

## **Implementación LABD NT-3**

### **Guía práctica para entrega de Informe de Actualización para Norma Técnica 3 (LABD NT-3)**

#### **Introducción**

Las últimas actualizaciones de los manuales terrestre y acuático de la Organización Mundial de Salud Animal (OMSA) determinan la necesidad de modificar algunos puntos de la norma técnica 3. Estas actualizaciones están enfocadas en la repetibilidad, determinación del límite de detección de la prueba diagnóstica y la determinación de la incertidumbre de medición de la prueba (MU).

De esta forma, los laboratorios de la red SERNAPESCA deben agregar a sus documentos de validación los resultados de estas modificaciones para cada una de sus técnicas diagnósticas del programa sanitario general. En forma específica, se les solicita a los laboratorios, el envío al Departamento de Salud Animal de SERNAPESCA, informes que incluyan las modificaciones realizadas a los procesos de validación de cada una de las técnicas de diagnóstico molecular que se encuentran en funcionamiento a nivel nacional.

Este documento tiene por objetivo facilitar la entrega y revisión de la nueva información de validación según la actualización de LABD NT-3 a través de una descripción práctica de los contenidos que debieran ser incluidos en cada una de las secciones del documento. A su vez, se constituye como una guía complementaria a la LABD NT-3 para los nuevos laboratorios que quieran validar sus técnicas diagnósticas moleculares con SERNAPESCA.

La disposición de las secciones sigue el orden del texto de la LABD NT-3 actualizada a enero de 2025.

#### **Alcance**

Esta guía práctica es aplicable para todos los laboratorios registrados por SERNAPESCA para realizar la validación oficial de los ensayos diagnósticos que se utilizan para las enfermedades de animales acuáticos en el marco de los programas oficiales establecidos por el Servicio.

#### **Sección del Informe**

##### **1. Antecedentes generales**

Se debe precisar la versión del documento actual y la fecha de emisión, así como también el objetivo del informe y el objetivo de la técnica.

##### *1.1 Estatus de acreditación*

En esta sección se espera que se entreguen datos acerca del estado de acreditación del laboratorio con respecto a la norma ISO17025 y la técnica diagnóstica que se está informando.

### *1.2 Definición de funciones e individualización de participantes*

Debe estar presente la definición de funciones e individualización de cada uno de los participantes del documento (por ej. encargado de calidad, jefe de laboratorio, analistas, etc.)

### *1.3 Validaciones previas*

Debe mencionarse la existencia de validaciones previas de la técnica aprobadas, con sus respectivas fechas, debiéndose incluir en los anexos la última validación de la técnica aprobada.

**\*Importante: Si el documento entregado corresponde al informe de un laboratorio solicitando validación por primera vez, este punto no aplica.**

### *1.4 Detalle de la técnica*

Se debe incluir en detalle el tipo y volumen de muestra que se utiliza, la especie, el tipo de extracción (manual o automática), kit de extracción, volúmenes de reacción, kit y protocolo de amplificación, equipo de PCR en tiempo real.

Es aceptable obviar la mención al detalle de la técnica en caso de que se encuentre en un documento de validación anterior. Sin embargo, debe indicarse claramente la ubicación en el anexo correspondiente.

## **2. Características del rendimiento analítico**

### *2.1 Materiales de referencia*

Descripción de las matrices y el origen de los materiales de referencia utilizados en la validación. Los anexos deben presentar el nivel de detalle necesario para trazabilidad de estas muestras.

### *2.2 Definición de las cargas utilizadas*

El documento debe explicitar los valores de Ct con los que se establecen las cargas alta, media y baja para el laboratorio.

### *2.3 Repetibilidad*

Luego de la extracción y posterior amplificación de muestras con diferentes cargas, en diferentes corridas y por diferentes analistas; en la sección de repetibilidad se deben entregar los resultados en tablas donde se muestren los valores de Ct de todas las alícuotas y sus triplicados evaluados, con las diferentes cargas utilizadas (alta, media y baja) y los diferentes analistas que participaron del proceso. Las alícuotas deben estar claramente individualizadas y los anexos debieran incluir el registro de las corridas con la misma nomenclatura del informe para su trazabilidad.

Se deben también incluir los cálculos de media, desviación estándar y coeficiente de variación para cada grupo de cargas por separado (alta, media y baja). La tabla debe mostrar también los resultados de los controles positivos y negativos de cada corrida.

**Recuerde: En esta sección, los cálculos de media, desviación estándar y coeficiente de variación deben excluir los resultados de los controles negativos y positivos obtenidos en las diferentes corridas.**

Junto con las tablas, se deben incluir gráficos de dispersión (cajas y bigotes) para mostrar la variación entre analistas con los diferentes grupos de muestras con carga alta, media y baja.

Se debe definir el porcentaje de variación aceptable para laboratorio y declarar si los resultados obtenidos se ajustan a ese criterio.

Los anexos de la sección de repetibilidad deberían corresponder a registros de las diferentes corridas con fechas y/o horas, individualización de las muestras para trazabilidad e identificación de los analistas participantes.

