



## **INFORME DE LA REUNIÓN ELECTRÓNICA DEL GRUPO AD HOC DE LA OIE SOBRE EL VIRUS DE LA TILAPIA DEL LAGO<sup>1</sup>**

**Septiembre de 2019-Septiembre de 2021**

El Grupo *ad hoc* de la OIE sobre el virus de la tilapia del lago (TiLV) continuó su trabajo por vía electrónica entre septiembre de 2019 y septiembre de 2021. Este trabajo se retrasó debido a las restricciones impuestas por el SARS-COV 2. La lista de participantes figura en el [Anexo 1](#).

El mandato de este grupo *ad hoc* consistía en evaluar el diagnóstico y la validación del TiLV. Desde su convocación en noviembre de 2017, el grupo trabaja con el fin de:

- evaluar los métodos, publicados o sin publicar, para la detección del TiLV;
- describir el nivel de validación de cada método y determinar los requisitos adicionales de validación;
- recomendar cualquier prueba adicional cuyo desarrollo se imponga, y
- facilitar la obtención y distribución del material de control positivo bien caracterizado destinado a la evaluación de los métodos y su implementación y la realización dos estudios comparativos entre laboratorios.

Este informe detalla el trabajo de validación de pruebas del grupo *ad hoc*, de sus conclusiones y recomendaciones basadas en dos rondas de estudios de comparación interlaboratorios. Las estimaciones en cuanto a la exactitud y la precisión obtenidas durante estas rondas son limitadas y se requiere una validación adicional con muestras de campo, con el fin de obtener estimaciones más sólidas de la sensibilidad del diagnóstico y la especificidad del diagnóstico (respectivamente DSe y DSp, por sus siglas en inglés).

En 2019, se llevó a cabo una primera ronda del panel de comparación interlaboratorios de la OIE para el método PCR del virus del lago de la tilapia y los resultados figuran en el [Anexo 2](#). La segunda ronda se llevó a cabo en 2021 y los resultados figuran en el [Anexo 3](#). En ambas rondas, las pruebas se realizaron de forma anónima y con muestras ciegas.

### **Resultados y recomendaciones**

Las pruebas del panel de comparación interlaboratorios sobre TiLV se llevaron a cabo en dos etapas o rondas. En la Ronda 1, participaron dos laboratorios y se realizaron cuatro ensayos moleculares y, en la Ronda 2, intervinieron siete laboratorios y se llevaron a cabo cuatro ensayos moleculares. Las recomendaciones del grupo *ad hoc* se basan en los resultados de las pruebas de ambas rondas.

Durante las dos rondas de comparación interlaboratorios, se evaluó la capacidad de tres pruebas PCR en tiempo real y una prueba convencional PCR anidada, con el fin de detectar de forma fiable el TiLV en una comparación interlaboratorios utilizando un panel de 30 muestras. Todas las pruebas dieron los resultados esperados y se pudo detectar el TiLV con varios niveles de precisión. La precisión general de los resultados indica la solidez y robustez de las pruebas evaluadas en un total de siete laboratorios de América del Norte, Sudamérica, África, Europa y Australia. La especificidad de todas las pruebas se aproximó al 100 % en todos los laboratorios.

---

<sup>1</sup> Nota: Este informe debe leerse al mismo tiempo que el informe de la reunión de septiembre de 2021 de la Comisión de Normas Sanitarias para los Animales Acuáticos, puesto que integra las consideraciones y observaciones de dicha comisión: <https://www.oie.int/es/que-hacemos/normas/proceso-de-establecimiento-de-normas/comision-para-los-animales-acuaticos/>

Las dos pruebas PCR en tiempo real con sondas, los métodos RT-qPCR del CEFAS y RT-qPCR del Dr. Hong tuvieron la mayor sensibilidad, repetibilidad y solidez de todas las pruebas evaluadas y se recomiendan para detectar el TiLV.

La prueba PCR con el colorante fluorescente SYBR (RT-qPCR descrita por Tattiyapong) produjo resultados aceptables, pero requerirá la optimización de los reactivos y las condiciones y la definición de los criterios de interpretación del ensayo, antes de su implementación para su uso rutinario. Sin embargo, esta prueba también mostró una sensibilidad, repetibilidad y solidez aceptables y se considera apropiada para su uso en laboratorios sin acceso a las pruebas en tiempo real con sondas.

La prueba convencional PCR anidada (RT-nPCR descrita por el Dr. Dong) resultó ser la menos sensible, lo que es usual cuando se comparan los ensayos convencionales y aquellos en tiempo real. La prueba RT-nPCR del Dr. Dong también servirá para las pruebas de confirmación de las muestras que resulten positivas por PCR en tiempo real, con el fin de confirmar la presencia de TiLV mediante el análisis de secuencias, cuando se investigue la enfermedad clínica o como prueba de seguimiento de las muestras que resulten positivas al PCR en tiempo real a partir de las pruebas de vigilancia de animales aparentemente sanos. Debe determinarse la sensibilidad comparativa, ya que las muestras seleccionadas como positivas al PCR en tiempo real pueden generar valores de  $C_T$  por encima de los límites de detección de la RT-nPCR.

Durante la evaluación inicial de la información publicada y la evaluación de las pruebas en tiempo real en el laboratorio AFDL (Australian Centre for Disease Preparedness Fish Disease Laboratory), parte integrante de la Organización de Investigación Científica e Industrial del Commonwealth (CSIRO), la RT-qPCR descrita por Waiyamitra demostró una sensibilidad reducida basada en los estudios del límite de detección y fue excluida de los ensayos utilizados durante las pruebas interlaboratorios. Esta prueba se incluyó en la evaluación por un laboratorio durante la prueba de panel para la Ronda 1 y un laboratorio durante la prueba de panel para la Ronda 2. En su mayoría, los resultados obtenidos con la prueba descrita por Waiyamitra fueron comparables a los obtenidos por estos laboratorios con los métodos del CEFAS y del Dr. Hong, por lo que la prueba de Waiyamitra también puede constituir una RT-qPCR adicional en tiempo real que podría utilizarse para el cribado de la presencia del TiLV.

**En base a los resultados brindados en este informe, el grupo *ad hoc* considera que las cuatro pruebas permitirán cumplir el criterio 3 del Capítulo 1.2. “Criterios de inclusión de enfermedades, infecciones e infestaciones en la lista de la OIE”, del Código Acuático.**

#### **Agradecimientos**

El grupo *ad hoc* agradece a todos los participantes su aporte y pericia en la revisión de los métodos, publicados o no, el intercambio de los aislados de TiLV para producir muestras de panel y la disponibilidad para colaborar en las dos rondas de comparación interlaboratorios, que proporcionaron los resultados para la evaluación en este informe.

---

.../Anexos

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

Septiembre de 2019-Septiembre de 2021

### Liste de participantes

#### MIEMBROS DEL GRUPO *AD HOC*

---

**Dr. Axel Colling** (Chair)  
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  
CHINA  
Tel.: 86-755-25588410  
LiuHong@szciq.gov.cn  
709274714@qq.com

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

**Dra. Mona Dverdal Jansen**  
Veterinarian, Researcher, PhD  
Norwegian Veterinary Institute  
PO Box 64, 1433 Ås  
NO-1433 Ås  
NORUEGA  
Tel.: + 47 23 21 60 00  
Tel.: + 47 934 99 808  
mona-dverdal.jansen@vetinst.no  
www.vetinst.no

**Dr. Sergio Hernan Marshall Gonzalez**  
Pontificia Universidad Católica  
de Valparaiso  
Av. Brazil 2950  
Valparaiso  
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**  
Group Leader - CSIRO ACDP 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. Avi Eldar**  
Head, Fish Disease Laboratory  
The Veterinary Services-Kimron Vet.  
Inst.  
Agricultural Ctr.  
POB 50250  
ISRAEL  
eldar@moag.gov.il

#### REPRESENTANTE DE LA COMISIÓN DE NORMAS SANITARIAS PARA LOS ANIMALES ACUÁTICOS

---

**Dr. Edmund Peeler** (vicepresidente hasta mayo de 2021)  
Group Manager Aquatic Pest & Pathogens  
CEFAS  
Barrack Road, Weymouth  
Dorset, DT4 8UB UK  
REINO UNIDO  
ed.peeler@cefes.co.uk

SEDE DE LA OIE

---

**Dra. Gillian Mylrea**  
Jefa adjunta  
Departamento de Normas  
g.mylrea@oie.int

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

**PANEL DE COMPARACIÓN INTERLABORATORIO DE LA OIE CON EL OBJETIVO  
DE PONER A PRUEBA MÉTODOS QUE INTEGREN TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR (PCR)  
(RONDA 1)  
FEBRERO A SEPTIEMBRE DE 2019**

**Resumen**

El laboratorio AFDL (ACDP, Fish Disease Laboratory) recibió muestras de TiLV de Perú y Tailandia, pero sólo los virus de Tailandia se consideraron viables. Su cultivo fue exitoso y permitió la multiplicación del virus y la preparación de las muestras positivas para las pruebas de aptitud. El AFDL realizó pruebas para detectar agentes adventicios, evaluar la estabilidad y la homogeneidad, y realizar experimentos preliminares de validación, con el fin de evaluar la sensibilidad analítica (ASe), la especificidad analítica (ASp) y la repetibilidad. Debido a un cambio de circunstancias imprevisibles, sólo dos laboratorios, el AFDL y el CEFAS (Centre for Environment and Fisheries and Aquaculture Science), pudieron realizar pruebas de los métodos de biología molecular en el panel de 30 muestras irradiadas con rayos gamma, tal y como está previsto en el marco de las pruebas interlaboratorio. Junto con el panel de comparación interlaboratorio, se facilitaron instrucciones detalladas relativas al desarrollo del procedimiento para la realización de pruebas y para la comunicación de los resultados. Los resultados obtenidos, presentados de forma detallada en el presente informe, permitieron la evaluación y comparación preliminar de las diferentes pruebas prioritarias para su adecuación al objetivo previsto. Según dichos resultados, el método RT-qPCR de Hong *et al.* era la prueba más sensible y fiable.

**Recomendaciones**

A pesar de que la sede de la OIE se haya comprometido en el seguimiento del proyecto y que haya contactado varias veces a los miembros del grupo *ad hoc* para recordarles las obligaciones y la importancia de analizar el panel de muestras utilizando diferentes técnicas de biología molecular, sólo dos laboratorios pudieron llevar a cabo la comparación interlaboratorios. Por lo tanto, la información recopilada puede considerarse como preliminar. Es necesario ponerse en contacto con los miembros del grupo *ad hoc* (en lo posible a través de la OIE) para evaluar el índice de participación y determinar si se realizará otra ronda de comparación interlaboratorios. En consecuencia, deberán preverse tiempo y costos adicionales, lo que permitirá corroborar las constantes preliminares y evaluar la exactitud y la precisión de manera más fiable. Quizá sea necesario contactar con otros laboratorios colaboradores y obtener otros aislados de TiLV en el AFDL, lo que representaría un importante paso a seguir para evaluar de manera exacta la DSe.

***Amplificación del TiLV y producción del material de control positivo para los laboratorios por parte de los miembros del grupo ad hoc***

El aislado tailandés (designado con el número 18-03492) se confirmó como TiLV a través de una prueba con el método RT-nPCR descrito por Dong *et al.* (2017), con modificaciones para que fuera coherente con los protocolos de prueba del AFDL. La secuencia del amplicón de 415 pb fue aislada en gel y analizada. Esta secuencia se comparó con las que figuran en la base de datos NCBI de la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). La búsqueda de homología mostró que el porcentaje de identidad entre las secuencias nucleotídicas del amplicón reducido a 375 pb con las secuencias de dos aislados de Israel, el “Tilapia lake virus isolate Til-4-2011 segment 3 (KU751816.1)” y el “Tilapia lake virus clone 7450 (KJ605629.1)”, era del 94,7%. El aislado resultó negativo tras las pruebas de agentes adventicios para el virus del herpes koi (KHV), el virus de la necrosis nerviosa (NNV) y el virus de la necrosis infecciosa del bazo y del riñón/iridovirus del besugo (ISKNV/RSIV). El TiLV se amplificó en cultivos celulares E-11. Para garantizar la adecuación del material utilizado para la constitución del panel de comparación interlaboratorios, el valor límite inferior (= concentración más pequeña de virus que se pueda cuantificar) se determinó por dilución decimal de las muestras, lo que se realizó para cada uno de los métodos que implementaban las técnicas de biología molecular empleadas. Se evaluó la comparación de la ASe, la ASp y la repetibilidad de los ensayos moleculares.

El sobrenadante del cultivo celular previamente clarificado se irradió con rayos gamma a 50kGy y se analizó para determinar el grado de degradación del ARN del TiLV causado por las irradiaciones.

***Panel de comparación interlaboratorio***

El panel de comparación interlaboratorio está compuesto por 20 muestras positivas y 10 negativas que incluyen:

- Seis muestras obtenidas por dilución decimal en serie para poder estimar la eficacia de los ensayos con técnicas de biología molecular (PCR en tiempo real);
- Positivo fuerte (al menos 2 muestras);
- Positivo moderado (al menos 2 muestras);
- Positivo débil (al menos 2 muestras);

- Muestras obtenidas por dilución decimal en serie de muestras con positivos moderados y débiles;
- Muestras positivas con diversas concentraciones de los títulos virales para conformar las 20 muestras positivas;
- Muestras negativas, preparadas a partir del sobrenadante de los cultivos celulares no infectados (10 muestras).

