



Procedimiento de la OMSA para el registro de los kits de diagnóstico Resumen de los estudios de validación

Nombre del kit de diagnóstico: *Inncreate Bioscience WSSV RP Rapid Test Kit*

Nombre del fabricante: Inncreate Bioscience Co., Ltd.

Procedimiento /Número de registro: 082132

Fecha de registro: mayo de 2023

Enfermedad: Infección por el virus del síndrome de las manchas blancas en camarones

Agente patógeno: Whispovirus, virus del síndrome de las manchas blancas (WSSV)

Método utilizado: Prueba de inmunocromatografía de flujo lateral (IFL)

Finalidad de la prueba

El kit de diagnóstico *Bioscience Inncreate WSSV RP Rapid Test Kit* (test rápido del WSSV) es un kit de detección cualitativo para la infección por WSSV en los camarones. El dispositivo de inmunocromatografía o inmunoensayo de flujo lateral (IFL) está diseñado para los siguientes propósitos:

1. Diagnóstico confirmatorio efectuado en el terreno de los casos clínicos (incluida la confirmación de los casos sospechosos y una prueba de detección positiva).
2. Estimación de la prevalencia de la infección con el fin de facilitar el análisis de riesgo en los sistemas de producción de camarones para brindar asistencia en las prácticas de gestión. (Este kit no debe utilizarse para estimar la prevalencia en camarones en reproductores o estados post-larvarios antes del traslado a otras granjas acuícolas o a través de las fronteras).
3. Utilización junto con otras pruebas o procedimientos de diagnóstico como ayuda al diagnóstico u otras evaluaciones clínicas o epidemiológicas.

Especies y muestras: 2-3 trozos pequeños de branquias de camarón.

1. Información sobre el kit

Consulte el prospecto del kit disponible en la página web de la OMSA "Registro de kits de diagnóstico" o contacte con el fabricante:

Sitio web: <https://www.inncreatebio.com/>

E-mail: info@inncreatebio.com

2. Resumen de los estudios de validación

Especificidad analítica

Conclusión:

Se analizaron camarones infectados por *Vibrio parahaemolyticus*, agente causante de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND), infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV), infección por *Enterocytozoon hepatopenaei*, infección por *Monodon Baculovirus*, infección por el virus de la cabeza amarilla e infección por el virus del síndrome de Taura. Todas las muestras infectadas arrojaron resultados negativos.

Sensibilidad analítica

Conclusión:

Se utilizó una dilución en serie de la proteína diana recombinante del WSSV con tejidos de camarón homogeneizados para estimar el límite de detección (LOD), estimado a 0,4 ng/prueba.

Repetibilidad

Conclusión:

La repetibilidad en una misma serie se evaluó utilizando cuadruplicados de seis muestras con diversos niveles de infección, que fueron analizadas por el mismo operador en cinco días distintos. La repetibilidad entre series se realizó analizando las seis muestras a cargo de tres operarios diferentes utilizando tres lotes diferentes de kits durante cinco días. Fue posible reproducir los resultados de las pruebas inter laboratorios y entre laboratorios, con valor kappa de 1,0.

Características del diagnóstico

Determinación del umbral y estimaciones de la sensibilidad diagnóstica (DSe) y la especificidad diagnóstica (DSp).

Determinación del umbral:

El kit de diagnóstico *Inncreate Bioscience WSSV RP Rapid Test Kit* es una prueba de inmunocromatografía diseñado para lograr una detección cualitativa de la infección por WSSV en los camarones. La banda rosa púrpura debe aparecer tanto en la línea de prueba (T) como en la línea de control (C) para indicar que el camarón fue infectado por WSSV. Si la banda rosa púrpura sólo aparece en la línea de control (C), esto indica que no existe ninguna infección por WSSV o que se observa una ligera infección más allá de la sensibilidad del kit. El umbral está determinado por una sensibilidad analítica de 0,4 ng de la proteína diana.

Estimaciones de sensibilidad (DSe) y especificidad diagnósticas (DSp)

1. Estimaciones de sensibilidad y especificidad diagnósticas - con animales de referencia definidos

Doscientos cincuenta y dos camarones libres de patógenos específicos se utilizaron como controles negativos (n=105) o test de desafío o *challenge test* (n= 147) con una inyección de 100 ul de hemolinfa infectada por WSSV para determinar la sensibilidad y especificidad diagnósticas en muestras de animales de referencia definidos. De las 147 muestras "de desafío" y positivas a la PCR en tiempo real con sonda TaqMan de la OMSA (Durand & Lightner, 2002), 125 resultaron positivas al kit de prueba rápida del WSSV, mientras que 22 muestras se consideraron falsos negativos. El nivel de infección de estas 22 muestras se consideró muy leve (Ct>32,5). No se observaron resultados falsos positivos en las 105 muestras negativas "sin desafío" a la prueba PCR en tiempo real con la sonda TaqMan de la OMSA.

Animal de referencia:

<i>Bioscience Inncreate WSSV RP Rapid Test Kit</i>		Muestra diana: branquia	
		PCR en tiempo real con sonda TaqMan de la OMSA	
		Ct<32,5 considerado positivo	Ct<40 considerado positivo
Sensibilidad del diagnóstico	N	(126)	(147)
	DSe	(99,21 %)	(85,03 %)
	CI	(99,66 % - 99,98 %)	(78,22 % - 90,38 %)
Especificidad del diagnóstico	N	(105)	(105)
	DSp	(100 %)	(100 %)
	CI	(96,55-100 %)	(96,55-100 %)

2. Estimaciones de sensibilidad y especificidad diagnósticas – Camarones de producción

Se analizó un total de 465 camarones provenientes de cuatro lotes provenientes de sistemas de producción; 45 de 465 camarones se clasificaron como sintomáticos y 64 de 465 se clasificaron como positivos (Ct<40), según la prueba qPCR en tiempo real con la sonda TaqMan de la OMSA (Durand & Lightner, 2002).

