C-023	5		HPR14a	A-130	B-184	C-097
6		HPR8a	A-182	B-182	C-117	6		HPR8a	A-157	B-130	C-140
7		HPR3a	A-006	B-002	C-022	7		HPR3a	A-198	B-042	C-044
8		HPR2a	A-025	B-166	C-171	8		HPR2a	A-172	B-034	C-184
9		CN-1	A-042	B-093	C-040	9		CN-1	A-004	B-120	C-141
10		CN-2	A-077	B-116	C-183	10		CN-2	A-186	B-152	C-137

Numero	Lab	Muestra	Lote A	Lote B	Lote C
1	LAB 5	HPR0a-1	A-096	B-171	C-091
2		HPR0a-2	A-039	B-114	C-054
3		HPR0a-3	A-029	B-159	C-006
4		HPR7b	A-147	B-186	C-039
5		HPR14	A-038	B-096	C-038
6		HPR8a	A-072	B-178	C-108
7		HPR3a	A-087	B-009	C-122
8		HPR2a	A-059	B-099	C-059
9		CN-1	A-189	B-051	C-120
10		CN-2	A-082	B-121	C-007
1	LAB 7	HPR0a-1	A-168	B-085	C-066
2		HPR0a-2	A-054	B-033	C-088
3		HPR0a-3	A-167	B-027	C-001
4		HPR7b	A-109	B-180	C-029
5		HPR14a	A-050	B-111	C-158
6		HPR8a	A-012	B-165	C-008
7		HPR3a	A-177	B-141	C-123
8		HPR2a	A-062	B-170	C-069
9		CN-1	A-098	B-108	C-064
10		CN-2	A-032	B-058	C-107
1	LAB 9	HPR0a-1	A-002	B-139	C-173
2		HPR0a-2	A-026	B-053	C-199
3		HPR0a-3	A-001	B-003	C-169
4		HPR7b	A-053	B-112	C-020
5		HPR14a	A-040	B-175	C-085
6		HPR8a	A-178	B-008	C-027
7		HPR3a	A-118	B-127	C-104
8		HPR2a	A-088	B-168	C-004
9		CN-1	A-112	B-052	C-032
10		CN-2	A-154	B-196	C-168

Numero	Lab	Muestra	Lote A	Lote B	Lote C
1	LAB 6	HPR0a-1	A-007	B-088	C-093
2		HPR0a-2	A-128	B-094	C-172
3		HPR0a-3	A-084	B-122	C-146
4		HPR7b	A-013	B-098	C-003
5		HPR14a	A-093	B-069	C-074
6		HPR8a	A-052	B-103	C-139
7		HPR3a	A-194	B-119	C-115
8		HPR2a	A-060	B-163	C-116
9		CN-1	A-126	B-039	C-191
10		CN-2	A-174	B-136	C-164
1	LAB 8	HPR0a-1	A-024	B-195	C-126
2		HPR0a-2	A-191	B-026	C-106
3		HPR0a-3	A-115	B-200	C-033
4		HPR7b	A-068	B-065	C-112
5		HPR14a	A-111	B-062	C-013
6		HPR8a	A-091	B-174	C-118
7		HPR3a	A-123	B-018	C-124
8		HPR2a	A-022	B-078	C-197
9		CN-1	A-140	B-110	C-130
10		CN-2	A-095	B-044	C-129
1	LAB 10	HPR0a-1	A-058	B-164	C-105
2		HPR0a-2	A-151	B-038	C-157
3		HPR0a-3	A-020	B-013	C-009
4		HPR7b	A-099	B-153	C-017
5		HPR14a	A-138	B-060	C-048
6		HPR8a	A-169	B-037	C-087
7		HPR3a	A-044	B-077	C-073
8		HPR2a	A-047	B-144	C-094
9		CN-1	A-028	B-129	C-010
10		CN-2	A-135	B-115	C-058

Numero	Lab	Muestra	Lote A	Lote B	Lote C	Numero	Lab	Muestra	Lote A	Lote B	Lote C
1	LAB 11	HPR0a-1	A-067	B-101	C-012	1	LAB 12	HPR0a-1	A-183	B-073	C-018
2		HPR0a-2	A-144	B-158	C-192	2		HPR0a-2	A-152	B-097	C-121
3		HPR0a-3	A-195	B-036	C-151	3		HPR0a-3	A-048	B-017	C-186
4		HPR7b	A-127	B-030	C-025	4		HPR7b	A-124	B-128	C-144
5		HPR14a	A-092	B-057	C-194	5		HPR14a	A-064	B-191	C-081
6		HPR8a	A-063	B-087	C-125	6		HPR8a	A-137	B-068	C-148
7		HPR3a	A-015	B-086	C-028	7		HPR3a	A-131	B-177	C-051
8		HPR2a	A-076	B-005	C-119	8		HPR2a	A-117	B-092	C-055
9		CN-1	A-148	B-072	C-159	9		CN-1	A-106	B-104	C-185
10		CN-2	A-193	B-059	C-200	10		CN-2	A-185	B-016	C-193
1	LAB 13	HPR0a-1	A-175	B-156	C-063	1	LAB 14	HPR0a-1	A-056	B-014	C-067
2		HPR0a-2	A-085	B-172	C-101	2		HPR0a-2	A-005	B-187	C-187
3		HPR0a-3	A-150	B-138	C-037	3		HPR0a-3	A-014	B-157	C-019
4		HPR7b	A-179	B-070	C-080	4		HPR7b	A-188	B-007	C-089
5		HPR14a	A-164	B-015	C-098	5		HPR14a	A-199	B-124	C-176
6		HPR8a	A-010	B-140	C-031	6		HPR8a	A-061	B-147	C-002
7		HPR3a	A-136	B-123	C-103	7		HPR3a	A-100	B-161	C-111
8		HPR2a	A-163	B-083	C-082	8		HPR2a	A-011	B-135	C-021
9		CN-1	A-033	B-064	C-045	9		CN-1	A-034	B-109	C-133
10		CN-2	A-190	B-001	C-188	10		CN-2	A-159	B-134	C-061
1	LAB 15	HPR0a-1	A-142	B-066	C-052	1	LAB 16	HPR0a-1	A-200	B-199	C-147
2		HPR0a-2	A-097	B-023	C-163	2		HPR0a-2	A-116	B-080	C-079
3		HPR0a-3	A-016	B-089	C-160	3		HPR0a-3	A-166	B-067	C-014
4		HPR7b	A-184	B-063	C-102	4		HPR7b	A-162	B-081	C-060
5		HPR14a	A-075	B-006	C-134	5		HPR14a	A-113	B-020	C-143
6		HPR8a	A-080	B-019	C-071	6		HPR8a	A-125	B-133	C-152
7		HPR3a	A-074	B-074	C-062	7		HPR3a	A-021	B-031	C-078
8		HPR2a	A-161	B-176	C-096	8		HPR2a	A-197	B-155	C-166
9		CN-1	A-036	B-079	C-189	9		CN-1	A-030	B-125	C-177
10		CN-2	A-196	B-041	C-180	10		CN-2	A-035	B-197	C-110
1	LAB 17	HPR0a-1	A-129	B-025	C-083	6	LAB 17	HPR8a	A-027	B-028	C-128
2		HPR0a-2	A-156	B-049	C-095	7		HPR3a	A-160	B-050	C-153
3		HPR0a-3	A-065	B-162	C-015	8		HPR2a	A-114	B-117	C-135
4		HPR7b	A-132	B-055	C-076	9		CN-1	A-018	B-022	C-127
5		HPR14a	A-173	B-154	C-047	10		CN-2	A-120	B-192	C-145