Las muestras se prepararon a partir del sobrenadante de cultivo celular irradiado con rayos gamma con un volumen de 50µL para su extracción y prueba. Para cada una de las distintas pruebas, se almacenaron múltiples alícuotas a -80°C. Los laboratorios participantes recibieron las muestras ciegas en forma de tubos numerados, y lo ideal era que cada panel se analizara dos veces. El hecho de no indicar explícitamente la composición prevista del panel no constituía una prueba de la capacidad de los laboratorios de los miembros del grupo *ad hoc*, sino que simplemente es una buena práctica de laboratorio proporcionar muestras "ciegas" a los participantes que realizan este tipo de evaluación. Los resultados se comunicaron al presidente del grupo *ad hoc* para que los cotejara y los comunicara en formato no codificado a los laboratorios participantes para debate. El uso de muestras duplicadas y de diluciones decimales de las muestras deberá permitir el análisis estadístico para determinar la repetibilidad y la reproducibilidad, en caso de que sea suficiente el número de laboratorios participantes.

La prueba de homogeneidad de las muestras se llevó a cabo utilizando 10 alícuotas para cada una de las distintas concentraciones. El coeficiente de variación inferior al 5 % indica una homogeneidad satisfactoria de las muestras cuando se analizan con el método RT-qPCR del Dr. Hong (Anexo 1). Se realizaron pruebas de estabilidad en tres alícuotas por muestra, durante periodos de tiempo diferentes (una, dos y cuatro semanas) y temperaturas distintas (-20°C, 4°C, 25°C y 37°C). Esto debía garantizar la ausencia de problemas de estabilidad vinculadas con los retrasos en el transporte del panel de comparación interlaboratorios a los laboratorios de los miembros del grupo *ad hoc*. No se registró ningún efecto significativo en la estabilidad de las muestras conservadas a -20°C, 4°C y 25°C durante cuatro semanas (anexos 2 a 7). Se observó que el material conservado a 37°C se había mantenido estable durante una semana, pero que los valores de  $C_T$  habían aumentado a las dos y cuatro semanas. También se planificó la realización de pruebas de estabilidad de las alícuotas almacenadas en el AFDL, una vez que todos los laboratorios hubieran comunicado sus resultados.

El panel inicial destinado a la comparación interlaboratorios se obtuvo a partir de distintas diluciones de una sola solución que contenía un solo tipo de aislado de TiLV. En el caso de otros aislados de TiLV, provenientes de distintas zonas geográficas, se necesitaría proceder a nuevas pruebas para determinar la A<sub>Sp</sub> y la A<sub>Se</sub>. Se planificó una segunda ronda de pruebas del panel de comparación interlaboratorios.

De acuerdo a la revisión de la literatura y a las discusiones con los miembros del grupo *ad hoc*, los ensayos moleculares objeto de una evaluación en la primera ronda fueron:

1. Prueba RT-qPCR no publicada del Dr. David Stone (CEFAS)
2. Prueba de RT-qPCR con sondas, sin publicar, y facilitada al grupo *ad hoc* por el Dr. Hong Liu
3. Técnica de RT-qPCR y el colorante fluorescente SYBR, descrita por Tattiyapong *et al.*, 2017.
4. Prueba convencional semi-anidada (RT-nPCR) descrita por Dong *et al.*, 2017. Este ensayo utiliza cebadores diseñados por Eyngor *et al.*, 2014 con modificaciones descritas por Tsofack *et al.*, 2017.

## Resultados

### ***Resultados de las pruebas del panel de comparación interlaboratorio sobre TiLV – Pruebas RT-qPCR para el virus de la tilapia del lago***

Las pruebas de interlaboratorio fueron realizadas por el AFDL y el CEFAS. El laboratorio n°2 comunicó los resultados de las pruebas realizadas en días diferentes (Prueba 1 y Prueba 2). Los resultados se comunicaron en forma de datos cuantitativos (valor del  $C_T$ ) y cualitativos (positivo o negativo). Los siguientes cuadros incluyen los resultados compilados de las pruebas comunicadas por el AFDL y el CEFAS, ya sea para el método RT-qPCR del Dr. Hong (Cuadro 1) o el RT-qPCR del TiLV del CEFAS (Cuadro 2) o el método que asocia la técnica de RT-qPCR con el colorante SYBR de Tattiyapong *et al.* (Cuadro 3). El AFDL también sometió a prueba el método RT-qPCR de Waiyemitra *et al.* (2018) (Cuadro 4).

### ***Resultados de las pruebas del panel de comparación interlaboratorio sobre TiLV – Pruebas PCR convencionales anidadas del virus de la tilapia del lago***

El AFDL y el CEFAS llevaron a cabo las pruebas del panel de comparación interlaboratorios sobre el TiLV. Los resultados se comunicaron en forma de datos cualitativos (positivo o negativo). El Laboratorio 2 comunicó los resultados de las pruebas realizadas en días diferentes (Prueba 1 y Prueba 2). Los resultados compilados de las pruebas comunicadas por el AFDL y el CEFAS para el método RT-nPCR de Dong de Dong *et al.*, (2017) figuran en el Cuadro 5.

## Referencias

DONG, H.T., SIRIROOB, S., MEEMETTA, W., SANTIMANAWONG, W., GANGNONNGIW, W., PIRARAT, N., KHUNRAE, P., RATTANAROJPONG, T., VANICHVIRIYAKIT, R., & SENAPIN, S. (2017). Emergence of tilapia lake virus in Thailand and an alternative semi-nested RT-PCR for detection. *Aquaculture*, **476**, 111-118.

EYNGOR, M., ZAMOSTIANO, R., TSOFAK, J.E.K., BERKOWITZ, A., BERCOVIER, H., TINMAN, S., LEV, M., HURVITZ, A., GALEOTTI, M., BACHARACH, E. & ELДАР, A. (2014). Identification of a novel RNA virus lethal to tilapia. *Journal of Clinical Microbiology*. **52**, 4137.

TATTIYAPONG, P., SIRIKANACHANA, K. & SURACHETPONG, W. (2017). Development and validation of a reverse transcription quantitative polymerase chain reaction for tilapia lake virus detection in clinical samples and experimentally challenged fish. *Journal of Fish Diseases*, **41**, 255-261.

TSOFAK, J.E.K., ZAMOSTIANO, R., WATTED, S., BERKOWITZ, A., ROSENBLUTH, E., MICHRA, N., BRIESE, T., LIPKIN, W.I., KABUUSU, R.M., FERGUSON, H., DEL POZO, J., ELДАР, A. & BACHARACH, E. (2017). Detection of Tilapia Lake Virus in clinical samples by culturing and nested reverse transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, **55**, 759.

WAIYAMITRA, P., TATTIYAPONG, P., SIRIKANACHANA, K., MONGKOLSUK, S., NICHOLSON, P. & SURACHETPONG, W. (2018). A TaqMan RT-qPCR assay for tilapia lake virus (TiLV) detection in tilapia. *Aquaculture*, **497**, 184-188.

**Cuadro 1.** Resultados cualitativos y cuantitativos comunicados por los laboratorios que hayan recurrido al método RT-PCR del Dr. Hong en el panel de muestras de TiLV

Muestras		Laboratorio 1 – Resultados comunicados		Laboratorio 2 - Resultados reportados			
		Ct-promedio	Interpretación	Prueba 1		Prueba 2	
				Ct-promedio	Interpretación	Ct-promedio	Interpretación
1	Negativo	Und	NEG	Und	NEG	Und	NEG
2	Positivo fuerte 2	23.9	POS	29.4	POS	29.1	POS
3	Positivo fuerte 2	23.9	POS	30.0	POS	29.1	POS
4	Positivo débil 2	33.9	POS	40.6	IDT	39.1	POS
5	Positivo débil 2	34.0	POS	39.2	POS	39.3	POS
6	Negativo	Und	NEG	Und	NEG	Und	NEG
7	Positivo débil 2	33.9	POS	39.1	POS	38.5	POS
8	Positivo débil 2	33.8	POS	38.8	POS	39.1	POS
9	Positivo moderado 1	27.3	POS	32.6	POS	32.5	POS
10	Positivo débil 1	32.5	POS	38.0	POS	38.3	POS
11	Positivo fuerte 1	20.5	POS	25.9	POS	25.7	POS
12	Negativo	Und	NEG	Und	NEG	Und	NEG
13	Negativo	Und	NEG	Und	NEG	Und	NEG
14	Negativo	Und	NEG	Und	NEG	Und	NEG
15	Negativo	Und	NEG	Und	NEG	Und	NEG
16	Positivo moderado 1	27.1	POS	33.2	POS	36.7	POS
17	Positivo moderado 1	27.2	POS	26.0	POS	34.3	POS
18	Negativo	Und	NEG	Und	NEG	Und	NEG
19	Positivo débil 1	32.6	POS	38.8	POS	38.4	POS
20	Positivo débil 1	32.7	POS	38.0	POS	38.0	POS
21	Positivo fuerte 1	20.8	POS	25.8	POS	25.5	POS
22	Positivo fuerte 2	23.9	POS	33.9	POS	28.2	POS
23	Positivo moderado 2	30.6	POS	36.5	POS	35.9	POS
24	Negativo	Und	NEG	Und	NEG	Und	NEG
25	Positivo fuerte 1	20.6	POS	26.0	POS	25.7	POS
26	Positivo débil 1	32.6	POS	38.5	POS	37.3	POS
27	Positivo moderado 2	30.6	POS	36.2	POS	36.2	POS
28	Positivo moderado 2	30.6	POS	36.7	POS	38.2	POS
29	Negativo	Und	NEG	Und	NEG	Und	NEG
30	Negativo	Und	NEG	Und	NEG	Und	NEG

**Cuadro 2.** Resultados cualitativos y cuantitativos para los laboratorios que utilizaron el método RT-qPCR del CEFAS en el panel de muestras de TiLV

Muestras		Laboratorio 1 – Resultados comunicados		Laboratorio 2 - Resultados reportados			
		C <sub>T</sub> -promedio	Interpretación	Prueba 1		Prueba 2	
				C <sub>T</sub> -promedio	Interpretación	C <sub>T</sub> -promedio	Interpretación
1	Negativo	Und	NEG	Und	NEG	Und	NEG
2	Positivo fuerte 2	27.1	POS	29.7	POS	29.3	POS
3	Positivo fuerte 2	27.2	POS	30.2	POS	29.4	POS
4	Positivo débil 2	38.4	POS	Und	NEG	40.1	IDT
5	Positivo débil 2	37.0	POS	Und/39.8	IDT	Und/41.2	IDT
6	Negativo	Und	NEG	Und	NEG	Und	NEG
7	Positivo débil 2	37.6	POS	Und	NEG	Und/39.7	IDT
8	Positivo débil 2	37.4	POS	Und/39.7	IDT	39.6	POS
9	Positivo moderado 1	30.5	POS	32.6	POS	32.8	POS
10	Positivo débil 1	36.5	POS	37.7	POS	37.5	POS
11	Positivo fuerte 1	23.9	POS	26.0	POS	25.9	POS
12	Negativo	Und	NEG	Und	NEG	Und	NEG
13	Negativo	Und	NEG	Und	NEG	Und	NEG
14	Negativo	Und	NEG	Und	NEG	Und	NEG
15	Negativo	Und	NEG	Und	NEG	Und	NEG
16	Positivo moderado 1	30.3	POS	33.5	POS	34.9	POS
17	Positivo moderado 1	30.4	POS	34.9	POS	34.8	POS
18	Negativo	Und	NEG	Und	NEG	Und	NEG
19	Positivo débil 1	36.0	POS	39.3	POS	Und	NEG
20	Positivo débil 1	35.4	POS	38.2	POS	37.4	POS
21	Positivo fuerte 1	24.2	POS	26.2	POS	25.6	POS
22	Positivo fuerte 2	27.2	POS	29.4	POS	28.8	POS
23	Positivo moderado 2	34.1	POS	36.9	POS	36.5	POS
24	Negativo	Und	NEG	Und	NEG	Und	NEG
25	Positivo fuerte 1	23.9	POS	27.1	POS	25.4	POS
26	Positivo débil 1	36.7	POS	38.0	POS	37.0	POS
27	Positivo moderado 2	33.7	POS	36.8	POS	36.0	POS
28	Positivo moderado 2	33.7	POS	37.7	POS	36.4	POS
29	Negativo	Und	NEG	Und	NEG	Und	NEG
30	Negativo	Und	NEG	Und	NEG	Und	NEG



**Cuadro 3.** Resultados cualitativos y cuantitativos comunicados por los laboratorios que hayan utilizado la técnica RT-qPCR y el colorante SYBR de Tattiyapong et al. (2017b) en el panel de pruebas para el TiLV