#### *2.4 Incertidumbre*

Incluir una tabla donde se muestren los valores de Ct de los controles positivos utilizados en la etapa de repetibilidad (para todos los analistas participantes y de todas las corridas realizadas) junto con su media, desviación estándar, coeficiente de variación y el resultado de MU.

Es importante mencionar que el cálculo de MU debe realizarse con un solo tipo de control positivo (con una carga determinada) y que sea el mismo que se utilizó en todas las corridas. Si se utiliza más de un control con cargas distintas, deben calcularse y mostrarse por separado los resultados.

Se debe indicar el valor de MU aceptable para el laboratorio para esta técnica (puede ser un valor máximo) y declarar si el resultado obtenido se ajusta a este criterio.

#### *2.5 Especificidad Analítica*

Se deben mostrar los resultados de selectividad, exclusividad e inclusividad de la técnica. En caso de que esta sección se encuentre en una validación previa, debe indicarse en forma precisa la ubicación en el anexo correspondiente.

Los análisis bioinformáticos deben dar cuenta de que los partidores y la sonda utilizados no reconocen otros patógenos que se diagnostican en el laboratorio ni secuencias propias de las especies hospedadoras (exclusividad). Por otra parte, estos partidores y sondas deben reconocer y unirse a las secuencias de las posibles variantes del agente que diagnostica la técnica (inclusividad).

Las pruebas *in-vitro* de esta sección deben incluir un panel de patógenos que se constituyan como posibles diagnósticos diferenciales de la infección con el agente que diagnostica la técnica (exclusividad) ya sea por la similitud de signos clínicos, como por la presentación en la misma fase del cultivo que el agente que diagnostica la técnica. Adicionalmente, la selectividad se demuestra con la amplificación del agente desde diferentes muestras donde el agente se puede encontrar o diferentes matrices enriquecidas con material genético sintético con la secuencia blanco del agente que la técnica diagnostica.



Los resultados de la amplificación del panel de patógenos relacionados, junto con muestras positivas (casos o inoculaciones sintéticas) y muestras de tejidos de las diferentes especies de salmónidos susceptibles a la infección, microbiota del pez y muestras humanas deben ser incluidas en una tabla identificando claramente las muestras (para trazabilidad), su valor de Ct (controles positivos, muestras positivas y muestras enriquecidas) o no amplificación (controles negativos y diagnósticos diferenciales).

Se debe declarar si los resultados obtenidos por la técnica se ajustan a los criterios de especificidad analítica esperados.

### *2.6 Sensibilidad Analítica*

En esta sección se deben mostrar los resultados de las amplificaciones del o los experimentos de dilución hasta la extinción, el cálculo y el resultado del límite de detección (LOD).

Es fundamental declarar la concentración inicial de la muestra enriquecida para expresar finalmente el límite de detección en términos del número de copias/ unidad de medida de muestra (mL,  $\mu$ L,  $\mu$ g, ng, etc.) En los anexos se debe incluir el cálculo de la concentración inicial de la muestra o el detalle que llevó a su determinación.

Se debe mostrar una tabla con los valores de Ct de las diluciones seriadas junto con la gráfica de la curva de regresión de los resultados donde se destaque la última dilución que generó resultados positivos y los resultados de la regresión logística.

Luego de la determinación del LOD de la técnica, se debe declarar el valor de Ct de corte propuesto por el laboratorio en el caso de los agentes endémicos.

## **3. Rendimiento diagnóstico**

### *3.1 Sensibilidad y especificidad diagnóstica*

Sólo exigidas para validación de técnicas de diagnóstico de patógenos endógenos.

La LABNT3 propone para el cálculo de la sensibilidad y especificidad diagnóstica la utilización de los resultados de amplificación de 45 muestras previamente diagnosticadas como positivas y 45 muestras diagnosticadas como negativas.

Se deben presentar tablas con la información de las muestras positivas y negativas incluyendo: Identificación para trazabilidad, especie, matriz, forma de confirmación de positividad (según corresponda), además de los resultados de amplificación. En los archivos anexos se debe incluir el detalle de la confirmación de la positividad (ej: secuenciación).

Los resultados de las amplificaciones deben categorizarse como positivos, negativos o indeterminados, contabilizarse en una tabla de 2x2 como la ejemplificada en la LABNT3 e indicar los resultados de Dse y Dsp obtenidos posterior al cálculo.



### **3.2 Reproducibilidad**

Se debe declarar en el documento el resultado de participación del laboratorio en instancias oficiales de pruebas inter-laboratorios y en instancias voluntarias para la técnica específica (si es que se llevaron a cabo). Sólo en caso de las instancias voluntarias, debe incluirse en los anexos una copia de los resultados obtenidos por el laboratorio.

## **4. Conclusión**

Luego del análisis de los resultados, cada laboratorio debe entregar una conclusión con respecto a si su técnica cumple con el objetivo propuesto en la validación.