Es importante mencionar que, una vez codificados los tubos y agrupadas según muestra correspondiente, estas fueron repartidas aleatoriamente en los diferentes racks de cartón, por lo que se mantuvo la condición de muestras ciegas para el LPA. Asimismo, para simular las condiciones de transporte, las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante las 24 horas previas a su análisis.

Las amplificaciones fueron realizadas en duplicado para cada muestra y de la misma manera que se realiza el análisis rutinariamente a muestras de campo, con la excepción que no se realizó el paso de extracción de RNA.

Además, se corrió en paralelo el análisis específico para ISAV HPRO (segmento 6) y el ensayo oficial para ISAV según Snow *et al.*, 2006 (segmento 8).

Los kits, equipos, tiempos, temperaturas, partidores y sondas utilizados fueron las descritas en el informe de validación de cada laboratorio, el que se encuentra debidamente reportado a Sernapesca.

Envío de resultados e información general del procedimiento

Una vez obtenidos los resultados, estos fueron registrados en el formulario correspondiente, el cual una vez completo fue enviado por correo electrónico al LPA.

Cabe mencionar que a todos los laboratorios participantes se les informó que, si para explicar la interpretación de algún resultado era necesario enviar información adicional a la solicitada en los formularios enviados como por ejemplo los gráficos de las curvas obtenidos, podría hacerse por esta misma vía, ya sea como archivo adjunto o a continuación del formulario de resultados.

Asimismo, la información general del procedimiento fue enviada por la misma vía. Una vez recibidos los documentos se confirmó su recepción.

4. Resultados y Discusión

Dado que los resultados generados por este ensayo son de carácter confidencial entre la autoridad sectorial, el laboratorio de referencia y cada uno de los laboratorios participantes, la información será codificada, entregando a cada laboratorio su código correspondiente.

La tabla 3 nos indica el código asignado a cada laboratorio para este ensayo, el cual también se utilizará para presentar los resultados. Asimismo, nos muestra el método utilizado.

Cabe mencionar que el laboratorio 12 participo del ensayo utilizando dos variantes de qPCR (SybrGreen y Taqman) y el laboratorio 11 participo con dos equipos diferentes (LightCycler® 480 II/Roche y StepOnePlus/Applied Biosystems), por lo que los resultados en ambos casos se presentan diferenciando estos con las letras a y b respectivamente.

Tabla 3. Laboratorios participantes con su respectivo código asignado.

Código	Laboratorio
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	
11	
12	
13	
14	
15	
16	
17	PUCV

En la tabla 4 se indica información general relacionada con los protocolos utilizados por cada laboratorio, (kits de amplificación, equipos de PCR en tiempo real, volúmenes de reacción total, volumen de muestra utilizado, valores de Ct de cortes, número de ciclos de amplificación para la detección específica de ISAV HPR0.

Tabla 4. Protocolos de los laboratorios utilizados para la detección específica de ISAV HPR0 mediante RT-PCR en tiempo real con sonda TaqMan® y/o SybrGreen.

N°	Kit Amplificación	Equipo	Volumen de Reacción	Volumen de muestra	N° Ciclos	Ct corte
1	AgPath-ID One-step RT-PCR Kit /Applied Biosystems	LightCycler® 480 II/Roche	13	3	45	35.00
2	SuperScript™III Playinium™One-Step qRT-PCR-System/Invitrogen	LightCycler® 480 II/Roche	7	2.2	45	35.00
3	SuperScript™III Playinium™One-Step qRT-PCR-System/Invitrogen	LightCycler® 480 II/Roche	15	5	45	35.00
4	Takyon rox probe master mix Takyon 1-step qrt-pcr converter	CFX 96/Biorad	12	3	45	37.12
5	SuperScript™III Playinium™One-Step qRT-PCR-System/Invitrogen	Stratagene Mx3000P/Agilent Technologies	12	3	45	37.50
6	SuperScript™III Playinium™One-Step qRT-PCR-System/Invitrogen	AriaMx Real-Time PCR/Agilent Technologies	12	3	45	36.02
7	EXPRESS One-Step SuperScript® qRT-PCR Kits/Invitrogen	QuantStudio 3 Real Time PCR System/ThermoFisher	12.5	1	45	38.01
8	KAPA PROBE FAST One-Step Universal / Kapa Biosystems	AriaMx Real-Time PCR/Agilent Technologies	20	2	45	37.00
9	SuperScript™III Playinium™One-Step qRT-PCR-System/Invitrogen	LightCycler® 480 II/Roche	10	1	45	35.60
10	SuperScript™III Playinium™One-Step qRT-PCR-System/Invitrogen	LightCycler® 480 II/Roche	12.5	2.5	45	35.31
11a	Taqman Fast Virus 1 Step Master Mix/Applied Biosystems	LightCycler® 480 II/Roche	13	3	45	36.00
11b	Taqman Fast Virus 1 Step Master Mix/Applied Biosystems	StepOnePlus/Applied Biosystems	13	3	45	36.00
12a	Brilliant II SYBR-Green One-step qRT-PCR	Stratagene Mx3000P/Agilent Technologies	12.5	2	45	36.59
12b	Taqman Fast Virus 1 Step Master Mix/Applied Biosystems	QuantStudio 3 Real Time PCR System/ThermoFisher	12.5	2	45	35.55
13	Brilliant III Ultra-Fast qRT-PCR	StepOnePlus/Applied Biosystems	15	2	45	35.00
14	Lightcycler 480 RNA Master Hydrolysis probes	CFX 96/Biorad	10	1	45	36.28
15	Taqman Fast Virus 1 Step Master Mix/Applied Biosystems	QuantStudio 3 Real Time PCR System/ThermoFisher	10	2.5	45	36.33
16	EXPRESS One-Step SuperScript® qRT-PCR Kits/Invitrogen	Stratagene Mx3000P/Agilent Technologies	10	1	45	36.00
17	SuperScript™III Playinium™One-Step qRT-PCR-System/Invitrogen	StepOnePlus/Applied Biosystems	10	2	45	36.00