Muestras		Laboratorio 1 – Resultados comunicados		Laboratorio 2 - Resultados reportados			
		C <sub>T</sub> -promedio	Interpretación	Prueba 1		Test 2	
				C <sub>T</sub> -promedio	Interpretación	C <sub>T</sub> -promedio	Interpretación
1	Negativo	38.9*	NEG	Und	NEG	Und	NEG
2	Positivo fuerte 2	19.0	POS	26.5	POS	26.4	POS
3	Positivo fuerte 2	19.1	POS	26.9	IDT	26.5	POS
4	Positivo débil 2	29.1	POS	36.7	POS	34.6	IDT
5	Positivo débil 2	29.2	POS	Und	NEG	Und/36.4	IDT
6	Negativo	35.4*	NEG	Und	NEG	Und	NEG
7	Positivo débil 2	29.3	POS	Und/35.2	IDT	Und/34.8	IDT
8	Positivo débil 2	29.2	POS	Und	NEG	Und	NEG
9	Positivo moderado 1	22.2	POS	30.5	POS	29.7	IDT
10	Positivo débil 1	28.0	POS	34.1	IDT	34.5	IDT
11	Positivo fuerte 1	15.9	POS	26.3	IDT	22.9	POS
12	Negativo	Und	NEG	Und	NEG	Und	NEG
13	Negativo	39.9*	NEG	Und	NEG	Und	NEG
14	Negativo	35.9*	NEG	Und	NEG	Und	NEG
15	Negativo	37.5*	NEG	37.3	IDT	Und	NEG
16	Positivo moderado 1	22.1	POS	30.2	POS	32.5	IDT
17	Positivo moderado 1	22.4	POS	33.0	POS	30.9	IDT
18	Negativo	40.2*	NEG	Und	NEG	Und	NEG
19	Positivo débil 1	28.1	POS	35.0	POS	36.1	POS
20	Positivo débil 1	28.4	POS	34.2	IDT	34.6	IDT
21	Positivo fuerte 1	16.0	POS	22.7	IDT	23.3	IDT
22	Positivo fuerte 2	19.3	POS	25.9	IDT	26.2	IDT
23	Positivo moderado 2	25.8	POS	33.5	IDT	33.1	IDT
24	Negativo	Und	NEG	Und	NEG	Und	NEG
25	Positivo fuerte 1	15.8	POS	24.1	POS	22.8	POS
26	Positivo débil 1	28.1	POS	34.4	POS	33.8	IDT
27	Positivo moderado 2	25.8	POS	32.9	IDT	33.2	IDT
28	Positivo moderado 2	26.0	POS	33.7	IDT	34.4	IDT
29	Negativo	35.6*	NEG	Und	NEG	Und	NEG
30	Negativo	35.7*	NEG	Und	NEG	Und	NEG

\*amplificación no-específica

**Cuadro 4.** Resultados cualitativos y cuantitativos comunicados por los laboratorios que hayan utilizado el método RT-qPCR de Waiyamitra et al., (2018) en las muestras de TiLV.

Muestras		Resultados comunicados por el AFDL	
		Ct-promedio	Interpretación
1	Negativo	Und	NEG
2	Positivo fuerte 2	23.1	POS
3	Positivo fuerte 2	23.2	POS
4	Positivo débil 2	36.5	POS
5	Positivo débil 2	36.9	POS
6	Negativo	Und	NEG
7	Positivo débil 2	39.4	POS
8	Positivo débil 2	38.1	POS
9	Positivo moderado 1	26.7	POS
10	Positivo débil 1	33.4	POS
11	Positivo fuerte 1	20.2	POS
12	Negativo	Und	NEG
13	Negativo	Und	NEG
14	Negativo	Und	NEG
15	Negativo	Und	NEG
16	Positivo moderado 1	26.6	POS
17	Positivo moderado 1	26.6	POS
18	Negativo	Und	NEG
19	Positivo débil 1	33.3	POS
20	Positivo débil 1	33.4	POS
21	Positivo fuerte 1	20.4	POS
22	Positivo fuerte 2	23.4	POS
23	Positivo moderado 2	30.5	POS
24	Negativo	Und	NEG
25	Positivo fuerte 1	20.3	POS
26	Positivo débil 1	33.0	POS
27	Positivo moderado 2	30.3	POS
28	Positivo moderado 2	30.2	POS
29	Negativo	Und	NEG
30	Negativo	Und	NEG

**Cuadro 5.** Resultados cualitativos comunicados que hayan utilizado el método RT-nPCR de Dong et al., (2017) en el panel de muestras de TiLV

Muestras		Laboratorio 1 - Resultados comunicados	Laboratorio 2 - Resultados comunicados	
			Prueba 1	Prueba 2
		Interpretación	Interpretación	Interpretación
1	Negativo	NEG	NEG	NEG
2	Positivo fuerte 2	POS	POS	POS
3	Positivo fuerte 2	POS	POS	POS
4	Positivo débil 2	POS	NEG	NEG
5	Positivo débil 2	POS	IDT	POS
6	Negativo	NEG	NEG	NEG
7	Positivo débil 2	POS	POS	NEG
8	Positivo débil 2	POS	POS	IDT
9	Positivo moderado 1	POS	POS	POS
10	Positivo débil 1	POS	IDT	POS
11	Positivo fuerte 1	POS	POS	POS
12	Negativo	NEG	NEG	IDT
13	Negativo	NEG	NEG	NEG
14	Negativo	NEG	NEG	NEG
15	Negativo	NEG	NEG	NEG
16	Positivo moderado 1	POS	POS	POS
17	Positivo moderado 1	POS	POS	POS
18	Negativo	NEG	NEG	NEG
19	Positivo débil 1	POS	POS	POS
20	Positivo débil 1	POS	POS	POS
21	Positivo fuerte 1	POS	POS	POS
22	Positivo fuerte 2	POS	POS	POS
23	Positivo moderado 2	POS	POS	POS
24	Negativo	NEG	NEG	NEG
25	Positivo fuerte 1	POS	POS	POS
26	Positivo débil 1	POS	POS	POS
27	Positivo moderado 2	POS	POS	POS
28	Positivo moderado 2	POS	POS	POS
29	Negativo	NEG	NEG	NEG
30	Negativo	NEG	NEG	NEG

**Apéndice 1.** Resultados de las pruebas de homogeneidad en las distintas diluciones utilizadas para la constitución del panel de muestras por parte del AFDL. Las pruebas se realizaron por medio del método RT-qPCR descrita por el Dr. Hong.

Muestra duplicada	Dilución 1	Dilución 2	Dilución 3	Dilución 4	Dilución 5	Dilución 6
1	20.79	24.16	27.47	30.77	32.91	34.14
2	20.84	24.20	27.31	30.69	32.82	34.21
3	20.72	24.10	27.42	30.76	32.82	34.27
4	20.81	24.12	27.31	30.96	32.74	34.15
5	20.74	24.16	27.44	30.76	33.04	34.27
6	20.71	24.09	27.44	30.84	33.06	34.12
7	20.58	24.00	27.42	30.67	33.10	34.52
8	20.60	24.12	27.39	30.75	32.91	34.48
9	20.69	24.13	27.41	30.84	32.86	34.20
10	20.65	24.06	27.37	30.74	32.95	34.34
<b>Promedio</b>	<b>20.714</b>	<b>24.114</b>	<b>27.398</b>	<b>30.778</b>	<b>32.921</b>	<b>34.244</b>
<b>Coefficiente de variación</b>	<b>0.29%</b>	<b>0.00%</b>	<b>0.17%</b>	<b>0.24%</b>	<b>0.29%</b>	<b>0.00%</b>
<b>ÉXITO/FRACASO</b>	<b>ÉXITO</b>	<b>ÉXITO</b>	<b>ÉXITO</b>	<b>ÉXITO</b>	<b>ÉXITO</b>	<b>ÉXITO</b>

**Apéndice 2.** Resultados de la prueba de estabilidad para las alícuotas del panel “Positivo Fuerte 1”. Las pruebas se realizaron con el método RT-qPCR descrita por el Dr. Hong. Los resultados marcados con gris son aquellos cuyo promedio es inaceptable.

Muestra	Homogeneidad	Temperatura	Una semana	Dos semanas	Cuatro semanas
Positivo fuerte 1	20.71	-20°C	20.50	21.56	20.88
Positivo fuerte 1		-20°C	20.49	21.51	20.91
Positivo fuerte 1		-20°C	20.47	21.50	20.99
Positivo fuerte 1		4°C	20.49	21.55	21.15
Positivo fuerte 1		4°C	20.50	21.57	21.09
Positivo fuerte 1		4°C	20.50	21.64	21.13
Positivo fuerte 1		25°C	20.82	21.82	22.37
Positivo fuerte 1		25°C	20.78	21.92	21.75
Positivo fuerte 1		25°C	20.95	21.90	21.82
Positivo fuerte 1		37°C	21.51	24.37	27.83
Positivo fuerte 1		37°C	21.75	24.97	27.82
Positivo fuerte 1		37°C	21.99	24.93	29.49

**Apéndice 3.** Resultados de la prueba de estabilidad de las alícuotas del panel “Positivo fuerte 2”, mediante la prueba RT-qPCR descrita por el Dr. Hong. Los resultados sombreados en gris son los que su promedio se considera inaceptable

Muestra	Homogeneidad	Temperatura	Una semana	Dos semanas	Cuatro semanas
Positivo fuerte 2	24.11	-20°C	23.86	24.95	24.51
Positivo fuerte 2		-20°C	23.91	24.84	24.47
Positivo fuerte 2		-20°C	23.97	24.89	24.47
Positivo fuerte 2		4°C	23.91	24.90	24.50
Positivo fuerte 2		4°C	23.79	24.99	24.34
Positivo fuerte 2		4°C	23.95	24.98	24.47
Positivo fuerte 2		25°C	24.11	25.30	25.95
Positivo fuerte 2		25°C	24.30	25.33	25.50
Positivo fuerte 2		25°C	24.19	25.44	25.51
Positivo fuerte 2		37°C	25.41	27.78	30.87
Positivo fuerte 2		37°C	25.04	29.04	32.41
Positivo fuerte 2		37°C	25.32	27.69	31.18

**Apéndice 4.** Resultados de la prueba de estabilidad realizadas para las alícuotas del panel del “Positivo moderado 1”, por medio de la prueba RT-qPCR descrita por el Dr. Hong. Los resultados sombreados en gris son aquellos cuyo promedio es inaceptable.

Muestra	Homogeneidad	Temperatura	Una semana	Dos semanas	Cuatro semanas
Positivo moderado 1	27.4	-20°C	27.17	28.10	27.65
Positivo moderado 1		-20°C	27.24	28.19	27.76
Positivo moderado 1		-20°C	27.21	28.14	27.76
Positivo moderado 1		4°C	27.25	28.21	27.84
Positivo moderado 1		4°C	27.23	28.26	27.87
Positivo moderado 1		4°C	27.30	28.28	27.92
Positivo moderado 1		25°C	27.62	28.92	28.68
Positivo moderado 1		25°C	27.39	28.90	29.23
Positivo moderado 1		25°C	27.54	28.88	29.18
Positivo moderado 1		37°C	28.29	31.22	33.58
Positivo moderado 1		37°C	28.50	31.18	35.14
Positivo moderado 1		37°C	28.50	30.51	35.41

**Apéndice 5.** Resultados de las pruebas de estabilidad realizadas para las alícuotas del panel “Positivo moderado 2”, utilizando el método RT-qPCR descrita por el Dr. Hong. Los resultados sombreados en gris son aquellos cuyo promedio es inaceptable.

Muestra	Homogeneidad	Temperatura	Una semana	Dos semanas	Cuatro semanas
Positivo moderado 2	30.78	-20°C	30.58	31.62	31.18
Positivo moderado 2		-20°C	30.65	31.63	31.20
Positivo moderado 2		-20°C	30.58	31.55	31.09
Positivo moderado 2		4°C	30.74	31.67	31.16
Positivo moderado 2		4°C	30.62	31.55	31.11
Positivo moderado 2		4°C	30.58	31.55	31.17
Positivo moderado 2		25°C	30.99	31.87	32.51
Positivo moderado 2		25°C	31.02	32.31	32.04
Positivo moderado 2		25°C	31.37	31.68	32.24
Positivo moderado 2		37°C	31.92	34.41	36.25
Positivo moderado 2		37°C	32.40	34.27	38.14
Positivo moderado 2		37°C	32.43	34.26	39.03

**Apéndice 6.** Resultados de la prueba de estabilidad realizado en las alícuotas del panel “Positivo débil 1”, mediante el método RT-qPCR descrito por el Dr. Hong. Los resultados sombreados en gris son aquellos cuyo promedio es inaceptable.

Muestra	Homogeneidad	Temperatura	Una semana	Dos semanas	Cuatro semanas
Positivo débil 1	32.92	-20°C	32.99	32.93	32.79
Positivo débil 1		-20°C	33.13	33.08	33.05
Positivo débil 1		-20°C	32.98	33.03	33.00
Positivo débil 1		4°C	33.12	33.17	33.04
Positivo débil 1		4°C	33.20	33.16	33.33
Positivo débil 1		4°C	33.05	33.11	33.26
Positivo débil 1		25°C	33.48	33.72	34.30
Positivo débil 1		25°C	33.43	33.62	34.20
Positivo débil 1		25°C	33.20	33.40	34.62
Positivo débil 1		37°C	34.16	37.05	Neg
Positivo débil 1		37°C	34.61	36.79	38.36
Positivo débil 1		37°C	34.70	36.34	39.36

**Apéndice 7.** Resultados de la prueba de estabilidad realizadas en las alícuotas del panel “Positivo débil 2”, mediante el método RT-qPCR descrito por el Dr. Hong. Los resultados sombreados en gris son aquellos cuyo promedio es inaceptable.