En comparación con la prueba PCR en tiempo real con sonda TaqMan de la OMSA, la DSe global de la prueba rápida del WSSV fue del 92,50 % cuando Ct<32,50 se considera positivo, del 84,00 % cuando Ct<36 se considera positivo, o del 65,62 % si Ct<40 se considera positivo; la DSp fue del 100 %.

En cuanto al rendimiento diagnóstico en los camarones sintomáticos del sistema de producción, la DSe fue del 93,33 % y la DSp fue del 100 % cuando se utilizó Ct<40 como punto de corte. El valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN) fueron del 100 % y el 99,3 % respectivamente. Para las muestras con Ct<32,5 (infección moderada a alta,

>=100 copias), la DSe fue del 92,50 %. En general, el kit *Inncreate Bioscience WSSV Rapid test* muestra una alta concordancia en el diagnóstico.

Camarones de producción:

<i>Inncreate Bioscience WSSV RP Rapid Test Kit</i>	Especie/muestra diana: branquia				
	Método de la OMSA, PCR en tiempo real con sondas				
	Sintomático	Ct<32,5 considerado positivo	Ct<36 considerado positivo	Ct<40 considerado positivo	
Sensibilidad del diagnóstico	N DSe CI	(45) (93,33 %) (95,66 %-99,98 %)	(40) (92,50 %) (79,61 %-98,43 %)	(50) (84,00 %) (95,66 %-99,98 %)	(64) (65,62 %) (52,70 %-77,05 %)
Especificidad del diagnóstico	N DSp CI	(420) (100 %) (99,13 %-100 %)	(425) (100 %) (99,14 %-100 %)	(415) (100 %) (70,89 %-92,83 %)	(401) (100 %) (99,08 %-100 %)

Conclusión:

El kit de prueba rápida del WSSV es adecuado para las finalidades definidas y demuestra una alta sensibilidad general en la identificación de niveles moderados y elevados de infección por el WSSV o cuando se utiliza en muestras de camarones sintomáticos; la prueba tiene una especificidad muy alta. Los altos niveles del VPP y del VPN de la prueba y el rápido tiempo de respuesta (15-30 minutos *in situ* frente a >4 horas más el tiempo de envío) lo convierten en una poderosa herramienta para identificar posibles brotes.

Recomendamos a los usuarios que apliquen la prueba a los camarones que presenten cambios de comportamiento (letargo, disminución o ausencia de consumo de alimentos y comportamientos de natación anormales, como natación lenta o de lado, cerca de la superficie del agua o agrupamiento alrededor de los bordes de las unidades de cría), ya sea de forma regular o cuando se produzca estrés ambiental, como cambios rápidos de salinidad, o cuando se sospeche un brote de WSSV.

Reproductibilidad

Reproductibilidad analítica

Conclusión:

La evaluación de la reproductibilidad analítica fue llevada a cabo por dos laboratorios. Se seleccionaron seis muestras con diversos niveles de infección (2 leves, 2 moderados, 1 grave y 1 negativo), determinados por el método de PCR en tiempo real con sonda TaqMan de la OMSA (Durand & Lightner, 2002); se enviaron "muestras ciegas" a los dos laboratorios. Las pruebas se repitieron cuatro veces y se calculó un valor Kappa sobre los resultados de los 24 ensayos repetidos. No se observó ningún error de clasificación en los ensayos (20 positivos y 4 negativos). La concordancia de los dos métodos fue del 100 %, y Kappa =1,0.

Reproductibilidad del diagnóstico

La reproductibilidad diagnóstica fue realizada por cinco laboratorios en Taiwán y Tailandia, incluido un laboratorio de referencia de la OMSA. El panel de pruebas constaba de 25 muestras (con diversos niveles de infección por el virus, que incluía 5 muestras "conocidas" (3 positivas con concentraciones de proteína diana de 1,6, 0,8 ó 0,4 ng y 2 negativas) y 20 "muestras ciegas" desconocidas. Los laboratorios participantes siguieron los procedimientos descritos en el manual de instrucciones del kit de prueba rápida del WSSV.

Conclusión:

Las muestras fueron analizadas por cada uno de los cinco laboratorios que utilizaron el *Inncreate Bioscience WSSV RP Rapid Test Kit*. Los resultados muestran una alta reproductibilidad. Los cinco laboratorios mostraron una concordancia del 100 % en las cinco muestras conocidas. Cuatro de los cinco laboratorios mostraron una concordancia del 100 % en todas las "muestras ciegas", mientras que los resultados de un laboratorio mostraron una ligera discrepancia en una muestra. Con el objetivo de analizar los resultados experimentales de los cinco laboratorios se realizó la prueba Chi-cuadrado de homogeneidad. Prueba Chi-cuadrado independiente p-valor = 0,998 (Hsu *et al.*, 2022).

Referencias

Durand, S., & Lightner, D. V. (2002). Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. *Journal of Fish Diseases*, 25(7), 381-389.

Hsu, J. C.-K., Hsu, T.-K., Kannan, J., Wang, H.-C., Tassanakajon, A., & Chen, L.-L. (2022). Diagnostic performance of a Rapid Test Kit for white spot syndrome virus (WSSV). *Aquaculture*, 558, 738379. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738379>