La tabla 4 indica que en el medio se utilizan 9 kits de amplificación diferentes, predominando el kit SuperScript III Platinum, One-Step qRT-PCR System de Invitrogen. En términos de equipos utilizados hay 7, con una mayor representación del LightCycler® 480 II de Roche.

Los resultados obtenidos fueron tabulados (tabla 5) para su análisis, para el cual se consideraron tanto los valores de Ct, como la interpretación entregada para cada muestra por cada laboratorio y para cada segmento específico (Seg8 y Seg6). Respecto al laboratorio 12a se consideran las temperaturas de melting obtenidas.

Del análisis inicial de los resultados presentados en la tabla 5 es importante mencionar que, las muestras negativas fueron correctamente identificadas por todos los laboratorios tanto para el S8 como para el S6.

En relación a la detección del S8 en las muestras positivas correspondientes a diferentes variantes del ISAV, podemos mencionar que todos los laboratorios identifican correctamente las muestras de las 3 diluciones de la variante HPR0a y a las variantes HPR7b, HPR14a, HPR8a y HPR3a. Sin embargo, con la variante HPR2a existen algunas diferencias en la detección ya que solo 4 laboratorios (4, 5, 6 y 17) logran interpretar los 3 lotes como positivos, 1 laboratorio (11a) interpreta dos lotes como positivos y uno negativo, 2 laboratorios (1, 11b) interpretan un lote como positivo y dos negativos y finalmente 11 laboratorios (2, 3, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15 y 16) interpretan como negativa dicha muestra en sus tres lotes, independientemente que algunos de ellos (2, 3, 12, 14) obtengan amplificación por detrás del Ct de corte (negativo con Ct). Cabe mencionar que, esta muestra (HPR2a) es la que contenía menor cantidad de ADN molde y por tanto obtiene valores de Ct más altos (al límite), esto hace esperable la diferencia obtenida.

Respecto a la detección específica de la variante HPR0a (S6), se observa que todos los laboratorios logran identificar correctamente las muestras positivas y las muestras negativas en sus tres lotes.

Lo anterior permite indicar que todos los laboratorios, independientemente que utilicen diferentes diseños de ensayo, kits, equipos, tiempos y temperaturas obtienen un 100% de sensibilidad y un 100% de especificidad en la detección de la variante HPR0a del ISAV.

Por otro lado, la repetibilidad y reproducibilidad de cada laboratorio en el ensayo específico para la detección de ISAV HPR0 se evaluó calculando los parámetros estadísticos de media, desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV%) entre los duplicados (dentro de cada lote) y a su vez entre las réplicas de muestras contenidas en los diferentes lotes. Esta evaluación se realizó para cada una de las muestras positivas a ISAV HPR0 (tablas 6a, 6b y 6c) y en su análisis se observa que las diferencias entre valores de Ct obtenidos entre duplicados y entre lotes en general se encuentran dentro de los rangos aceptables (dentro de lotes $SD < 0,7$ y $CV\% < 5\%$; entre lotes $SD < 2,33$ y $CV\% < 10\%$) a excepción de:

- Muestra ISAV HPR0a-1: laboratorio 14 que para el lote B presenta una SD de 1.12 y el laboratorio 17 que para el lote C obtiene una SD de 0,9, ligeramente superior al rango máximo. Asimismo, el laboratorio 3 entre los lotes presenta una SD 3.15 y un CV% de 11.86% (tabla 6a).
- Muestra ISAV HPR0a-2: laboratorio 8 que para el lote B presenta una SD de 0.72 y el laboratorio 11b que para el lote C obtiene una SD de 0,7, ambas ligeramente superior al rango máximo. Asimismo, el laboratorio 4 y 5 entre los lotes presentan una SD 2.81, SD 3.09 y un CV% 10.26% y 10.30% respectivamente (tabla 6b).
- Muestra ISAV HPR0a-3: laboratorio 2, 11a, 11b y 16 que para el lote B presentan una SD de 0.78, 1.07, 1.34 y 1.06 respectivamente y el laboratorio 14 que para el lote C no obtiene amplificación (tabla 6c).

Tabla 5. Valores de Ct promedio (3 lotes), para la detección de ISAV (seg6 y seg8) mediante RT-qPCR obtenidos por cada laboratorio participante en el ensayo de comparación inter-laboratorio, según muestra.