<b>Muestra</b>	<b>Homogeneidad</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Una semana</b>	<b>Dos semanas</b>	<b>Cuatro semanas</b>
Positivo débil 2	34.24	-20°C	34.33	34.48	34.23
Positivo débil 2		-20°C	34.66	34.34	34.65
Positivo débil 2		-20°C	34.49	34.50	34.22
Positivo débil 2		4°C	34.31	34.33	34.50
Positivo débil 2		4°C	34.42	34.53	34.79
Positivo débil 2		4°C	34.49	34.40	34.50
Positivo débil 2		25°C	35.09	35.12	35.94
Positivo débil 2		25°C	34.92	35.05	35.75
Positivo débil 2		25°C	35.11	34.89	Neg/40.05
Positivo débil 2		37°C	35.77	37.22	36.02
Positivo débil 2		37°C	35.89	36.84	Neg
Positivo débil 2		37°C	35.74	37.52	Neg/40.0

**PANEL DE COMPARACIÓN INTERLABORATORIO DE LA OIE PARA LA PRUEBA PCR  
DEL VIRUS DE LA TILAPIA DEL LAGO  
(RONDA 2)**

**ENERO A AGOSTO DE 2021**

**Resumen**

El objetivo de la **prueba del panel de comparación interlaboratorios para la identificación del TiLV (Ronda 2)** era evaluar la exactitud y precisión de cuatro métodos que aplican técnicas de biología molecular y determinar y comparar su fiabilidad para producir resultados positivos en presencia del virus y resultados negativos en ausencia del virus en un panel de 20 muestras positivas y 10 negativas y verificar que no se ven afectados por factores internos y externos (por ejemplo, diferentes operadores, entornos de laboratorio en diferentes regiones y países). De esta forma, el objetivo de la **segunda ronda de comparación interlaboratorio** no era la realización de pruebas de aptitud, sino la evaluación de la fiabilidad de los resultados del ensayo.

Los resultados cuantitativos y cualitativos generales de la segunda ronda mostraron que los métodos del CEFAS y del Dr. Hong presentaban un alto grado de precisión y exactitud. Tratándose del método que implementa el colorante fluorescente SYBR y el método de Dong *et al.* (2017), sus resultados muestran una fiabilidad reducida para la detección de muestras “positivas débiles” o “positivas moderadas” en ciertos laboratorios. La buena precisión general de los resultados indica una buena solidez y robustez de los ensayos cuando se evaluaron en un total de siete laboratorios de América del Norte, Sudamérica, África, Europa y Australia. Todos los laboratorios notificaron, para el conjunto de los métodos testeados, una especificidad del 100 %. Casi todas las muestras resultaron negativas en todos los ensayos, lo que también constituye un indicador de la eficacia del flujo de trabajo y de la ausencia de contaminación cruzada. Sólo dos muestras negativas dieron “falso positivo” en dos laboratorios con el método del Dr. Hong (laboratorio n° 2, muestra n°26) y con el colorante fluorescente SYBR (laboratorio n°6, muestra n°14). Los resultados de este proyecto con un número limitado de muestras (n=30) indican que todas las pruebas pueden detectar el TiLV en muestras positivas y no detectarlo en las muestras negativas.

Debido a las restricciones asociadas a la crisis sanitaria (SARS-CoV 2), la segunda ronda se postergó a 2021, la lista de los laboratorios participantes se tuvo que cambiar y cuatro nuevos participantes se unieron al grupo. No obstante, los resultados globales obtenidos respectivamente durante la Ronda 1 y la Ronda 2 son comparables, lo que indica una fiabilidad aceptable.

Las instrucciones para los participantes de la segunda ronda fueron idénticas a las de la primera, que incluían un documento con información sobre las muestras y las pruebas, un archivo Excel para la introducción de los resultados y un correo electrónico previo en el que se avisaba de que este panel contenía las hojas de trabajo del ACDP (Australian Centre for Disease Preparedness) para los ensayos. Los resultados esperados para los métodos cuantitativos se comunicaron como valores  $C_T$  (medidos por duplicado y con un cálculo del promedio) y se interpretaron como positivos y negativos. La descripción detallada del desarrollo de la prueba y la extracción se comunicó por medio de una hoja de cálculo de Excel junto con los resultados.

De acuerdo con los resultados de la revisión de la literatura y la comparación interlaboratorios de la primera ronda, se concluyó que los métodos que apliquen métodos con técnicas de biología molecular debían ser objeto de una evaluación durante la segunda ronda fueron:

1. Técnica RT-qPCR no publicada del Dr. David Stone (CEFAS)
2. Técnica RT-qPCR con sondas, sin publicar hasta el día de hoy, y comunicada al grupo *ad hoc* por el Dr. Hong Liu;
3. Técnica RT-qPCR y el colorante fluorescente SYBR, descrita por Tattiyapong *et al.*, 2017.
4. Técnica RT-nPCR convencional y semi-anidada descrita por Dong *et al.*, 2017. Este ensayo utiliza cebadores diseñados por Eynigor *et al.*, 2014 con modificaciones descritas por Tsofack *et al.*, 2017.

Tras los resultados alentadores de las pruebas de panel de comparación interlaboratorios del TiLV para la Ronda 1 realizadas en 2019 por el AFDL y el CEFAS, a lo largo de 2020, se produjo una comunicación continua entre los laboratorios participantes para coordinar el mejor momento para realizar las pruebas. Esta coordinación fue necesaria debido a las restricciones de acceso a los laboratorios debido a la pandemia mundial de SARS-CoV-2. La pandemia también provocó problemas de transporte debido a la reducción de los vuelos de las aerolíneas, lo que dificultó el envío de los paneles.



## Materiales y métodos

### Calendario

El panel de comparación interlaboratorio de la segunda ronda, compuesto por 30 muestras, se envió a los siete laboratorios participantes en abril de 2021 (Cuadro 1). Se proporcionaron instrucciones detalladas para realizar los ensayos y una hoja de cálculo de Excel para introducir los resultados y la información técnica para los informes. Se pidió que los resultados se recibieran en junio de 2021 para su análisis. El objetivo era incluir los resultados en el informe de progreso para la reunión de la OIE sobre TiLV en septiembre de 2021. Se solicitó a los participantes que realizaran una única extracción por duplicado y que informaran de los resultados individuales, de los valores promedio de  $C_T$  (cuando procediera) y de la interpretación de los resultados (“positivo”, “negativo”, “indeterminado”).

**Cuadro 1.** Lista de los laboratorios participantes en la Ronda 2

<b>Australia</b> Peter Mohr ACDP Fish Diseases Laboratory CSIRO Australian Centre for Disease Preparedness Geelong, Victoria, Australia	<b>Brasil</b> Marcelo Fernandes Camargos Laboratório Federal de Defesa Agropecuária Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Pedro Leopoldo, Brazil
<b>China (República Popular)</b> Hong Liu The National Key laboratory of Aquatic Animal Diseases, Animal and Plant Inspection and Quarantine Technical Centre, Shenzhen City, Guangdong province, China	<b>Dinamarca</b> Argelia Cuenca EURL for Fish and Crustacean Diseases Technical University of Denmark Kgs. Lyngby, Dinamarca
<b>Sudáfrica</b> Marco Romito ARC-Onderstepoort Veterinary Institute Onderstepoort, Sudáfrica	<b>Reino Unido</b> David Stone CEFAS Barrack Road, Weymouth, Dorset, RU
<b>Estados Unidos de América</b> Janet Warg National Veterinary Services Laboratories Ames, Iowa, Estados Unidos de América	

### Muestras

El panel de comparación interlaboratorio sobre TiLV de la Ronda 2 incluyó 30 muestras de diferente concentración de analitos de 200  $\mu$ l cada una (9 muestras negativas, 9 muestras positivas débiles, 6 muestras positivas moderadas, 6 muestras positivas fuertes, véase Cuadro 2). Las muestras se enviaron en hielo seco, utilizando una empresa comercial de mensajería internacional con cadena de frío sin interrupción. También se incluyó una alícuota de 1 mL de material altamente positivo, en caso de que los laboratorios quisieran llevar a cabo cualquier evaluación preliminar del ensayo antes de probar los paneles de muestras.

La homogeneidad de las muestras se determinó utilizando 10 alícuotas para cada una de las diferentes concentraciones. El coeficiente de variación era inferior al 5 %, lo que garantizaba una homogeneidad satisfactoria de las muestras testeadas. Para evaluar la homogeneidad, las muestras se probaron el método RT-qPCR del Dr. Hong. Todas las alícuotas de las muestras, para cada dilución, pasaron la prueba de homogeneidad (Apéndice 2.1). Estaba previsto realizar una prueba de estabilidad para controlar la estabilidad de las alícuotas conservadas por el AFDL. Debido a las limitaciones de tiempo, esto no fue posible. Sin embargo, se realizaron pruebas de muestras (tres muestras/dilución) antes de la constitución de los paneles de la segunda ronda. Todos los resultados comunicados eran equivalentes a los obtenidos en las pruebas de homogeneidad, lo que indica una estabilidad aceptable (es decir, que no se produjo ninguna degradación de las muestras) durante el almacenamiento de las muestras entre ambas rondas.

**Cuadro 2.** Distribución de las muestras negativas, positivas débiles, moderadas y fuertes en el panel de comparación entre laboratorios. Durante la preparación del panel, los valores de  $C_T$  se utilizaron para clasificar de forma arbitraria las muestras como negativas y positivas débiles (31-35), moderadas (25-31) y fuertes (20-25).

1	Positivo moderado 1	16	Positivo débil 2
2	Positivo débil 1	17	Negativo
3	Negativo	18	Positivo fuerte 1
4	Negativo	19	Positivo débil 2
5	Negativo	20	Positivo moderado 2
6	Positivo fuerte 2	21	Positivo moderado 2
7	Positivo fuerte 1	22	Positivo débil 1
8	Positivo débil 1	23	Positivo fuerte 2
9	Negativo	24	Positivo moderado 2
10	Negativo	25	Positivo débil 2
11	Positivo moderado 1	26	Negativo
12	Positivo débil 2	27	Positivo débil 1
13	Positivo moderado 1	28	Positivo fuerte 1
14	Negativo	29	Positivo fuerte 2
15	Positivo débil 2	30	Negative

### Resultados de los análisis estadísticos

Los resultados se recibieron y almacenaron en archivos Excel. El análisis estadístico se realizó mediante la comparación de gráficos de variables múltiples y el análisis de Youden en MedCalc versión 20.009 - © 2021 MedCalc Software Ltd, <https://www.medcalc.org/>.

### Resultados

Seis países comunicaron resultados para poner a prueba el método RT-qPCR del CEFAS y el RT-qPCR del Dr. Hong (con hidrólisis de sondas). Cinco países proporcionaron resultados para poner a prueba el método RT-qPCR (asociado a la utilización del colorante SYBR) de Tattiyapong *et al.*, 2017 y el método RT-nPCR (prueba RT-PCR anidada convencional) de Dong *et al.*, 2017. Se asignó un número a cada laboratorio (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7) que se proporciona cuando el informe codificado se envía por correo electrónico a los participantes en aras de confidencialidad.

La síntesis resume los resultados obtenidos para las pruebas con métodos RT-qPCR en la Figura 1, que muestra la distribución de los resultados (valores de  $C_T$ ) de los siete laboratorios que hayan probado los tres métodos de RT-qPCR (respectivamente del CEFAS, del Dr. Hong y de Tattiyapong *et al.*, 2017) de las 30 muestras del panel. La codificación es el método RT-qPCR del CEFAS se designa como “CEFAS” y la del Dr. Hong como “Hong” y la de Tattiyapong *et al.*, 2017 como “SYBR”.

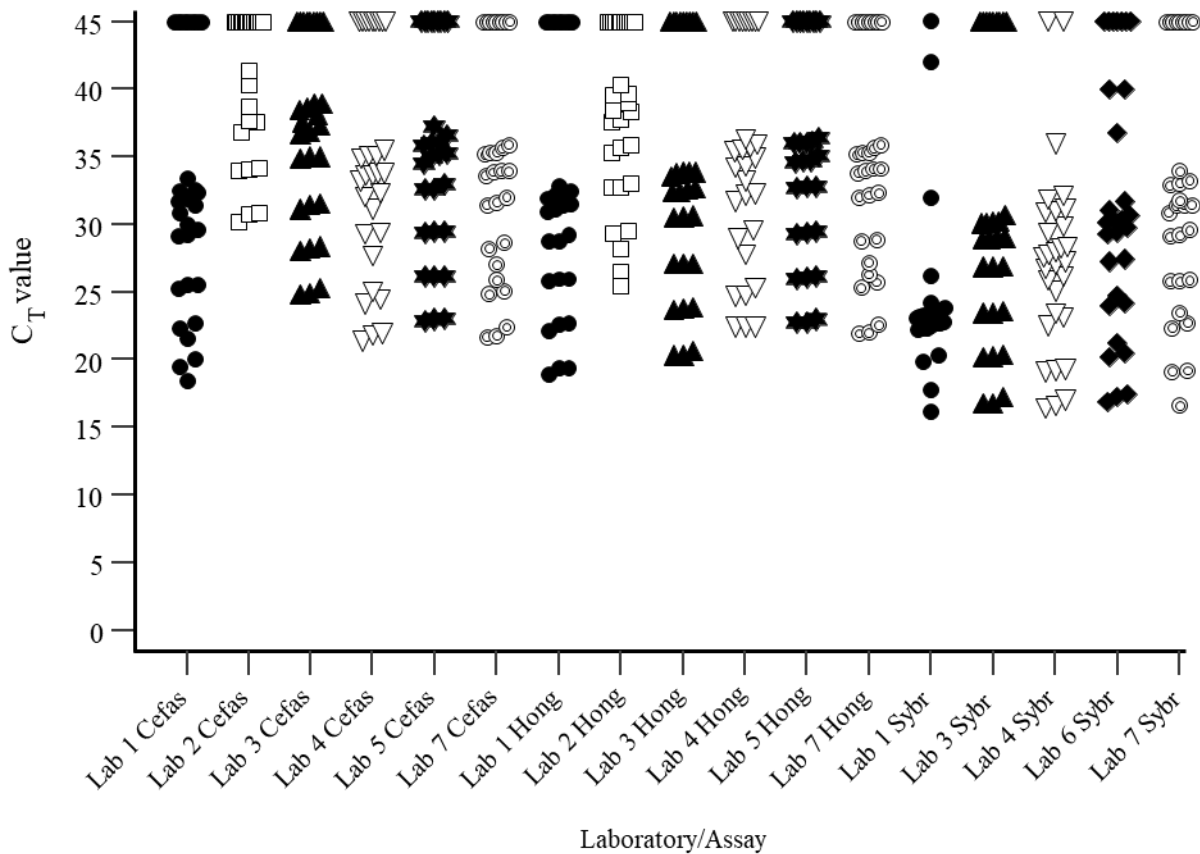


Figura 1. Distribución de los valores de  $C_T$  obtenidos para cada laboratorio según el método RT-qPCR testeado en el marco de esta evaluación.