## **5. Anexos**

Al final del documento de validación, los anexos al archivo deben indicarse en una tabla de contenidos. Se sugiere un orden numérico en relación con su mención en el texto del informe. En caso de que la capacidad de envío se vea superada por el tamaño del archivo, se pueden enviar los anexos como archivos separados del texto principal, teniendo el cuidado de que se correspondan en nombre y contenido con la tabla de anexos del documento de validación.

**Tabla resumen de contenido “informe de Validación LABD-NT3”**

| Sección Informe                                             | Tablas                                                                                                              | Gráficos                                                                                                              | Anexos                                                                   | Observaciones                                                                                                                                  |
|-------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Antecedentes generales</b>                               |                                                                                                                     |                                                                                                                       |                                                                          |                                                                                                                                                |
| Estatus de acreditación                                     | N/A                                                                                                                 | N/A                                                                                                                   | N/A                                                                      |                                                                                                                                                |
| Definición de funciones e identificación de participantes   | N/A                                                                                                                 | N/A                                                                                                                   | N/A                                                                      |                                                                                                                                                |
| Definición de objetivo del informe y objetivo de la técnica | N/A                                                                                                                 | N/A                                                                                                                   | N/A                                                                      |                                                                                                                                                |
| Validaciones previas                                        | N/A                                                                                                                 | N/A                                                                                                                   | Copia del último documento aprobado                                      | Declaración de la existencia de validaciones previas indicando fecha.                                                                          |
| Detalle de la técnica                                       | Se pueden incluir tablas con los protocolos de preparación de mix y protocolo de amplificación                      | N/A                                                                                                                   |                                                                          | Se puede hacer mención al documento de validación previa incluido en los anexos, indicando claramente su ubicación.                            |
| <b>Características Analíticas</b>                           |                                                                                                                     |                                                                                                                       |                                                                          |                                                                                                                                                |
| Materiales de referencia                                    | N/A                                                                                                                 | N/A                                                                                                                   | Detalle de las muestras utilizadas para su trazabilidad                  |                                                                                                                                                |
| Definición de cargas utilizadas                             | N/A                                                                                                                 | N/A                                                                                                                   | N/A                                                                      |                                                                                                                                                |
| Repetibilidad                                               | Deben mostrar todos los resultados de todas las cargas, corridas, réplicas y analistas. Incluir, donde corresponda, | Gráficos de cajas y bigotes para visualizar variabilidad entre réplicas (diferentes analistas) y de diferentes cargas | Registro de las diferentes corridas con nomenclatura correspondiente con | Excluir del cálculo los resultados de los controles positivos y negativos. Indicar el porcentaje de variabilidad aceptado por el laboratorio y |

| Sección Informe                                                        | Tablas                                                                                                                                                      | Gráficos                                                                                                                                                                                                   | Anexos                                           | Observaciones                                                                                                                                                            |
|------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                        | cálculos de media, DS y CV                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                            | las tablas                                       | declarar si los resultados se ajustan al criterio.                                                                                                                       |
| Incertidumbre                                                          | Mostrar los resultados de los controles positivos de las diferentes corridas y de los diferentes analistas.<br>Incluir el cálculo de media, DS y CV         | N/A                                                                                                                                                                                                        |                                                  | Indicar la incertidumbre que utiliza el laboratorio y declarar si el resultado se ajusta al criterio establecido                                                         |
| Especificidad Analítica                                                | Resultados e identificación de las muestras del panel de patógenos del diagnóstico diferencial además de los controles positivos y negativos.               | N/A                                                                                                                                                                                                        |                                                  |                                                                                                                                                                          |
| Sensibilidad Analítica                                                 | Deben mostrar los resultados de todas las réplicas correspondientes a todas las diluciones incluidas en el experimento de dilución hasta la extinción (DTE) | Debe mostrar la recta obtenida por los resultados de amplificación de todas las diluciones y entregar el resultado de la regresión logística en número de copias/ unidad de muestra (μL, mL, mg, μg, etc). |                                                  | Se debe declarar el límite de detección como número de copias/ unidad de muestra<br>En caso de agentes endémicos declarar el Ct de corte del laboratorio para la técnica |
| <b>Características Diagnósticas</b>                                    |                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                            |                                                  |                                                                                                                                                                          |
| Especificidad y Sensibilidad diagnóstica (Sólo para agentes patógenos) | Identificación de muestras positivas y negativas a incluir                                                                                                  | Cuadro 2X2 con el conteo de negativos, positivos e indeterminados                                                                                                                                          | Detalle de la comprobación de muestras positivas |                                                                                                                                                                          |

| Sección Informe   | Tablas | Gráficos | Anexos                                                                         | Observaciones                                                                                      |
|-------------------|--------|----------|--------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| endémicos)        |        |          |                                                                                |                                                                                                    |
| Reproducibilidad  | N/A    | N/A      | Copia de los resultados de rondas de comparación interlaboratorios voluntarias | Declaración de participación del laboratorio en instancias de comparación oficiales y voluntarias. |
| <b>Conclusión</b> | N/A    | N/A      | N/A                                                                            | Declaración del laboratorio con respecto al cumplimiento de la técnica para su objetivo propuesto  |