Muestra	HPR0a-1		HPR0a-2		HPR0a-3		HPR7b		HPR14a		HPR8a		HPR3a		HPR2a		CN1		CN2		
Lab\Seg	S8	S6	S8	S6	S8	S6	S8	S6	S8	S6	S8	S6	S8	S6	S8	S6	S8	S6	S8	S6	
1	22.99	21.19	31.45	29.22	33.19	30.74	24.69	No Ct	22.79	No Ct	23.98	No Ct	25.92	No Ct	35.20	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
2	22.10	21.08	29.95	28.67	28.10	31.71	22.33	No Ct	21.17	No Ct	21.95	No Ct	24.58	No Ct	37.25	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
3	26.39	26.54	31.38	31.90	34.58	33.31	24.78	No Ct	23.94	No Ct	26.21	No Ct	27.28	No Ct	37.32	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
4	21.47	19.47	29.47	27.35	31.48	29.26	21.61	No Ct	21.12	No Ct	21.42	No Ct	22.60	No Ct	34.94	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
5	23.50	21.91	30.14	29.98	32.19	30.85	23.16	No Ct	21.61	No Ct	22.55	No Ct	26.32	No Ct	35.54	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
6	20.51	19.57	28.91	27.04	31.01	29.71	21.65	No Ct	20.54	No Ct	21.29	No Ct	24.28	No Ct	35.34	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
7	22.99	21.73	30.86	28.90	33.58	31.31	24.16	No Ct	22.99	No Ct	24.06	No Ct	26.51	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
8	24.07	25.40	31.94	33.05	34.55	35.28	26.19	No Ct	24.12	No Ct	24.97	No Ct	26.22	No Ct	38.72	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
9	21.40	22.15	28.93	28.40	31.85	31.48	23.10	No Ct	22.93	No Ct	22.40	No Ct	25.25	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
10	21.12	21.00	28.18	27.97	31.64	30.16	22.07	No Ct	21.06	No Ct	22.02	No Ct	25.18	No Ct	36.15	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
11a	21.20	21.56	29.48	29.64	32.33	32.80	23.00	No Ct	21.58	No Ct	24.02	No Ct	24.90	No Ct	36.51	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
11b	22.12	21.93	30.56	29.39	33.97	33.25	24.06	No Ct	22.74	No Ct	24.72	No Ct	25.75	No Ct	37.74	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
12a	22.42	22.30	29.77	30.20	32.45	33.52	23.35	23.19	22.34	25.46	22.94	22.94	25.49	28.06	36.87	18.75	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
		TM:81.6		TM:81.6		TM:81.6		TM:80.1		TM:81.5		TM:81.4		TM:80.8		TM:86.6					
12b	22.42	21.85	29.77	29.03	32.45	32.05	23.35	No Ct	22.34	No Ct	22.94	No Ct	25.49	No Ct	36.87	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
13	23.16	21.79	30.37	29.06	33.13	32.25	24.77	No Ct	23.22	No Ct	24.19	No Ct	25.73	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
14	26.94	25.97	32.55	29.93	23.72	35.53	25.78	No Ct	25.33	No Ct	25.80	No Ct	27.63	No Ct	37.66	38.36	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
15	23.87	24.80	29.25	29.22	32.25	31.12	22.80	No Ct	22.68	No Ct	23.10	No Ct	24.57	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
16	24.65	24.58	31.93	31.45	35.18	34.43	25.25	No Ct	24.30	No Ct	25.62	No Ct	26.53	No Ct	36.73	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
17	19.86	18.41	27.60	25.51	30.42	29.11	21.55	No Ct	20.09	No Ct	20.62	No Ct	21.88	No Ct	33.60	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	

En color rojo se presentan los valores de Ct cuya interpretación es positiva, en azul las que fueron interpretadas de manera diferente entre los distintos lotes y en negro las muestras interpretadas como negativas, independientemente que algunas obtuvieron valor de Ct. En el caso del laboratorio 12a se indica la temperatura de melting (TM).

Tabla 6a. Valores obtenidos por cada laboratorio presentados como promedios (Media) de Ct, considerando los duplicados por lotes y entre lotes, su respectiva desviación estándar (SD) y coeficiente de Variación (CV) para la detección de la muestra HPR0a-1 mediante RT-qPCR.

Muestra HPR0a-1	Dentro de lote			Dentro de lote			Dentro de lote			Entre lotes		
	Lote A			Lote B			Lote C			Lote ABC		
Laboratorio	Media	SD	CV%	Media	SD	CV%	Media	SD	CV%	Media	SD	CV%
1	20.19	0.13	0.67%	20.97	0.02	0.10%	22.43	0.15	0.66%	21.19	1.02	4.82%
2	21.98	0.66	2.99%	20.45	0.26	1.28%	20.81	0.08	0.41%	21.08	0.78	3.71%
3	23.38	0.21	0.91%	25.92	0.43	1.66%	30.31	0.35	1.17%	26.54	3.15	11.86%
4	18.52	0.17	0.92%	19.48	0.02	0.11%	20.43	0.29	1.42%	19.47	0.87	4.44%
5	23.44	0.46	1.96%	21.33	0.11	0.50%	20.98	0.08	0.40%	21.91	1.21	5.51%
6	19.65	0.09	0.47%	19.65	0.11	0.54%	19.43	0.21	1.09%	19.57	0.16	0.81%
7	21.98	0.11	0.48%	21.16	0.59	2.81%	22.06	0.08	0.38%	21.73	0.52	2.40%
8	27.51	0.25	0.90%	24.32	0.40	1.63%	24.36	0.42	1.74%	25.40	1.66	6.53%
9	23.05	0.35	1.53%	22.60	0.00	0.00%	20.80	0.00	0.00%	22.15	1.08	4.86%
10	20.12	0.33	1.65%	21.39	0.25	1.19%	21.50	0.67	3.13%	21.00	0.77	3.68%
11a	21.41	0.20	0.92%	20.99	0.13	0.64%	22.27	0.65	2.92%	21.56	0.66	3.07%
11b	21.41	0.04	0.19%	20.80	0.03	0.14%	23.58	0.09	0.38%	21.93	1.31	5.97%
12a	21.73	0.04	0.20%	22.26	0.19	0.86%	22.92	0.49	2.13%	22.30	0.58	2.60%
12b	21.43	0.01	0.03%	21.84	0.06	0.26%	22.30	0.01	0.03%	21.85	0.39	1.78%
13	21.91	0.10	0.45%	21.02	0.08	0.40%	22.44	0.20	0.90%	21.79	0.65	2.99%
14	24.24	0.11	0.44%	28.26	1.12	3.95%	25.42	0.18	0.70%	25.97	1.92	7.39%
15	26.40	0.14	0.54%	25.35	0.35	1.39%	22.65	0.07	0.31%	24.80	1.74	7.01%
16	25.00	0.28	1.13%	24.25	0.07	0.29%	24.50	0.14	0.58%	24.58	0.37	1.51%
17	18.88	0.45	2.41%	17.83	0.11	0.60%	18.52	0.90	4.86%	18.41	0.66	3.57%

En amarillo los resultados que obtienen valores de desviación estándar superiores a 0,7 y valores de coeficiente de variación superiores al 5% dentro de cada lote. En rojo los resultados que obtienen valores de desviación estándar superiores a 2.33 y valores de coeficiente de variación superiores al 10% entre cada lote.