A continuación, se presentan los comentarios específicos sobre el rendimiento de cada uno de los ensayos.

#### **Método RT-qPCR del CEFAS**

Seis laboratorios comunicaron resultados correspondientes al método RT-qPCR del CEFAS (Laboratorios 1, 2, 3, 4, 5, 7). Los resultados se presentan en el Cuadro 3.

**Cinco de los seis laboratorios participantes tuvieron una concordancia del 100 % en cuanto a la exactitud y una buena precisión general** (laboratorios 1, 3, 4, 5, 7). El laboratorio n°2 obtuvo valores de  $C_T$  sistemáticamente más altos, demostrando una disminución de la sensibilidad del método y una reducción de la concordancia de sus resultados (11/30 resultados falsos negativos y 2/30 resultados indeterminados). Sin embargo, las discordancias sólo se observaron debido a los resultados falsos negativos obtenidos en las muestras positivas con ningún falso positivo en las muestras negativas. Generalmente, la mayoría de los falsos positivos se obtuvieron de las muestras con resultado positivo débil o moderado. En estas circunstancias, la prueba puede pasar por alto un resultado positivo débil o moderado. El problema de la disminución de la sensibilidad del método RT-qPCR del CEFAS y su rendimiento, observado en el Laboratorio 2, puede resolverse si modifica los reactivos utilizados. En términos generales, la concordancia de los resultados proporcionados por los otros laboratorios (100 % de concordancia en cinco laboratorios) indica una fiabilidad aceptable del método RT-qPCR del CEFAS. Los valores del coeficiente de variación, calculados a partir del análisis de las medidas del  $C_T$  para los replicados de muestras con resultado débil, moderado y fuerte, eran inferiores al 5 %, lo que demostró que las pruebas destinadas a testar el método RT-qPCR del CEFAS presentaban una repetibilidad satisfactoria (Apéndice 1.1.).

#### **Método RT-qPCR del Dr. Hong**

Seis laboratorios comunicaron resultados para testar el método RT-qPCR del Dr. Hong (laboratorios 1, 2, 3, 4, 5, 7). Los resultados se presentan en el Cuadro 4.

**Cinco de los seis laboratorios participantes tuvieron una concordancia del 100% en cuanto a la exactitud y una buena precisión general** (laboratorios 1, 3, 4, 5, 7). El laboratorio n°2 obtuvo valores de  $C_T$  sistemáticamente más altos, demostrando una disminución de la sensibilidad del método y una reducción de la concordancia de sus resultados (4/30 resultados falsos negativos y 7/30 resultados indeterminados). Sin embargo, las discordancias sólo se observaron debido

a los resultados falsos negativos obtenidos en las muestras positivas con **un falso positivo** para una muestra negativa. Generalmente, la mayoría de los falsos positivos se obtuvieron de las muestras con resultado positivo débil o moderado. En estas circunstancias, la prueba puede pasar por alto un resultado positivo débil o moderado. El problema de la disminución de la sensibilidad del método RT-qPCR del Dr. Hong y su rendimiento, observado en el Laboratorio 2, puede resolverse si modifica los reactivos utilizados. En términos generales, la concordancia de los resultados proporcionados por los otros laboratorios (100 % de concordancia en cinco laboratorios) indica una fiabilidad aceptable del método RT-qPCR del Dr. Hong. Los valores del coeficiente de variación, calculados a partir del análisis de las medidas del  $C_T$  para los replicados de muestras con resultado débil, moderado y fuerte, eran inferiores al 5 %, lo que demostró que las pruebas destinadas a testar el método RT-qPCR del Dr. Hong presentaban una repetibilidad satisfactoria (Apéndice 1.2.).

#### ***Método RT-qPCR con el colorante fluorescente SYBR, descrito por Tattiyapong et al.***

Cinco laboratorios comunicaron resultados para testar el método RT-qPCR con el colorante SYBR de Tattiyapong *et al.*, (2017) (laboratorios 1, 3, 4, 6, 7). Los resultados se presentan en el Cuadro 5.

**Los laboratorios participantes 3, 4 y 7 tuvieron una concordancia del 100% en cuanto a la exactitud y una buena precisión general.** El laboratorio n°1 obtuvo una sensibilidad baja (8/30 resultados falsos negativos y 2/30 resultados indeterminados). El laboratorio n°6 obtuvo dos resultados falso negativo y **un resultado falso positivo**. Varios laboratorios indicaron que no utilizaban el método RT-qPCR con el colorante SYBR y que preferían los métodos RT-qPCR con sondas, que permiten mejorar la especificidad del método. Dichos laboratorios optimizaron poco o nada los procedimientos de realización de la prueba como hubieran debido hacerlo al utilizarlos como rutina. Los laboratorios también indicaron que el método RT-qPCR con el colorante SYBR requería un análisis más riguroso de los resultados, con el fin de garantizar que la fluorescencia medida se podía atribuir al agente patógeno y no era el resultado de una amplificación no específica. En general, la concordancia de los resultados suministrados por los laboratorios (concordancia de los resultados en tres laboratorios) indica que el método RT-qPCR con el colorante SYBR descrito por Tattiyapong *et al.*, (2017) presenta una fiabilidad aceptable en términos de sensibilidad. Sin embargo, los laboratorios que quieren aplicar este método deben, antes de aplicarlo como rutina, optimizar el procedimiento de implementación y establecer criterios adicionales para mejorar la aceptabilidad de los resultados (por ejemplo, análisis de las curvas de fusión). Si bien los valores del coeficiente de variación calculados para testar el método RT-qPCR con el colorante SYBR a partir de las medidas del  $C_T$  para los replicados de muestras con resultado positivo débil, moderado y fuerte eran superiores a las calculadas por las pruebas de los métodos RT-qPCR del CEFAS y del Dr. Hong, se mantenían inferiores al 8 %, lo que demostró que las pruebas destinadas a testar el método RT-qPCR con el colorante SYBR presentaban una repetibilidad satisfactoria (Apéndice 1.3.).

#### ***Método RT-nPCR del Dong et al., (2017)***

Seis laboratorios testearon el método RT-nPCR de Dong *et al.*, (2017) (laboratorios 1, 2, 3, 4, 5, 7). Los resultados se presentan en el Cuadro 6.

**Los laboratorios 3, 4 y 5 tuvieron una concordancia del 100 % en cuanto a la exactitud y la buena precisión general.** El laboratorio n°1 tuvo dos resultados indeterminados y 2/30 resultados falsos negativos obtenidos en muestras positivas. El laboratorio n°2 tuvo una baja sensibilidad para el método RT-nPCR de Dong *et al.*, (2017) y produjo 12/30 resultados falsos negativos en muestras positivas. El laboratorio n°7 obtuvo tres resultados indeterminados y 4/30 falsos negativos en muestras positivas. Basándose en los resultados proporcionados, la RT-nPCR Dong *et al.*, (2017) tiene una sensibilidad reducida en la detección de muestras positivas débiles, en comparación con los ensayos en tiempo real utilizados en esta comparación entre laboratorios.

**Cuadro 3.** Resultados cuantitativos y cualitativos de los laboratorios que utilizaron la prueba RT-qPCR del CEFAS (\*el valor promedio de  $C_T$  se calculó a partir de un solo valor  $C_T$ ; los resultados marcados en amarillo están clasificados en la categoría incorrecta).

Muestras	LAB 1		LAB 2		LAB 3		LAB 4		LAB 5		LAB 7		
	$C_T$ - promedio	INT	$C_T$ - promedio	INT	$C_T$ - promedio	INT	$C_T$ - promedio	INT	$C_T$ - promedio	INT	$C_T$ - promedio	INT	
1	Positivo moderado 1	25.22	POS	37.65	POS	31.14	POS	29.28	POS	29.44	POS	27.04	POS
2	Positivo débil 1	29.97	POS	45	NEG	37.56	POS	33.62	POS	35.22	POS	33.61	POS
3	Negativo	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG
4	Negativo	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG
5	Negativo	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG
6	Positivo fuerte 2	21.52	POS	33.96	POS	28.03	POS	24.99	POS	26.16	POS	25.92	POS
7	Positivo fuerte 1	18.48	POS	30.76	POS	24.81	POS	21.81	POS	22.84	POS	21.77	POS
8	Positivo débil 1	30.80	POS	45	NEG	36.86	POS	33.81	POS	34.48	POS	33.95	POS
9	Negativo	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG
10	Negativo	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG
11	Positivo moderado 1	25.55	POS	36.85	POS	31.56	POS	27.65	POS	29.33	POS	28.22	POS
12	Positivo débil 2	31.88	POS	41.40*	NEG	38.93	POS	33.65	POS	36.05	POS	35.65	POS
13	Positivo moderado 1	25.60	POS	37.58	IDT	31.49	POS	29.32	POS	29.52	POS	28.61	POS
14	Negativo	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG
15	Positivo débil 2	32.33	POS	45	NEG	38.49	POS	35.11	POS	36.59	POS	35.35	POS
16	Positivo débil 2	32.55	POS	45	NEG	38.97	POS	35.50	POS	35.84	POS	35.33	POS
17	Negativo	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG
18	Positivo fuerte 1	20.05	POS	30.18	POS	24.95	POS	21.97	POS	22.98	POS	21.67	POS
19	Positivo débil 2	33.37	POS	45	NEG	38.61	POS	34.86	POS	35.98	POS	35.19	POS
20	Positivo moderado 2	29.57	POS	38.74*	IDT	34.99	POS	32.34	POS	32.95	POS	31.98	POS
21	Positivo moderado 2	29.08	POS	45	NEG	34.96	POS	31.13	POS	32.55	POS	31.42	POS
22	Positivo débil 1	31.48	POS	45	NEG	37.33	POS	33.24	POS	35.19	POS	33.95	POS
23	Positivo fuerte 2	22.72	POS	34.01	POS	28.23	POS	24.44	POS	26.09	POS	24.85	POS
24	Positivo moderado 2	29.28	POS	40.36*	NEG	34.81	POS	32.01	POS	32.59	POS	31.60	POS
25	Positivo débil 2	32.49	POS	45	NEG	38.16	POS	35.06	POS	37.24	POS	35.85	POS
26	Negative	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG
27	Positivo débil 1	31.66	POS	45	NEG	36.67	POS	33.83	POS	34.91	POS	33.84	POS
28	Positivo fuerte 1	19.51	POS	30.81	POS	25.31	POS	21.38	POS	23.08	POS	22.40	POS
29	Positivo fuerte 2	22.35	POS	34.21	POS	28.38	POS	24.08	POS	26.15	POS	25.09	POS
30	Negativo	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG

**Cuadro 4.** Resultados cuantitativos y cualitativos de los laboratorios que utilizaron la prueba RT-qPCR del Dr. Hong (\*los resultados marcados en amarillo están clasificados en la categoría incorrecta)

Muestras		LAB 1		LAB 2		LAB 3		LAB 4		LAB 5		LAB 7	
		Ct. promedio	INT	Ct. promedio	INT	Ct. promedio	INT	Ct. promedio	INT	Ct. promedio	INT	Ct. promedio	INT
1	Positivo moderado 1	25.80	POS	32.71	POS	27.07	POS	29.60	POS	29.32	POS	27.16	POS
2	Positivo débil 1	31.57	POS	38.29	IDT	32.56	POS	34.21	POS	35.10	POS	33.82	POS
3	Negativo	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG
4	Negativo	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG
5	Negativo	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG
6	Positivo fuerte 2	22.66	POS	29.53	POS	23.67	POS	25.30	POS	26.12	POS	26.26	POS
7	Positivo fuerte 1	19.34	POS	28.24	POS	20.35	POS	22.44	POS	22.71	POS	21.92	POS
8	Positivo débil 1	31.39	POS	40.34	NEG	32.44	POS	34.27	POS	34.70	POS	33.93	POS
9	Negativo	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG
10	Negativo	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG
11	Positivo moderado 1	25.93	POS	32.76	POS	27.11	POS	27.78	POS	29.28	POS	28.81	POS
12	Positivo débil 2	32.38	POS	39.56	IDT	33.83	POS	35.59	POS	35.97	POS	35.64	POS
13	Positivo moderado 1	25.93	POS	32.96	POS	27.12	POS	28.96	POS	29.43	POS	28.84	POS
14	Negativo	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG
15	Positivo débil 2	31.91	POS	38.95	IDT	33.89	POS	35.40	POS	36.35	POS	35.17	POS
16	Positivo débil 2	32.30	POS	39.68	IDT	33.56	POS	36.32	POS	35.99	POS	35.35	POS
17	Negativo	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG
18	Positivo fuerte 1	18.86	POS	25.37	POS	20.36	POS	22.44	POS	22.96	POS	22.02	POS
19	Positivo débil 2	32.86	POS	37.58	IDT	33.87	POS	35.69	POS	36.14	POS	35.35	POS
20	Positivo moderado 2	29.20	POS	35.36	POS	30.57	POS	31.71	POS	32.70	POS	32.02	POS
21	Positivo moderado 2	28.79	POS	35.63	POS	30.50	POS	32.22	POS	32.71	POS	32.15	POS
22	Positivo débil 1	30.96	POS	35.85	POS	32.43	POS	33.24	POS	34.56	POS	34.12	POS
23	Positivo fuerte 2	22.61	POS	38.36	IDT	23.89	POS	24.69	POS	25.97	POS	25.35	POS
24	Positivo moderado 2	28.80	POS	45	NEG	30.64	POS	32.19	POS	32.78	POS	32.34	POS
25	Positivo débil 2	32.21	POS	37.73	IDT	33.88	POS	35.88	POS	36.07	POS	35.92	POS
26	Negativo	45	NEG	26.51	POS	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG
27	Positivo débil 1	31.14	POS	45	NEG	32.65	POS	34.	POS	34.69	POS	34.13	POS
28	Positivo fuerte 1	19.35	POS	29.32	POS	20.68	POS	22.45	POS	22.76	POS	22.60	POS
29	Positivo fuerte 2	22.10	POS	45	NEG	23.83	POS	24.72	POS	26.02	POS	25.71	POS
30	Negativo	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG

**Cuadro 5.** Resultados cuantitativos y cualitativos de los laboratorios que utilizaron la prueba RT-qPCR con el colorante SYBR de Tattiyapong *et al.*, 2017. (\*el valor promedio de  $C_T$  se calculó a partir de un solo valor  $C_T$ ; los resultados marcados en amarillo están clasificados en la categoría incorrecta).

Muestras		LAB 1		LAB 3		LAB 4		LAB 6		LAB 7	
		$C_T$ - promedio	INT	$C_T$ - promedio	INT	$C_T$ - promedio	INT	$C_T$ - promedio	INT	$C_T$ - promedio	INT
1	Positivo moderado 1	23.27	POS	23.50	POS	23.37	POS	24.21	POS	25.77	POS
2	Positivo débil 1	23.55	NEG	28.86	POS	27.58	POS	30.16	POS	31.34	POS
3	Negativo	23.48	NEG	45	NEG	35.96	NEG	45	NEG	45	NEG
4	Negativo	23.20	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG	45	NEG
5	Negativo	23.16	NEG	45	NEG	30.99	NEG	40.00	NEG	45	NEG
6	Positivo fuerte 2	32.04	POS	20.13	POS	19.12	POS	21.24	POS	23.45	POS
7	Positivo fuerte 1	17.73	POS	16.80	POS	17.02	POS	17.43	POS	19.17	POS
8	Positivo débil 1	23.66	NEG	29.02	POS	28.26	POS	29.26	POS	31.46	POS
9	Negativo	23.43	NEG	45	NEG	29.82	NEG	40.00	NEG	45	NEG
10	Negativo	45.11	NEG	36.89*	NEG	45	NEG	36.79	NEG	45	NEG
11	Positivo moderado 1	22.29	POS	23.50	POS	22.50	POS	24.73	POS	25.88	POS
12	Positivo débil 2	22.64	NEG	30.16	POS	26.66	POS	45	NEG	32.92	POS
13	Positivo moderado 1	22.32	POS	23.62	POS	23.11	POS	23.95	POS	25.79	POS
14	Negativo	22.81	NEG	45	NEG	32.08	NEG	30.29	POS	45	NEG
15	Positivo débil 2	26.21	POS	30.22	POS	29.38	POS	30.22	POS	33.06	POS
16	Positivo débil 2	23.10	NEG	30.11	POS	28.28	POS	30.63	POS	33.94	POS
17	Negativo	23.40	NEG	45	NEG	30.89	NEG	45	NEG	45	NEG
18	Positivo fuerte 1	16.12	POS	16.79	POS	16.62	POS	16.82	POS	19.11	POS
19	Positivo débil 2	22.63	NEG	30.26	POS	27.75	POS	31.71	POS	31.80	POS
20	Positivo moderado 2	23.61	POS	26.86	POS	26.16	POS	45	NEG	29.58	POS
21	Positivo moderado 2	22.35	IDT	26.83	POS	25.87	POS	27.44	POS	29.11	POS
22	Positivo débil 1	23.18	NEG	28.98	POS	26.99	POS	29.77	POS	30.91	POS
23	Positivo fuerte 2	20.32	POS	20.23	POS	19.17	POS	20.52	POS	22.36	POS
24	Positivo moderado 2	23.80	IDT	26.97	POS	25.06	POS	27.23	POS	29.17	POS
25	Positivo débil 2	23.85	NEG	30.74	POS	27.22	POS	31.02	POS	33.26	POS
26	Negativo	24.17	NEG	36.14*	NEG	31.86	NEG	45	NEG	45	NEG
27	Positivo débil 1	22.46	NEG	29.01	POS	27.99	POS	29.46	POS	31.46	POS
28	Positivo fuerte 1	23.27	POS	17.22	POS	16.41	POS	17.29	POS	16.61	POS
29	Positivo fuerte 2	19.84	POS	20.42	POS	19.29	POS	20.19	POS	22.71	POS
30	Negativo	42.00	NEG	45	NEG	31.16	NEG	24.21	NEG	45	NEG

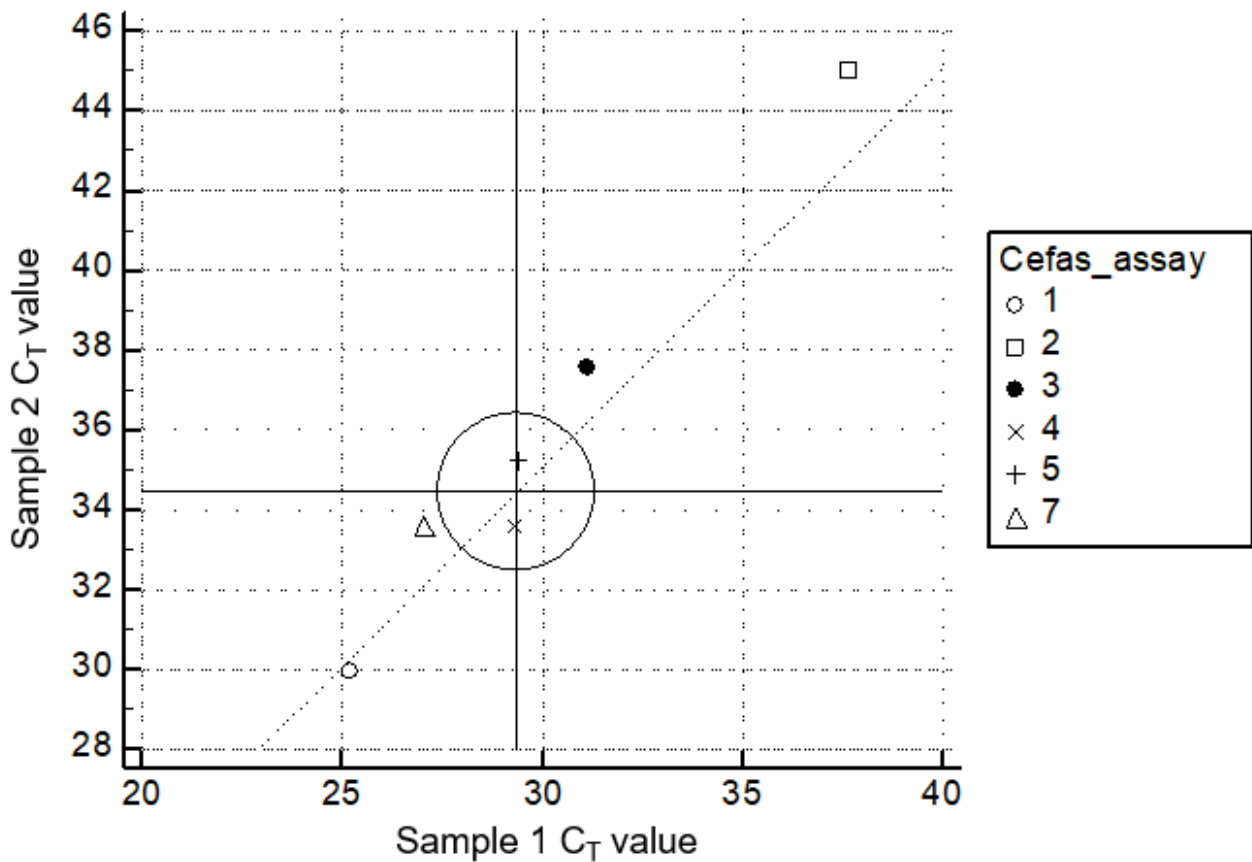
**Cuadro 6.** Resultados cuantitativos y cualitativos de los laboratorios que utilizaron la prueba RT-nPCR de Dong *et al.*, 2017. (\*los resultados marcados en amarillo están clasificados en la categoría incorrecta)

Muestras		LAB 1	LAB 2	LAB 3	LAB 4	LAB 5	LAB 7
		INT	INT	INT	INT	INT	INT
1	Positivo moderado 1	POS	NEG	POS	POS	POS	POS
2	Positivo débil 1	POS	NEG	POS	POS	POS	NEG
3	Negativo	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
4	Negativo	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
5	Negativo	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
6	Positivo fuerte 2	POS	POS	POS	POS	POS	POS
7	Positivo fuerte 1	POS	POS	POS	POS	POS	POS
8	Positivo débil 1	POS	NEG	POS	POS	POS	POS
9	Negativo	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
10	Negativo	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
11	Positivo moderado 1	POS	POS	POS	POS	POS	POS
12	Positivo débil 2	POS	NEG	POS	POS	POS	NEG
13	Positivo moderado 1	POS	POS	POS	POS	POS	POS
14	Negativo	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
15	Positivo débil 2	POS	NEG	POS	POS	POS	NEG
16	Positivo débil 2	POS	NEG	POS	POS	POS	NEG
17	Negativo	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
18	Positivo fuerte 1	POS	POS	POS	POS	POS	POS
19	Positivo débil 2	NEG	NEG	POS	POS	POS	IDT
20	Positivo moderado 2	POS	NEG	POS	POS	POS	IDT
21	Positivo moderado 2	IDT	NEG	POS	POS	POS	POS
22	Positivo débil 1	POS	NEG	POS	POS	POS	POS
23	Positivo fuerte 2	POS	POS	POS	POS	POS	POS
24	Positivo moderado 2	IDT	POS	POS	POS	POS	POS
25	Positivo débil 2	POS	NEG	POS	POS	POS	IDT
26	Negativo	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
27	Positivo débil 1	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS
28	Positivo fuerte 1	POS	POS	POS	POS	POS	POS
29	Positivo fuerte 2	POS	POS	POS	POS	POS	POS
30	Negativo	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG



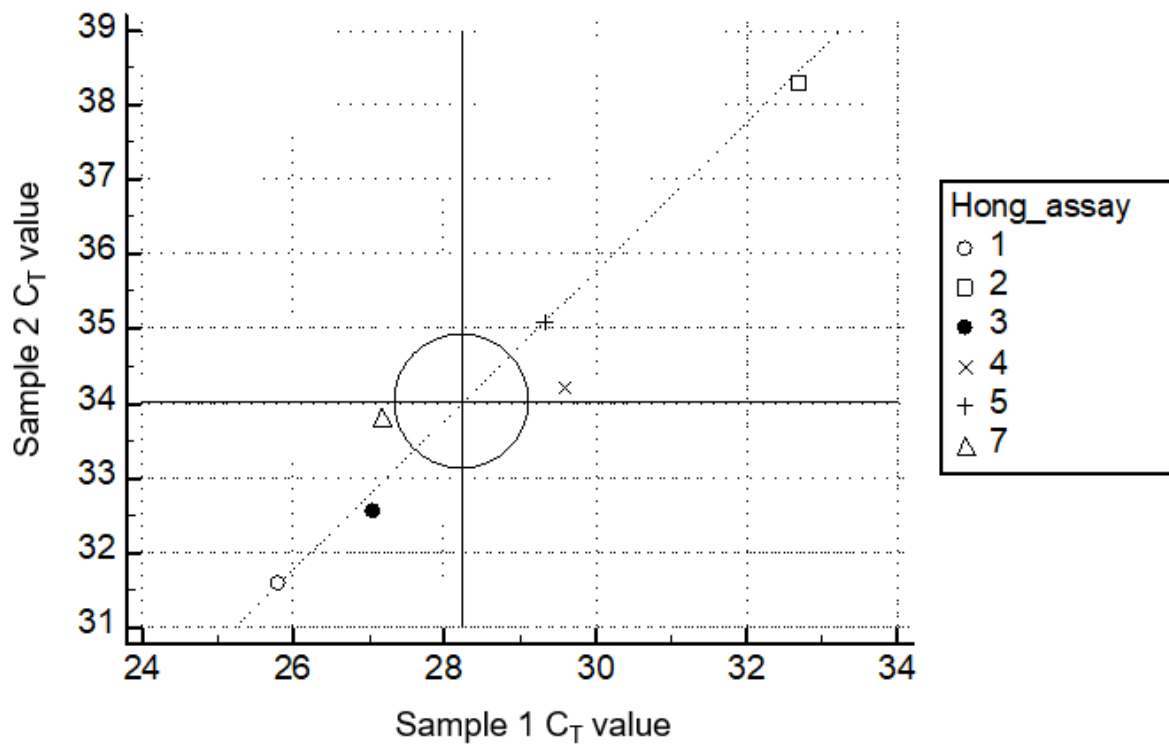
### Diagrama de Youden

El diagrama de Youden es un método gráfico para analizar datos obtenidos por varios laboratorios, correspondientes a dos muestras. El gráfico presenta la variabilidad entre laboratorios. En la Ronda 2, las muestras 1 y 2, representan respectivamente diluciones positivas intermedias y positivas débiles de una muestra positiva de TiLV. Cada punto del gráfico corresponde a los resultados de un laboratorio: la medida que obtiene para la muestra 1 figura en el eje vertical y la segunda variable de respuesta 2 (muestra 2) está indicada en el eje horizontal. Se traza una línea mediana horizontal para la muestra 2 y una línea mediana vertical para la muestra 1. La intersección de las dos líneas medianas se denomina “mediana de Manhattan o *Manhattan mean*”. Se traza una línea de referencia de 45 grados a través de la mediana de Manhattan. Los laboratorios con resultados en el cuadrante superior derecho o inferior izquierdo tienden a errores sistemáticos y los laboratorios en el cuadrante superior izquierdo e inferior derecho tienden a errores aleatorios.



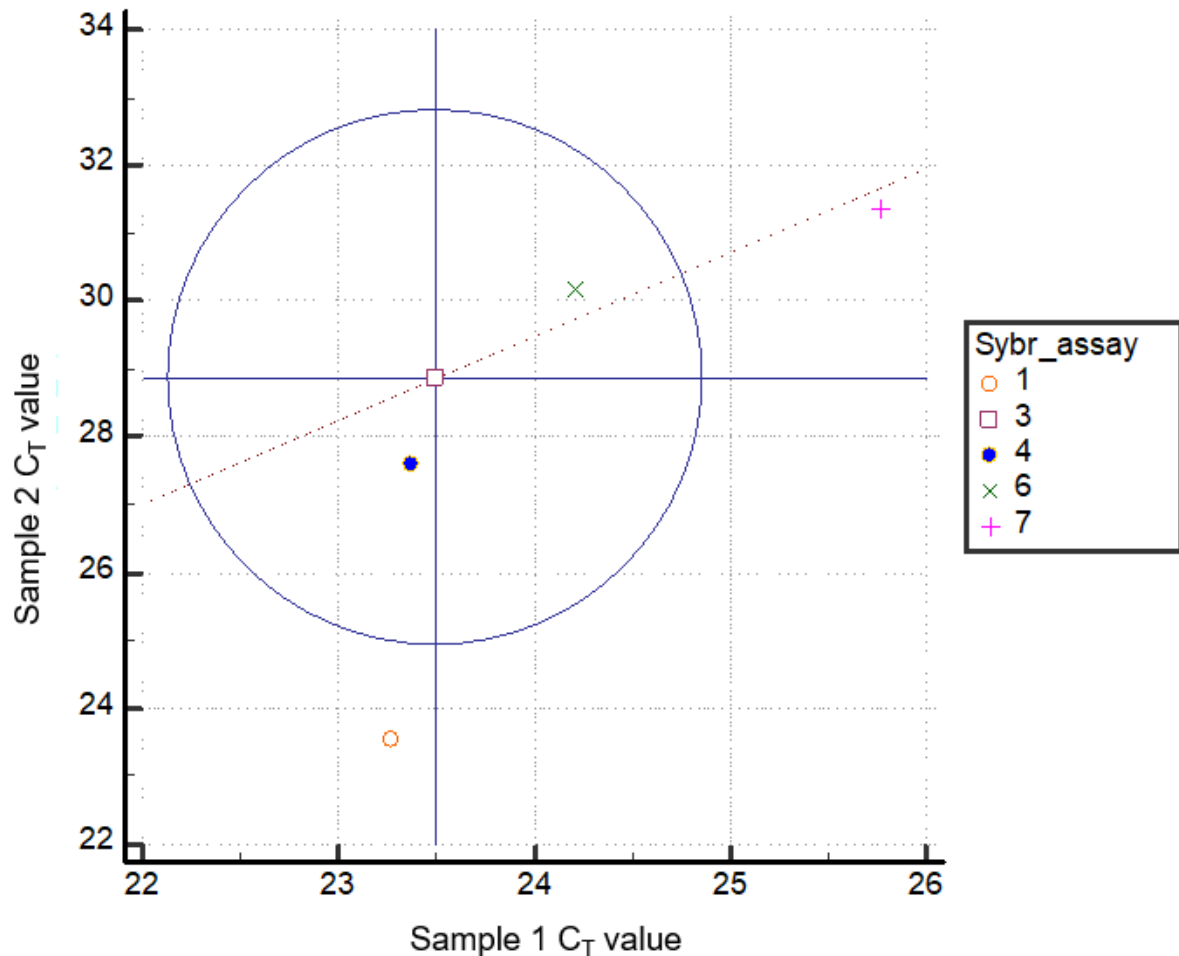
**Cuadro 2.** Diagrama de Youden utilizado para comparar los resultados obtenidos por los laboratorios durante las pruebas RT-qPCR del CEFAS en una muestra con positivo débil (muestra 1) y un positivo moderado (muestra 2).

El laboratorio 2 presentó los valores de  $C_T$  más altos (sistemáticos) y el laboratorio 1 los valores de  $C_T$  más bajos (sensibilidad más elevada). Los laboratorios 4 y 5 se encontraban dentro del círculo de probabilidad de cobertura del 95 % y produjeron valores de  $C_T$  que se acercaban a la “*Manhattan median*”. El laboratorio 7 produjo un valor bajo para la muestra 1 y un valor cercano a la mediana para la muestra 2, lo que podría ser una indicación de error aleatorio. La mayoría de los resultados están dispersos a lo largo de la línea de referencia 45, lo que indica una relación sistemática entre los resultados de las muestras 1 y 2.



**Figura 3.** Diagrama de Youden utilizado para comparar los resultados obtenidos por los laboratorios durante la prueba RT-qPCR del Dr. Hong en una muestra positiva débil (muestra 1) y una positiva moderada (muestra 2).

El laboratorio 2 tuvo los valores más altos de  $C_T$  (sistemático) y el laboratorio 1 los valores más bajos de  $C_T$  (mayor sensibilidad). Los demás laboratorios están fuera de la zona de probabilidad de cobertura del 95 %, pero cerca de la “Manhattan median”. La mayoría de los resultados están dispersos a lo largo de la línea de referencia 45, lo que indica una relación sistemática entre los resultados de las muestras 1 y 2.



**Figura 4.** Diagrama de Youden para la prueba RT-qPCR de Tattiyapong utilizando un positivo débil (muestra 1) y un positivo moderado (muestra 2).

Los laboratorios n°3, n°4 y n°6 están incluidos en el círculo de probabilidad de cobertura del 95 % y el laboratorio n°3 arrojó valores medianos de ambas muestras. La circunferencia del círculo de probabilidad de cobertura del 95 % es mayor que la de las pruebas del CERAS y del Dr. Hong debido al mayor grado de variación de la prueba con el colorante SYBR. El laboratorio n°1 generó sistemáticamente valores bajos de C<sub>T</sub> que indican una sensibilidad alta. Por el contrario, el laboratorio n°7 generó valores de C<sub>T</sub> altos para la muestra 1 y cercanos a la mediana para la muestra 2, lo que indica una variación aleatoria. La inclinación de la diagonal (sin intersección a los 45°) indica resultados desproporcionados para las muestras 1 y 2.

#### Referencias

- DONG, H.T., SIRIROOB, S., MEEMETTA, W., SANTIMANAWONG, W., GANGNONNGIW, W., PIRARAT, N., KHUNRAE, P., RATTANAROJPONG, T., VANICHVIRIYAKIT, R. & SENAPIN, S. (2017). Emergence of tilapia lake virus in Thailand and an alternative semi-nested RT-PCR for detection. *Aquaculture*, **476**, 111-118.
- EYNGOR, M., ZAMOSTIANO, R., TSOFAK, J.E.K., BERKOWITZ, A., BERCOVIER, H., TINMAN, S., LEV, M., HURVITZ, A., GALEOTTI, M., BACHARACH, E. & EL DAR, A. (2014). Identification of a novel RNA virus lethal to tilapia. *Journal of Clinical Microbiology*, **52**, 4137.
- TATTIYAPONG, P., SIRIKANACHANA, K. & SURACHETPONG, W. (2017), Development and validation of a reverse transcription quantitative polymerase chain reaction for tilapia lake virus detection in clinical samples and experimentally challenged fish. *Journal of Fish Diseases*, **41**, 255-261.
- TSOFACK, J.E.K., ZAMOSTIANO, R., WATTED, S., BERKOWITZ, A., ROSENBLUTH, E., MICHRA, N., BRIESE, T., LIPKIN, W.I., KABUUSU, R.M., FERGUSON, H., DEL POZO, J., EL DAR, A. & BACHARACH, E. (2017). Detection of Tilapia Lake Virus in clinical samples by culturing and nested reverse transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, **55**, 759.
- WAIYAMITRA, P., TATTIYAPONG, P., SIRIKANACHANA, K., MONGKOLSUK, S., NICHOLSON, P. & SURACHETPONG, W. (2018). A TaqMan RT-qPCR assay for tilapia lake virus (TiLV) detection in tilapia. *Aquaculture*, **497**, 184-188.

## Apéndices

Apéndice 1.1. Repetibilidad del método RT-qPCR del CEFAS (resultados expresados en valores  $C_T$ )

Muestra	ID	Lab 1	Lab 2	Lab 3	Lab 4	Lab 5	Lab 7
7	Positivo fuerte 1	18.48	30.76	24.81	21.81	22.84	21.77
28	Positivo fuerte 1	19.51	30.81	25.31	21.38	23.08	22.4
18	Positivo fuerte 1	20.05	30.18	24.95	21.97	22.98	21.67
6	Positivo fuerte 2	21.52	33.96	28.03	24.99	26.16	25.92
23	Positivo fuerte 2	22.72	34.01	28.23	24.44	26.09	24.85
29	Positivo fuerte 2	22.35	34.21	28.38	24.08	26.15	25.09
1	Positivo moderado 1	25.22	37.65	31.14	29.28	29.44	27.04
11	Positivo moderado 1	25.55	36.85	31.56	27.65	29.33	28.22
13	Positivo moderado 1	25.6	37.58	31.49	29.32	29.52	28.61
20	Positivo moderado 2	29.57	38.74*	34.99	32.34	32.95	31.98
21	Positivo moderado 2	29.08	45	34.96	31.13	32.55	31.42
24	Positivo moderado 2	29.28	40.36*	34.81	32.01	32.59	31.6
2	Positivo débil 1	29.97	45	37.56	33.62	35.22	33.61
8	Positivo débil 1	30.8	45	36.86	33.81	34.48	33.95
22	Positivo débil 1	31.48	45	37.33	33.24	35.19	33.95
27	Positivo débil 1	31.66	45	36.67	33.83	34.91	33.84
12	Positivo débil 2	31.88	41.40*	38.93	33.65	36.05	35.65
15	Positivo débil 2	32.33	45	38.49	35.11	36.59	35.35
16	Positivo débil 2	32.55	45	38.97	35.5	35.84	35.33
19	Positivo débil 2	33.37	45	38.61	34.86	35.98	35.19
25	Positivo débil 2	32.49	45	38.16	35.06	37.24	35.85
3	Negativo	45	45	45	45	45	45
4	Negativo	45	45	45	45	45	45
5	Negativo	45	45	45	45	45	45
9	Negativo	45	45	45	45	45	45
10	Negativo	45	45	45	45	45	45
14	Negativo	45	45	45	45	45	45
17	Negativo	45	45	45	45	45	45
26	Negativo	45	45	45	45	45	45
30	Negativo	45	45	45	45	45	45

(\* valor promedio de  $C_T$  calculado a partir de un solo valor de  $C_T$ )