Tabla 6b. Valores obtenidos por cada laboratorio presentados como promedios (Media) de Ct, considerando los duplicados por lotes y entre lotes, su respectiva desviación estándar (SD) y coeficiente de Variación (CV) para la detección de la muestra HPR0a-2 mediante RT-qPCR.

Muestra HPR0a-2	Dentro de lote			Dentro de lote			Dentro de lote			Entre lotes		
	Lote A			Lote B			Lote C			Lote ABC		
Laboratorio	Media	SD	CV%	Media	SD	CV%	Media	SD	CV%	Media	SD	CV%
1	27.19	0.08	0.29%	28.41	0.13	0.47%	32.06	0.08	0.24%	29.22	2.27	7.76%
2	29.62	0.06	0.19%	28.67	0.25	0.89%	27.72	0.33	1.17%	28.67	0.87	3.03%
3	31.20	0.57	1.81%	31.89	0.28	0.89%	32.61	0.06	0.20%	31.90	0.69	2.16%
4	30.89	0.37	1.19%	26.21	0.06	0.24%	24.95	0.07	0.28%	27.35	2.81	10.26%
5	26.33	0.58	2.20%	33.12	0.62	1.88%	30.50	0.22	0.72%	29.98	3.09	10.30%
6	27.10	0.07	0.26%	27.33	0.04	0.16%	26.68	0.05	0.19%	27.04	0.30	1.11%
7	29.00	0.06	0.20%	28.51	0.07	0.25%	29.18	0.25	0.87%	28.90	0.33	1.15%
8	35.66	0.13	0.36%	31.45	0.72	2.29%	32.05	0.59	1.85%	33.05	2.08	6.29%
9	29.25	0.07	0.24%	28.75	0.35	1.23%	27.20	0.42	1.56%	28.40	0.99	3.48%
10	28.27	0.25	0.88%	27.95	0.50	1.80%	27.70	0.62	2.25%	27.97	0.45	1.62%
11a	29.28	0.01	0.05%	28.86	0.20	0.69%	30.77	0.19	0.62%	29.64	0.90	3.05%
11b	29.43	0.30	1.01%	28.61	0.18	0.62%	30.13	0.70	2.34%	29.39	0.77	2.62%
12a	30.29	0.10	0.33%	30.24	0.03	0.09%	30.08	0.21	0.68%	30.20	0.14	0.48%
12b	28.95	0.08	0.29%	29.06	0.10	0.34%	29.09	0.17	0.58%	29.03	0.12	0.40%
13	29.43	0.09	0.31%	28.26	0.08	0.30%	29.50	0.10	0.33%	29.06	0.63	2.16%
14	29.62	0.38	1.29%	30.19	0.16	0.52%	29.97	0.25	0.85%	29.93	0.34	1.12%
15	29.65	0.07	0.24%	29.35	0.07	0.24%	28.65	0.07	0.25%	29.22	0.46	1.58%
16	31.75	0.07	0.22%	31.50	0.14	0.45%	31.10	0.14	0.45%	31.45	0.31	0.98%
17	25.29	0.06	0.24%	25.97	0.02	0.09%	25.27	0.01	0.02%	25.51	0.36	1.42%

En amarillo los resultados que obtienen valores de desviación estándar superiores a 0,7 y valores de coeficiente de variación superiores al 5% dentro de cada lote. En rojo los resultados que obtienen valores de desviación estándar superiores a 2.33 y valores de coeficiente de variación superiores al 10% entre cada lote.

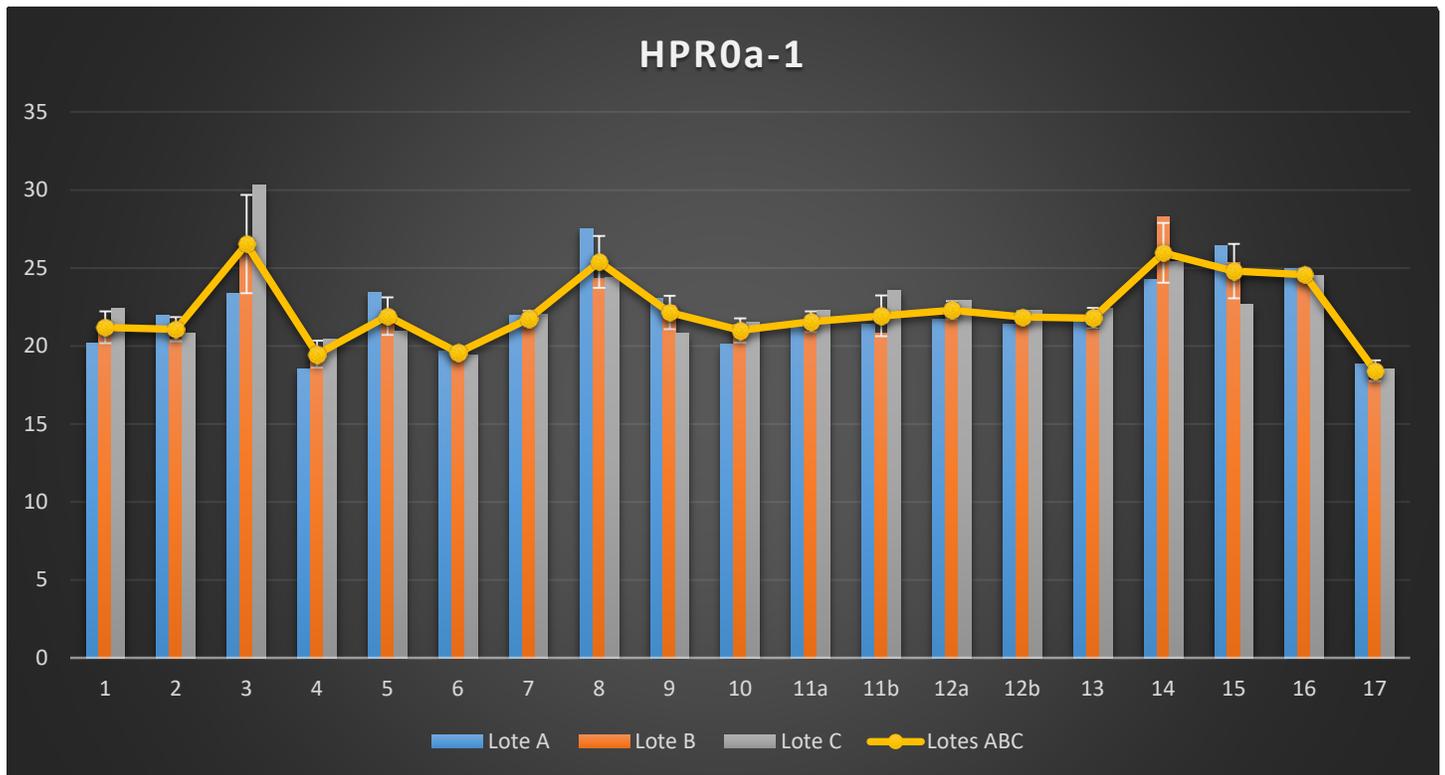
Tabla 6c. Valores obtenidos por cada laboratorio presentados como promedios (Media) de Ct, considerando los duplicados por lotes y entre lotes, su respectiva desviación estándar (SD) y coeficiente de Variación (CV) para la detección de la muestra HPR0a-3 mediante RT-qPCR.