**Apéndice 1.2.** Repetibilidad del método RT-qPCR del Dr. Hong (resultados expresados en forma de valores  $C_T$ )

<b>Muestra</b>	<b>ID</b>	<b>Lab 1</b>	<b>Lab 2</b>	<b>Lab 3</b>	<b>Lab 4</b>	<b>Lab 5</b>	<b>Lab 7</b>
7	Positivo fuerte 1	19.34	28.24	20.35	22.44	22.71	21.92
28	Positivo fuerte 1	19.35	29.32	20.68	22.45	22.76	22.6
18	Positivo fuerte 1	18.86	25.37	20.36	22.44	22.96	22.02
6	Positivo fuerte 2	22.66	29.53	23.67	25.3	26.12	26.26
23	Positivo fuerte 2	22.61	38.36	23.89	24.69	25.97	25.35
29	Positivo fuerte 2	22.1	45	23.83	24.72	26.02	25.71
1	Positivo moderado 1	25.8	32.71	27.07	29.6	29.32	27.16
11	Positivo moderado 1	25.93	32.76	27.11	27.78	29.28	28.81
13	Positivo moderado 1	25.93	32.96	27.12	28.96	29.43	28.84
20	Positivo moderado 2	29.2	35.36	30.57	31.71	32.7	32.02
21	Positivo moderado 2	28.79	35.63	30.5	32.22	32.71	32.15
24	Positivo moderado 2	28.8	45	30.64	32.19	32.78	32.34
2	Positivo débil 1	31.57	38.29	32.56	34.21	35.1	33.82
8	Positivo débil 1	31.39	40.34	32.44	34.27	34.7	33.93
22	Positivo débil 1	30.96	35.85	32.43	33.24	34.56	34.12
27	Positivo débil 1	31.14	45	32.65	34	34.69	34.13
12	Positivo débil 2	32.38	39.56	33.83	35.59	35.97	35.64
15	Positivo débil 2	31.91	38.95	33.89	35.4	36.35	35.17
16	Positivo débil 2	32.3	39.68	33.56	36.32	35.99	35.35
19	Positivo débil 2	32.86	37.58	33.87	35.69	36.14	35.35
25	Positivo débil 2	32.21	37.73	33.88	35.88	36.07	35.92
3	Negativo	45	45	45	45	45	45
4	Negativo	45	45	45	45	45	45
5	Negativo	45	45	45	45	45	45
9	Negativo	45	45	45	45	45	45
10	Negativo	45	45	45	45	45	45
14	Negativo	45	45	45	45	45	45
17	Negativo	45	45	45	45	45	45
26	Negativo	45	26.51	45	45	45	45
30	Negativo	45	45	45	45	45	45

**Apéndice 1.3.** Repetibilidad del método RT-qPCR de Tattiyapong *et al.*, (2017) (resultados expresados en valores  $C_T$ )

<b>Muestra</b>	<b>ID</b>	<b>Lab 1</b>	<b>Lab 3</b>	<b>Lab 4</b>	<b>Lab 6</b>	<b>Lab 7</b>
7	Positivo fuerte 1	17.73	16.8	17.02	17.43	19.17
28	Positivo fuerte 1	23.27	17.22	16.41	17.29	16.61
18	Positivo fuerte 1	16.12	16.79	16.62	16.82	19.11
6	Positivo fuerte 2	32.04	20.13	19.12	21.24	23.45
23	Positivo fuerte 2	20.32	20.23	19.17	20.52	22.36
29	Positivo fuerte 2	19.84	20.42	19.29	20.19	22.71
1	Positivo moderado 1	23.27	23.5	23.37	24.21	25.77
11	Positivo moderado 1	22.29	23.5	22.5	24.73	25.88
13	Positivo moderado 1	22.32	23.62	23.11	23.95	25.79
20	Positivo moderado 2	23.61	26.86	26.16	45	29.58
21	Positivo moderado 2	22.35	26.83	25.87	27.44	29.11
24	Positivo moderado 2	23.8	26.97	25.06	27.23	29.17
2	Positivo débil 1	23.55	28.86	27.58	30.16	31.34
8	Positivo débil 1	23.66	29.02	28.26	29.26	31.46
22	Positivo débil 1	23.18	28.98	26.99	29.77	30.91
27	Positivo débil 1	22.46	29.01	27.99	29.46	31.46
12	Positivo débil 2	22.64	30.16	26.66	45	32.92
15	Positivo débil 2	26.21	30.22	29.38	30.22	33.06
16	Positivo débil 2	23.1	30.11	28.28	30.63	33.94
19	Positivo débil 2	22.63	30.26	27.75	31.71	31.8
25	Positivo débil 2	23.85	30.74	27.22	31.02	33.26
3	Negativo	23.48	45	35.96	45	45
4	Negativo	23.2	45	45	45	45
5	Negativo	23.16	45	30.99	40	45
9	Negativo	23.43	45	29.82	40	45
10	Negativo	45.11	36.89*	45	36.79	45
14	Negativo	22.81	45	32.08	30.29	45
17	Negativo	23.4	45	30.89	45	45
26	Negativo	24.17	36.14*	31.86	45	45
30	Negativo	42	45	31.16	24.21	45

(\*el valor promedio de  $C_T$  está calculado de un único valor de  $C_T$ )

**Apéndice 2.1.** Resultados de las pruebas de homogeneidad realizadas con las diluciones preparadas por la ACDP para constituir el panel de muestras. Pruebas realizadas con el método RT-qPCR del Dr. Hong.

Replicado de muestra	Dilución 1	Dilución 2	Dilución 3	Dilución 4	Dilución 5	Dilución 6
1	20.79	24.16	27.47	30.77	32.91	34.14
2	20.84	24.20	27.31	30.69	32.82	34.21
3	20.72	24.10	27.42	30.76	32.82	34.27
4	20.81	24.12	27.31	30.96	32.74	34.15
5	20.74	24.16	27.44	30.76	33.04	34.27
6	20.71	24.09	27.44	30.84	33.06	34.12
7	20.58	24.00	27.42	30.67	33.10	34.52
8	20.60	24.12	27.39	30.75	32.91	34.48
9	20.69	24.13	27.41	30.84	32.86	34.20
10	20.65	24.06	27.37	30.74	32.95	34.34
<b>Promedio</b>	<b>20.71</b>	<b>24.11</b>	<b>27.40</b>	<b>30.78</b>	<b>32.92</b>	<b>34.24</b>
<b>Coefficiente de variación</b>	<b>0.29%</b>	<b>0.00%</b>	<b>0.17%</b>	<b>0.24%</b>	<b>0.29%</b>	<b>0.00%</b>
<b>ÉXITO/FRACASO</b>	<b>ÉXITO</b>	<b>ÉXITO</b>	<b>ÉXITO</b>	<b>ÉXITO</b>	<b>ÉXITO</b>	<b>ÉXITO</b>

**Apéndice 2.2.** Resultados de la prueba de estabilidad para las alícuotas de la muestra con resultado positivo fuerte n°1. Pruebas realizadas con el método RT-qPCR del Dr. Hong. Los resultados se presentan en forma de promedio con los resultados inaceptables sombreados en gris.

Muestra	Homogeneidad	Temperatura	Una semana	Dos semanas	Cuatro semanas
Positivo fuerte 1	20.71	-20°C	20.50	21.56	20.88
Positivo fuerte 1		-20°C	20.49	21.51	20.91
Positivo fuerte 1		-20°C	20.47	21.50	20.99
Positivo fuerte 1		4°C	20.49	21.55	21.15
Positivo fuerte 1		4°C	20.50	21.57	21.09
Positivo fuerte 1		4°C	20.50	21.64	21.13
Positivo fuerte 1		25°C	20.82	21.82	22.37
Positivo fuerte 1		25°C	20.78	21.92	21.75
Positivo fuerte 1		25°C	20.95	21.90	21.82
Positivo fuerte 1		37°C	21.51	24.37	27.83
Positivo fuerte 1		37°C	21.75	24.97	27.82
Positivo fuerte 1		37°C	21.99	24.93	29.49

**Apéndice 2.3.** Resultados de la prueba de estabilidad para las alícuotas de la muestra con resultado positivo fuerte n°2. Pruebas realizadas con el método RT-qPCR del Dr. Hong. Los resultados se presentan en forma de promedio con los resultados inaceptables sombreados en gris.

Muestra	Homogeneidad	Temperatura	Una semana	Dos semanas	Cuatro semanas
Positivo fuerte 2	24.11	-20°C	23.86	24.95	24.51
Positivo fuerte 2		-20°C	23.91	24.84	24.47
Positivo fuerte 2		-20°C	23.97	24.89	24.47
Positivo fuerte 2		4°C	23.91	24.90	24.50
Positivo fuerte 2		4°C	23.79	24.99	24.34
Positivo fuerte 2		4°C	23.95	24.98	24.47
Positivo fuerte 2		25°C	24.11	25.30	25.95
Positivo fuerte 2		25°C	24.30	25.33	25.50
Positivo fuerte 2		25°C	24.19	25.44	25.51
Positivo fuerte 2		37°C	25.41	27.78	30.87
Positivo fuerte 2		37°C	25.04	29.04	32.41
Positivo fuerte 2		37°C	25.32	27.69	31.18

**Apéndice 2.4.** Resultados de la prueba de estabilidad para las alícuotas de la muestra con resultado positivo moderado n°1. Pruebas realizadas con el método RT-qPCR del Dr. Hong. Los resultados se presentan en forma de promedio con los resultados inaceptables sombreados en gris.

Muestra	Homogeneidad	Temperatura	Una semana	Dos semanas	Cuatro semanas
Positivo moderado 1	27.40	-20°C	27.17	28.10	27.65
Positivo moderado 1		-20°C	27.24	28.19	27.76
Positivo moderado 1		-20°C	27.21	28.14	27.76
Positivo moderado 1		4°C	27.25	28.21	27.84
Positivo moderado 1		4°C	27.23	28.26	27.87
Positivo moderado 1		4°C	27.30	28.28	27.92
Positivo moderado 1		25°C	27.62	28.92	28.68
Positivo moderado 1		25°C	27.39	28.90	29.23
Positivo moderado 1		25°C	27.54	28.88	29.18
Positivo moderado 1		37°C	28.29	31.22	33.58
Positivo moderado 1		37°C	28.50	31.18	35.14
Positivo moderado 1		37°C	28.50	30.51	35.41

**Apéndice 2.5.** Resultados de la prueba de estabilidad para las alícuotas de la muestra con resultado positivo moderado n°2. Pruebas realizadas con el método RT-qPCR del Dr. Hong. Los resultados se presentan en forma de promedio con los resultados inaceptables sombreados en gris.

Muestra	Homogeneidad	Temperatura	Una semana	Dos semanas	Cuatro semanas
Positivo moderado 2	30.78	-20°C	30.58	31.62	31.18
Positivo moderado 2		-20°C	30.65	31.63	31.20
Positivo moderado 2		-20°C	30.58	31.55	31.09
Positivo moderado 2		4°C	30.74	31.67	31.16
Positivo moderado 2		4°C	30.62	31.55	31.11
Positivo moderado 2		4°C	30.58	31.55	31.17
Positivo moderado 2		25°C	30.99	31.87	32.51
Positivo moderado 2		25°C	31.02	32.31	32.04
Positivo moderado 2		25°C	31.37	31.68	32.24
Positivo moderado 2		37°C	31.92	34.41	36.25
Positivo moderado 2		37°C	32.40	34.27	38.14
Positivo moderado 2		37°C	32.43	34.26	39.03



**Apéndice 2.6.** Resultados de la prueba de estabilidad para las alícuotas de la muestra con resultado positivo débil n°1. Pruebas realizadas con el método RT-qPCR del Dr. Hong. Los resultados se presentan en forma de promedio con los resultados inaceptables sombreados en gris.

Muestra	Homogeneidad	Temperatura	Una semana	Dos semanas	Cuatro semanas
Positivo débil 1	32.92	-20°C	32.99	32.93	32.79
Positivo débil 1		-20°C	33.13	33.08	33.05
Positivo débil 1		-20°C	32.98	33.03	33.00
Positivo débil 1		4°C	33.12	33.17	33.04
Positivo débil 1		4°C	33.20	33.16	33.33
Positivo débil 1		4°C	33.05	33.11	33.26
Positivo débil 1		25°C	33.48	33.72	34.30
Positivo débil 1		25°C	33.43	33.62	34.20
Positivo débil 1		25°C	33.20	33.40	34.62
Positivo débil 1		37°C	34.16	37.05	Neg
Positivo débil 1		37°C	34.61	36.79	38.36
Positivo débil 1		37°C	34.70	36.34	39.36

**Apéndice 2.7.** Resultados de la prueba de estabilidad para las alícuotas de la muestra con resultado positivo débil n°2. Pruebas realizadas con el método RT-qPCR del Dr. Hong. Los resultados se presentan en forma de promedio con los resultados inaceptables sombreados en gris.

Muestra	Homogeneidad	Temperatura	Una semana	Dos semanas	Cuatro semanas
Positivo débil 2	34.24	-20°C	34.33	34.48	34.23
Positivo débil 2		-20°C	34.66	34.34	34.65
Positivo débil 2		-20°C	34.49	34.50	34.22
Positivo débil 2		4°C	34.31	34.33	34.50
Positivo débil 2		4°C	34.42	34.53	34.79
Positivo débil 2		4°C	34.49	34.40	34.50
Positivo débil 2		25°C	35.09	35.12	35.94
Positivo débil 2		25°C	34.92	35.05	35.75
Positivo débil 2		25°C	35.11	34.89	Neg/40.05
Positivo débil 2		37°C	35.77	37.22	36.02
Positivo débil 2		37°C	35.89	36.84	Neg
Positivo débil 2		37°C	35.74	37.52	Neg/40.0