Muestra HPR0a-3	Dentro de lote			Dentro de lote			Dentro de lote			Entre lotes		
	Lote A			Lote B			Lote C			Lote ABC		
Lab	Media	SD	CV%	Media	SD	CV%	Media	SD	CV%	Media	SD	CV%
1	29.09	0.53	1.82%	31.00	0.04	0.14%	32.15	0.21	0.64%	30.74	1.41	4.57%
2	30.06	0.65	2.16%	33.44	0.78	2.33%	31.64	0.10	0.31%	31.71	1.58	4.98%
3	33.04	0.18	0.54%	34.74	0.15	0.43%	32.16	0.35	1.08%	33.31	1.19	3.57%
4	28.95	0.18	0.64%	29.82	0.40	1.35%	29.00	0.23	0.78%	29.26	0.49	1.67%
5	28.62	0.34	1.19%	33.12	0.53	1.60%	30.83	0.25	0.80%	30.85	2.03	6.59%
6	29.39	0.25	0.84%	29.79	0.09	0.31%	29.96	0.29	0.97%	29.71	0.32	1.06%
7	31.38	0.28	0.90%	30.93	0.06	0.18%	31.62	0.18	0.56%	31.31	0.35	1.11%
8	36.49	0.26	0.72%	34.11	0.53	1.55%	35.25	0.57	1.60%	35.28	1.13	3.19%
9	33.00	0.14	0.43%	31.70	0.57	1.78%	29.75	0.07	0.24%	31.48	1.49	4.72%
10	29.71	0.48	1.62%	30.56	0.35	1.16%	30.21	0.57	1.90%	30.16	0.53	1.76%
11a	32.16	0.30	0.92%	33.55	1.07	3.20%	32.69	0.27	0.82%	32.80	0.81	2.47%
11b	33.08	0.27	0.80%	34.68	1.34	3.87%	31.99	0.02	0.06%	33.25	1.36	4.08%
12a	33.73	0.30	0.90%	33.01	0.09	0.28%	33.83	0.06	0.17%	33.52	0.43	1.27%
12b	32.04	0.10	0.31%	31.82	0.05	0.16%	32.29	0.08	0.24%	32.05	0.22	0.68%
13	32.55	0.25	0.78%	31.19	0.21	0.66%	33.00	0.04	0.13%	32.25	0.86	2.67%
14	34.94	0.13	0.36%	36.11	0.18	0.51%	No Ct	-	-	35.53	0.69	1.94%
15	31.40	0.28	0.90%	31.00	0.14	0.46%	30.97	0.09	0.30%	31.12	0.26	0.84%
16	33.80	0.14	0.42%	34.85	1.06	3.04%	34.65	0.21	0.61%	34.43	0.70	2.03%
17	29.76	0.36	1.21%	28.69	0.42	1.47%	28.88	0.17	0.59%	29.11	0.58	1.98%

En amarillo los resultados que obtienen valores de desviación estándar superiores a 0,7 y valores de coeficiente de variación superiores al 5% dentro de cada lote. En rojo los resultados que obtienen valores de desviación estándar superiores a 2.33 y valores de coeficiente de variación superiores al 10% entre cada lote.

En cuanto a la reproducibilidad de los diferentes ensayos utilizados por los participantes, se observa que las diferencias de Ct observadas entre los diferentes laboratorios para la misma muestra se encuentran en rangos aceptables si se considera que entre laboratorios se utilizan diferentes métodos, equipos, reactivos, etc. En los siguientes gráficos se aprecia claramente lo mencionado.

Gráfico 1. Análisis de ISAV HPR0 en las muestras correspondientes a la dilución HPR0a-1. En el eje Y mediante columnas se indican los valores de Ct por cada lote y mediante una línea el valor promedio de Ct para la muestra con su respectiva desviación estándar. En el eje X los laboratorios participantes codificados según tabla 3.



En el gráfico 1 se observa que la mayoría de los valores de las medias de los lotes se encuentran entre el Ct 20 y 25, excepto por los laboratorios 3, 8 y 14 que sobrepasan levemente este valor y los laboratorios 4, 6 y 17 que se encuentran sutilmente por debajo del rango.

En el gráfico 2 se observa que la mayoría de los valores de las medias de los lotes se encuentran entre el Ct 27 y 31, excepto por el laboratorio 8 que sobrepasa levemente este valor y el laboratorio 17 que se encuentran sutilmente por debajo del rango.

En el gráfico 3 se observa que la mayoría de los valores de las medias de los lotes se encuentran entre el Ct 30 y 35, excepto por los laboratorios 8 y 14 que sobrepasan levemente este valor y los laboratorios 4, 6 y 17 que se encuentran sutilmente por debajo del rango.

Gráfico 2. Análisis de ISAV HPR0 en las muestras correspondientes a la dilución HPR0a-2. En el eje Y mediante columnas se indican los valores de Ct por cada lote y mediante una línea el valor promedio de Ct para la muestra con su respectiva desviación estándar. En el eje X los laboratorios participantes codificados según tabla 3.

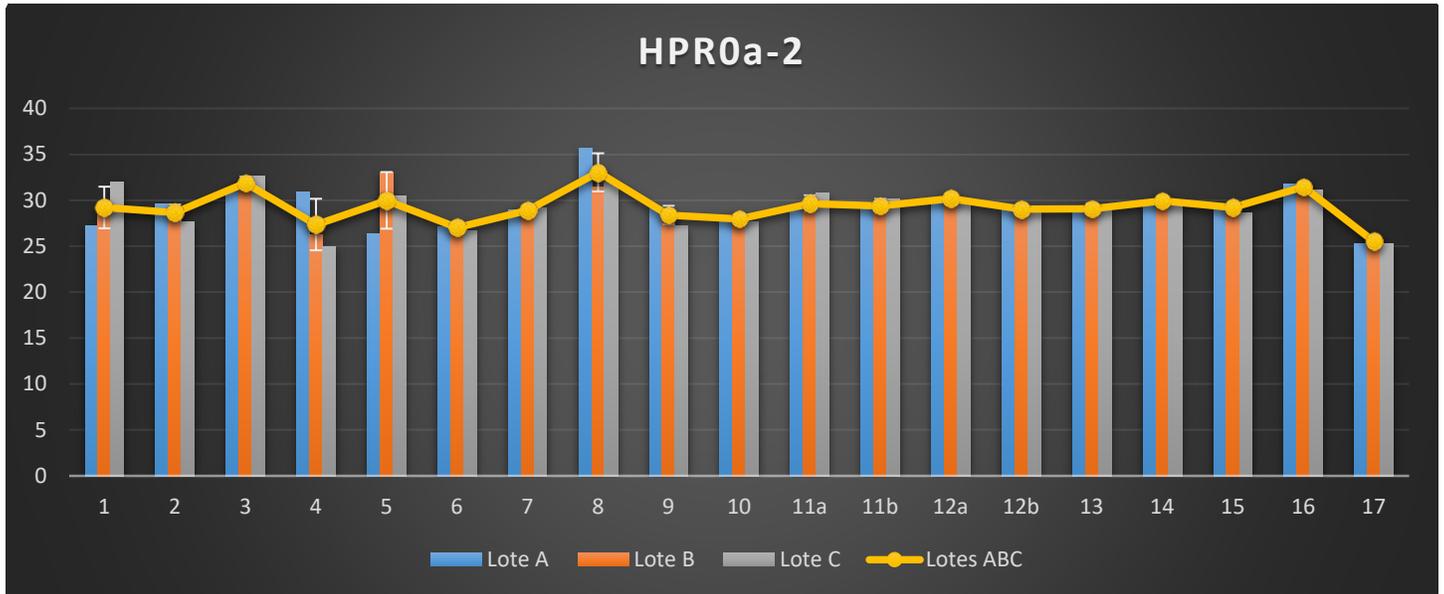
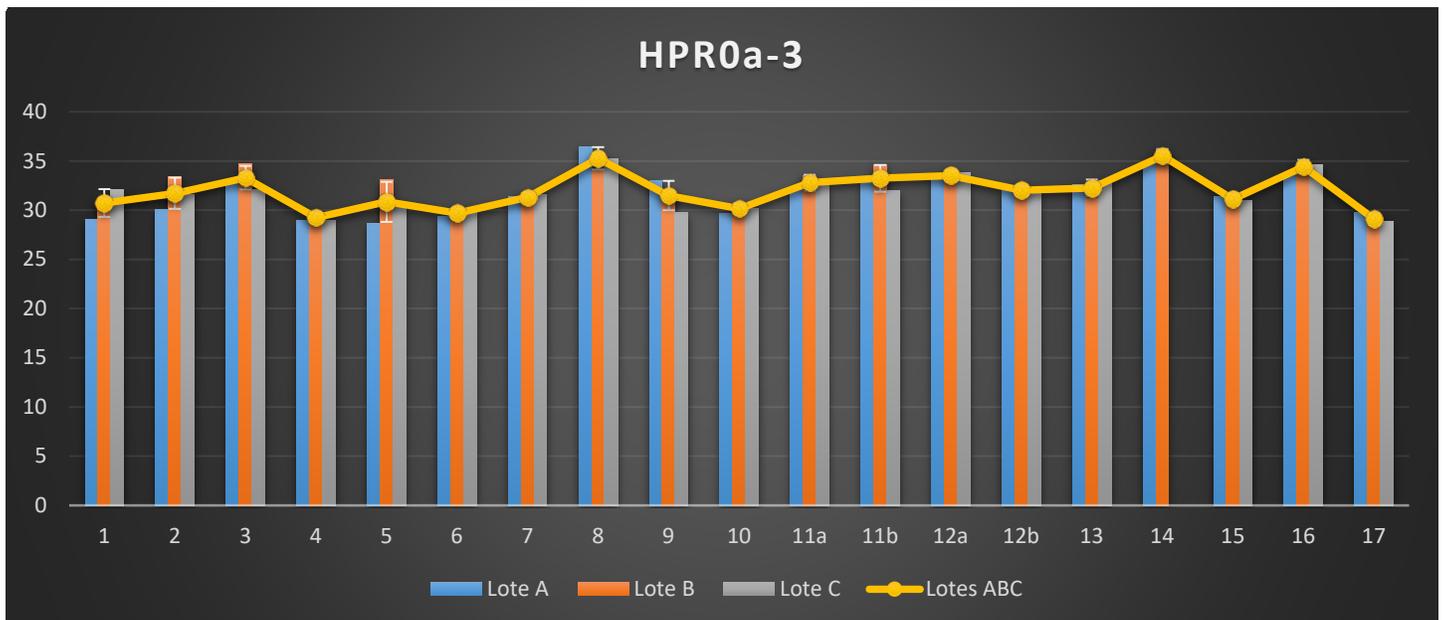
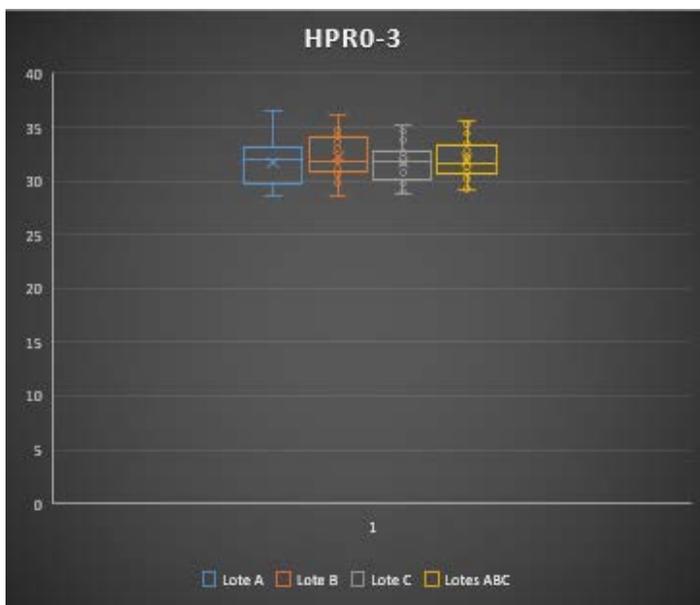
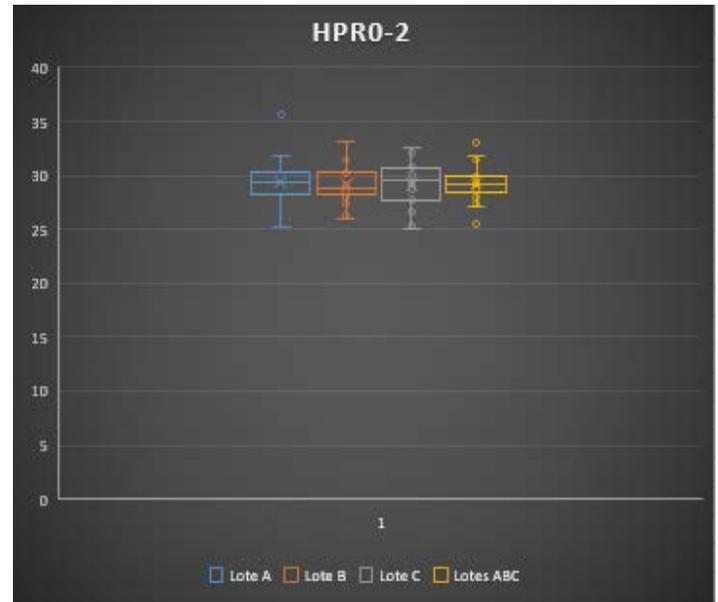
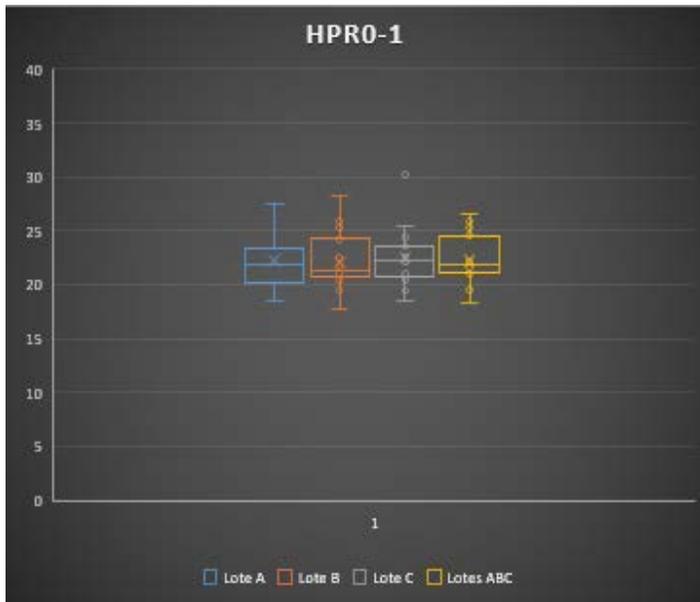


Gráfico 3. Análisis de ISAV HPR0 en las muestras correspondientes a la dilución HPR0a-3. En el eje Y mediante columnas se indican los valores de Ct por cada lote y mediante una línea el valor promedio de Ct para la muestra con su respectiva desviación estándar. En el eje X los laboratorios participantes codificados según tabla 3.



En los gráficos de cajas y bigotes (gráficos 4, 5 y 6) se representa la distribución de los datos en percentiles donde la caja que representa cada lote incluye el 50% de los datos y luego los bigotes el 25% superior e inferior.

Gráficos 4, 5 y 6. Análisis según cuartiles de ISAV HPR0 en las muestras correspondientes a la dilución HPR0a-1 (gráfico 4), dilución HPR0a-2 (grafico 5) y a la dilución HPR0a-3 (gráfico 6). En el eje Y se indican los valores de Ct y cada caja de color indica los valores por cada lote (azul, naranja y gris lotes A, B y C respectivamente) y caja de color naranja los valores promedio de Ct para la muestra considerando los tres lotes.



En esta representación se observa que los datos están agrupados en su mayoría en rangos de valores de Ct acotados (5 como máximo) y muy pocos datos se escapan ya sea para arriba o para debajo de este rango.

5. Conclusiones

Los resultados reportados demuestran que todos los métodos evaluados para la detección específica de la variante HPRO del virus ISA, cumplen su objetivo, lo que se fundamenta en el hecho que se interpretan e informan como positivas las muestras correspondientes a la variante HPRO en sus tres diluciones y como negativas el resto de las muestras que no corresponden a la variante HPRO o a los controles negativos, lo que indica que no existe reacción cruzada entre dicha variante y el resto de las variantes enviadas.

Asimismo, podemos mencionar que los valores de desviación estándar entre los duplicados se encuentran dentro de un rango esperable para esta técnica (Introducción a PCR en tiempo real, Llanos, 2006).

Cabe señalar, que, si bien los valores de Ct pueden utilizarse como un indicador, estos no son comparables entre diferentes laboratorios, debido a los distintos procedimientos, kits y equipos utilizados.

Por otra parte, mencionar que 3 de los 17 participantes (1, 7 y 15) enviaron enmiendas a sus resultados, estas en ningún caso alteran el resultado ya que se trató en las tres oportunidades de errores de digitación.



Dr. Sergio Marshall
Director del Laboratorio de patógenos Acuícolas
Laboratorio de Referencia ISAV y *P. salmonis*
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso