

PROGRAMA SANITARIO GENERAL LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES DE ANIMALES ACUÁTICOS

NORMA TÉCNICA N° 3

Procedimientos para la validación y control de Calidad de los métodos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizados para el diagnóstico de enfermedades infecciosas en animales acuáticos

Enero 2025

Índice

I.	Introducción.....	3
II.	Definiciones	4
III.	Objetivo	6
IV.	Alcance.....	6
V.	Antecedentes Generales.....	6
1.	Etapa 1 – Características del rendimiento analítico.....	7
2.	Etapa 2 – Características del rendimiento diagnóstico de la prueba.	12
3.	Modificaciones y mejoras.....	17

I. Introducción

**** Los términos y procedimientos técnicos descritos en la presente norma están basados en las disposiciones incluidas en el capítulo 1.1.2 del Manual de Pruebas Diagnósticas para los Animales Acuáticos y en la sección 2.2 del Manual de Pruebas Diagnósticas para los Animales Terrestres, ambos documentos de la Organización Mundial de Sanidad Animal, OMSA (Ed. 2021).***

El siempre cambiante repertorio de nuevos y específicos reactivos de diagnóstico, junto con la existencia de muchos nuevos formatos y protocolos analíticos ha requerido grandes debates sobre cómo validar adecuadamente cada una de estas pruebas y, en base a ello se ha definido lo siguiente:

La validación es un proceso que determina la idoneidad de una prueba, que se ha desarrollado, optimizado y estandarizado adecuadamente para un propósito concreto.

Todas las pruebas de diagnóstico (pruebas de laboratorio y de campo) deben validarse para la especie y matriz en la que se utilizarán.

La validación incluye estimaciones de las características de rendimiento analítico y diagnóstico de una prueba.

Para que una prueba siga estando validada, es necesario realizar un cuidadoso seguimiento del rendimiento de la misma en las condiciones habituales de uso, controlando el comportamiento de los controles de la prueba a lo largo del tiempo. Solo esto garantizará que la prueba, mantenga siempre sus características de rendimiento.

La inclusión del desarrollo de una prueba debe considerarse necesaria como parte del proceso de validación de la misma, ya que tres de los criterios de validación requeridos (definición del/los objetivo/s buscado, optimización y estandarización) que deben evaluarse para llegar a la validación de una prueba incluyen pasos de su proceso de ejecución, no obstante, por razones prácticas, la presente norma no abarca la etapa de desarrollo de una prueba, pero esta puede revisarse en el capítulo correspondiente en el manual de la OMSA.

Para orientar a los usuarios en cuanto a la validación de pruebas esta norma se refiere genéricamente en los criterios que se deben cumplir durante la realización y la validación de pruebas de cualquier tipo, sin embargo, dado el escenario del sistema diagnóstico que tenemos en Chile y la tendencia mundial, se centra principalmente en las pruebas de Detección de Ácidos Nucleicos (NAD).

Las técnicas de amplificación para la NAD suelen basarse en el principio de que hay una amplificación exponencial de la secuencia específica que se pretende detectar en la reacción. Ello aporta una NAD con sensibilidad y especificidad analíticas altas. Debido a este característico nivel alto de sensibilidad

logrado con la NAD, se debe proceder con cuidado y, de hecho, se deben emprender pasos preventivos especiales para impedir la contaminación de la NAD por amplicones en los análisis de las siguientes muestras. Para evitar tal contaminación, se deben aplicar estrictos protocolos de laboratorio que incluyan salas o cabinas independientes para cada fase de las pruebas, cambios de batas y guantes de laboratorio y rigurosos programas de limpieza.

II. Definiciones

Comparabilidad: término usado cuando las características de rendimiento de una nueva prueba, que ha sido sometida a un cambio menor, son igual de buenas que las de la prueba validada dentro de unos límites definidos estadísticamente

Especificidad Analítica: capacidad de un ensayo para detectar solo el analito objetivo y que la cuantificación de este no se debe ver afectada por la reactividad cruzada de otros analitos relacionados o potencialmente interferentes. En otras palabras, es la fracción del total de negativos correctamente asignados por la prueba.

Especificidad Diagnóstica: Es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano, es decir, la probabilidad de que para un animal sano se obtenga un resultado negativo. En otras palabras, la capacidad para detectar a los sanos.

Intervalo de funcionamiento de una prueba: es el intervalo de concentraciones o títulos del analito en el cual el método aporta una exactitud y precisión idónea.

Muestras de referencia positivas: Aquellas obtenidas a partir de animales infectados por vía natural o infectados experimentalmente y que provengan, en primera instancia desde un laboratorio de referencia (LR), ya sea nacional, internacional u OMSA. En la eventualidad que el material necesario no pueda ser provisto por un LR, podrá ser provisto por un laboratorio registrado por el Servicio de acuerdo al D.S.15/2011, siempre y cuando éste posea el ensayo diagnóstico para el patógeno en cuestión debidamente validado y acreditado (ISO 17.025).

Muestras de referencia negativas: Aquellas que hayan demostrado, por técnicas de referencia de la OMSA, ser negativas al agente objetivo y que provengan, en primera instancia desde un laboratorio de referencia (LR), ya sea nacional, internacional u OMSA. En la eventualidad que el material necesario no pueda ser provisto por un LR, podrá ser provisto por un laboratorio registrado por el Servicio de acuerdo al D.S.15/2011, siempre y cuando éste posea el ensayo diagnóstico para el patógeno en cuestión debidamente validado y acreditado (ISO 17.025).

Muestras de referencia para agentes no presentes en el país: Aquellas muestras, material genético o extractos de material genético obtenidos a partir de animales infectados por vía natural o infectados experimentalmente. Este material deberá estar inactivado y contar con el certificado correspondiente emitido por el proveedor. Estas muestras deben provenir, en primera instancia

desde un laboratorio de referencia (LR), ya sea nacional, internacional u OMSA. En última instancia podrá considerarse el uso de material genético sintético.

Prueba de diagnóstico validada: es aquella que produce, de manera constante, resultados que identifican a los animales como positivos o negativos para un analito o proceso determinado que, por consecuencia, indican con exactitud el estado de infección del animal con un grado predeterminado de certeza estadística.

Robustez: capacidad de una prueba de no resultar afectada por pequeñas variaciones en las situaciones en que se lleva a cabo el análisis, que podrían tener lugar durante la ejecución de la prueba dentro de un mismo laboratorio

Sensibilidad Analítica: cantidad más pequeña de analito en una muestra que se puede detectar o medir con precisión mediante una prueba. En otras palabras, es la fracción del total de muestras que contienen el analito y que son correctamente asignados por la prueba.

Sensibilidad Diagnóstica: Es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo, es decir, la probabilidad de que un animal enfermo obtenga en la prueba un resultado positivo. En otras palabras, la capacidad del test para detectar el analito.

Validación: Proceso continuo de evaluación de una prueba (método analítico) para determinar la idoneidad de esta para un propósito concreto. Este proceso consiste en un conjunto de estudios técnicos que permiten conocer el grado en el cual los resultados producidos por una prueba de medición cuali o cuantitativa permiten tomar una decisión técnica correcta para un determinado propósito, o bien, confirmar por análisis y evidencias objetivas, que un conjunto de requerimientos específicos es cumplido.

Selectividad: grado en que un método puede cuantificar o detectar con exactitud el analito buscado en presencia de interferentes, productos de degradación, uniones inespecíficas y antígenos/anticuerpos vacunales.

Exclusividad: capacidad del método para detectar un analito o secuencia genómica que es propia del microorganismo buscado, y excluye todos los demás microorganismos conocidos que pudieran dar una reacción cruzada.

Inclusividad: capacidad de una prueba para detectar varias cepas o serovariedades de una especie, varias especies de un género o una agrupación similar de microorganismos o anticuerpos estrechamente emparentados.

III. Objetivo

Establecer las condiciones para la validación de ensayos diagnósticos para enfermedades de animales acuáticos, de manera que éstos proporcionen en forma consistente resultados positivos o negativos para un analito determinado, prediciendo con exactitud el estado de infección de los animales con un grado de certeza estadística.

IV. Alcance

Los procedimientos y exigencias incluidos en la presente norma deberán ser aplicados por 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.

V. Antecedentes Generales

Todos los laboratorios que deseen validar una prueba diagnóstica en el marco de esta norma deberán trabajar en base a un Sistema de Gestión de la Calidad basado en la Norma ISO/IEC 17025 en su versión vigente, ya que con ello, se minimizará la influencia de factores que no dependen de la prueba en sí, como el instrumental, errores del operario, la elección del reactivo (químico o biológico) y la calibración, los recipientes y plataformas de reacción, la calidad del agua, el pH y la ionicidad de tampones y diluyentes, las temperaturas y duraciones de incubación, y los errores en el rendimiento técnico de la prueba.

Los laboratorios de diagnóstico, como primer paso, deberán considerar la asignación de responsabilidades para el desarrollo de los procesos de validación, teniendo como mínimo las siguientes consideraciones:

- El Jefe o encargado de laboratorio: deberá velar por el cumplimiento de todos los procedimientos incluidos en la presente norma y será responsable de la toma de decisiones que corresponda.
- El analista encargado: responsable de la ejecución de los procedimientos.
- El encargado de gestión de calidad: deberá fiscalizar y registrar todos los procedimientos para velar que éstos se realicen de acuerdo a los estándares de calidad requeridos por la norma.

Luego de ello el paso siguiente en la validación de una prueba será comprender y establecer claramente el objetivo de la prueba, ya sea que este haya sido definido por el propio laboratorio o por el Servicio, dado que esto guiará todos los pasos subsiguientes del proceso de validación, para los cuales se deben tener en cuenta las variables que pueden afectar al rendimiento de una prueba. Estas variables pueden agruparse en 3 categorías:

- a) Relativas a la muestra: si son individuales o agrupadas (pools), la composición de la matriz, y las interacciones hospedador/microorganismo que afecten al analito en cuestión cuantitativa o cualitativamente;
- b) Relativas al sistema analítico: que incluyen factores físicos, químicos, biológicos y técnicos que afectan a la capacidad de la prueba de detectar en la muestra un analito específico; y
- c) Relativos a la interpretación del resultado de la prueba: capacidad del sistema analítico de indicar de forma precisa el estado del individuo o de la población en relación con el propósito con el cual se aplica la prueba.

La elección, obtención, preparación, conservación y manejo de las muestras son variables cruciales en el diseño, desarrollo y validación de una prueba para garantizar resultados analíticos válidos, ya que *“La integridad de los resultados experimentales durante la ejecución y validación de una prueba será como mucho igual de buena que la calidad de las muestras que se utilicen.”*

Otras variables, como el transporte, la cadena de custodia, la rastreabilidad de las muestras y el sistema de gestión de la información del laboratorio también son fuentes clave de variación/error que se convierten en especialmente importantes cuando la prueba se implementa para un análisis sistemático y, por tanto, antes de iniciar las tareas de validación de una prueba, es importante prever los factores que pueden afectar negativamente a la calidad de la muestra.

Las muestras de referencia que se utilicen en la ejecución y validación de una prueba deberán encontrarse en la misma matriz que se va a utilizar en la prueba (por ejemplo, suero, tejido o sangre total), debido a que esta puede contener inhibidores que impidan el buen funcionamiento de ciertas pruebas y, además deberán ser representativas de la especie que vaya a analizarse mediante dicha prueba. Los materiales de referencia deberán representar adecuadamente el intervalo de concentraciones de analito a detectar mediante la prueba.

1. Etapa 1 – Características del rendimiento analítico.

1.1. *Materiales de referencia.*

Los materiales de referencia son sustancias cuyas propiedades son suficientemente homogéneas y están lo suficientemente bien caracterizadas como para utilizarlas en la calibración de un aparato, la evaluación de un método de medición o para evaluar un valor respecto a dichos materiales. Sin embargo, en el contexto de la validación de métodos, los materiales o muestras de referencia contienen el analito de interés a distintas concentraciones y se utilizan en el desarrollo y evaluación del rendimiento diagnóstico y analítico de la prueba.

Estas muestras pueden ser obtenidas desde animales natural o artificialmente infectados o sus entornos, pero también, en algunos casos, pueden prepararse en el laboratorio a partir de una muestra original que contiene grandes cantidades del agente o en ocasiones añadiendo a la matriz en cuestión un analito de fabricación sintética.

En el caso de pruebas que puedan aplicarse a varias especies, las muestras deben ser representativas de la principal especie de interés y es fundamental que estas muestras reflejen tanto el analito en cuestión como la matriz en la que se halla en la población a la que va destinada la prueba. Asimismo, los materiales de referencia deben representar de forma adecuada todo el intervalo de concentraciones del analito que la prueba deberá detectar.

En general se considera que las muestras necesarias para las pruebas de NAD serán similares a las que se utilizan para los métodos habituales de detección y serán, para el caso de pruebas oficiales, debidamente definidas por el Sernapesca, sin embargo, en el caso que no sea así, deben considerarse los siguientes aspectos en su definición:

- ¿Qué tipo de muestras (peces-órganos) se utilizarán de la población objetivo?
- ¿Cuáles son los sitios preferidos (órganos blanco) para el agente en la especie hospedadora?
- ¿Qué métodos de recolección, almacenamiento y transporte se anticipan y cuáles son los posibles efectos en los resultados?
- ¿Las muestras (peces) serán individuales o agrupadas (pools)?
- ¿En el caso de ser muestras agrupadas, serán distintas muestras (órganos) de un mismo animal o de diferentes animales?
- ¿Las muestras en el panel de validación serán representativas de la población objetivo?

Para dilucidar estas interrogantes se debe conocer la biología del agente patógeno en cuestión, su relación con el huésped y el proceso infeccioso de la enfermedad, definiendo de esta forma una o más (pool) matrices en las que reside el analito, estudiando a su vez el efecto de la dilución en la sensibilidad diagnóstica. También deben considerarse la presencia de inhibidores de la PCR en las matrices y materiales seleccionados para los muestreos.

En la mayoría de los casos es aceptable utilizar muestras preparadas a las que se añaden concentraciones conocidas del analito o una serie de diluciones de una muestra fuertemente positiva en una matriz negativa para crear un intervalo de concentraciones. Sin embargo, debe considerarse, tanto si son naturales como preparadas, las muestras de referencia deben representar el intervalo previsto de concentraciones del analito, desde débilmente positiva a fuertemente positiva, que sería esperable durante un curso clásico de la infección. Debe incluirse una muestra de referencia negativa como control negativo.

Si se utiliza una muestra negativa (matriz) como diluyente para preparar una muestra de referencia positiva, esta matriz debe incluirse como muestra de referencia negativa.

Todas las muestras de referencia deben estar bien caracterizadas, ello incluye documentación tanto acerca del agente patógeno como del hospedador donante. En el caso de los agentes patógenos, puede incluir detalles relativos a la cepa, el serotipo, el genotipo, el linaje, etc. La procedencia del

material del hospedador también debe detallarse bien en cuanto a especie, raza, edad, sexo, estado reproductivo, historial de vacunaciones, antecedentes del grupo, etc. Si es posible también debe indicarse la fase de la infección, lo cual podría incluir detalles relativos a los signos clínicos.

En los casos, que la infección o exposición experimental sea la única opción viable para producir el material de referencia, debe detallarse todos los aspectos anteriores más el protocolo experimental utilizado.

1.2. Viabilidad.

Esta etapa constituye un paso preliminar en la validación de un nuevo ensayo. Su objetivo es determinar si un ensayo cumple con el objetivo propuesto y puede detectar una gama de concentraciones de analito o agente, sin actividad de fondo. Para ello deberán tenerse en consideración los siguientes aspectos:

- ¿Es suficientemente sensible y el objetivo a analizar es lo bastante inclusivo para no pasar por alto muestras positivas?
- ¿Pueden confirmarse los resultados o habrá una proporción que no pueden confirmarse?
- ¿Es posible y/o necesaria una rapidez de los resultados?
- ¿Se utilizarán las pruebas (una herramienta analítica) para determinar/confirmar la cepa, variante, virulencia, etc.) del agente patógeno?
- ¿Tendrá la determinación de la cepa un peso importante en la acción emprendida?

Para realizar esta comparación, se debe usar un grupo pequeño de seis a ocho muestras bien caracterizadas (referencia) respecto al agente objetivo, considerando todo el intervalo de funcionamiento de la prueba, es decir, debe haber al menos dos muestras negativas, dos muestras fuertemente positivas, dos muestras débilmente positivas y, de ser posible dos muestras que se sitúen en la parte central del intervalo. Idealmente estas muestras deben proceder de distintos animales.

Los resultados obtenidos deben registrarse claramente en una planilla y se deberá evaluar la necesidad de analizar una serie de diluciones (analito diluido en la matriz), para establecer adecuadamente la viabilidad de prueba.

*** Esta etapa no será aplicable en la validación de métodos diagnósticos definidos mediante procedimientos oficiales (LABD NT-2).**

1.3. Repetibilidad.

La repetibilidad es el nivel de concordancia entre resultados de réplicas de una muestra tanto intra como entre ejecuciones del mismo método analítico en un laboratorio determinado. Esta se calcula mediante la evaluación de la variación de resultados de varias réplicas.

Para llevar a cabo esta etapa deberán tomarse un mínimo de 3 y preferiblemente 5 muestras de referencia que contengan respectivamente cantidades alta, media y baja del analito y dividirse cada una de ellas en 5 alícuotas. Cada una de estas alícuotas deberá procesarse como si fuera una muestra problema, pasando por todos los pasos de la prueba (homogenización, extracción, etc.).

No resulta aceptable crear réplicas de una extracción de ácido nucleico en lugar de extraer cada réplica antes de llevar a cabo la dilución en el interior de los pocillos de reacción.

Cada alícuota debe analizarse en triplicado en días o ciclos diferentes, pero por el mismo operario y se deberá repetir la prueba para cada operario que realice los análisis. Deben registrarse y compararse los resultados obtenidos y la variación en los resultados tanto intra (triplicado) como entre las distintas réplicas (con las diferentes ejecuciones) podrá expresarse como desviaciones estándar y coeficientes de variación (desviación estándar/media de réplicas). Cada laboratorio en base a su experiencia y tomando en cuenta los objetivos de la prueba deberá definir cuales son los valores máximos aceptados de variación (los LNR consideran que valores menores a un 10% de CV% son aceptables), los cuales deberán estar debidamente respaldados en sus respectivos procedimientos de validación.

1.3.1. Incertidumbre de la Medición.

El proceso de medición para la detección de un analito en una muestra diagnóstica no es del todo reproducible y, por lo tanto, no existe un valor exacto que pueda asociarse al analito medido. Así pues, el resultado se expresa con mayor exactitud como una estimación junto a un nivel asociado de imprecisión. Esta imprecisión es la incertidumbre de la medición (MU).

Con la finalidad de estimar la MU en el caso de ensayos de qPCR, las mediciones estadísticas adecuadas son los valores objetivos medios ± 2 desviaciones estándar (SD), lo cual es equivalente a un intervalo de confianza de 95%.

Podrán utilizarse para la estimación de MU del ensayo, los datos obtenidos (Ct) en el estudio de repetibilidad para los controles positivos, a los cuales deberá aplicarse la siguiente fórmula (enfoque “de arriba abajo”):

- Promedio de Cts obtenidos: Media obtenida de los Ct intra y entre réplicas de los controles positivos usados en la determinación de repetibilidad.
- Desviación estándar o SD: desviación estándar obtenida de la variación de los Ct intra y entre réplicas de los controles positivos usados en la determinación de repetibilidad.
- Desviación estándar relativa o RSD = SD/media

$$\text{MU} = 2 \times \text{RSD}$$

La incertidumbre tiene especial importancia en las muestras que obtienen resultados (valores de Ct) cercanos al límite de corte para el ensayo, ya que esto puede crear una “zona gris” o de menor confianza. Cada laboratorio en base a su experiencia y tomando en cuenta los objetivos de la prueba deberá definir cuál es el valor de MU máximo aceptado, los cuales deberán estar debidamente respaldados en sus respectivos procedimientos de validación.

1.4. Especificidad analítica (ASp).

La especificidad analítica (ASp) es la capacidad de la prueba de distinguir entre el analito buscado y analitos no buscados, incluidos componentes de la matriz.

En este punto es importante identificar, en función del propósito previsto de una prueba, 3 características esenciales como lo son la *selectividad*, *exclusividad* e *inclusividad*. Se deberá respaldar lo anterior con análisis bioinformáticos de las diferentes cepas y/o variantes del microorganismo y las pruebas de campo que avalen dichos resultados.

Para determinar la especificidad del método, se deberá analizar un mínimo de 2 muestras diferentes con los principales agentes patógenos de salmones, en particular aquellos estrechamente relacionados con el agente objetivo. Estos análisis se deberán repetir en triplicado para los patógenos y matrices a partir de las cuales se realice la determinación, considerando en cada caso la incorporación de un control negativo y uno positivo. Los resultados obtenidos deben ser registrados y analizados para la obtención de la especificidad analítica.

La reactividad cruzada (ASp inferior al 100%) puede ser aceptable en función del uso propuesto de la prueba.

1.5. Sensibilidad analítica (ASe) o Limite de detección (LOD).

La sensibilidad analítica del método se define como la cantidad más pequeña del agente objetivo o sus sub-unidades que puede detectarse, en otras palabras, la concentración más baja en la cual se obtiene un resultado positivo con un 95 o 99% de confianza.

Esta se debe estimar empleando un estudio de dilución hasta la extinción (DTE) en el que se generan diluciones seriadas de una cantidad cuantificada y conocida del analito en cuestión en la matriz de muestra apropiada. Esta cantidad cuantificada y conocida podría ser de un patrón de referencia o de una muestra de campo cuya concentración de analito se ha determinado previamente.

Se realizarán las diluciones seriadas en base 10 de esta muestra hasta dos diluciones posterior a que el análisis arroje resultados negativos, analizando 10 repeticiones de cada dilución y se registran los resultados. Sobre la base de los resultados obtenidos y utilizando una curva de regresión logística, se calcula la concentración en la que es posible detectar un 95% o 99% de muestras positivas y con ella se define el LOD. En los casos que sea necesario una estimación precisa del LOD, podría diseñarse un segundo estudio para determinar el LOD con mayor certidumbre empleando una serie de diluciones más finas, por ejemplo, a la mitad, que incluirán el intervalo entre el 100% de detección y el 0% de detección identificado en el primer estudio. Cada laboratorio en base a su

experiencia y tomando en cuenta los objetivos de la prueba deberá definir e informar, en sus respectivos procedimientos de validación, su forma de cálculo para el LOD, como por ejemplo la media ± 2 desviaciones estándar (SD).

1.6. Exactitud analítica de las pruebas o procedimientos complementarios.

Estas suelen ser pruebas o procedimientos complementarios secundarios que se aplican a un analito que se ha detectado en una prueba primaria, por ejemplo, el RT-qPCR específico para ISAV HPR0.

El propósito de tales instrumentos de análisis es caracterizar en mayor grado el analito detectado en la prueba primaria.

Estas pruebas complementarias deben validarse en cuanto a las características de rendimiento analítico (Etapa 1), pero difieren de las pruebas diagnósticas en que no requieren validación relativa a las características de rendimiento diagnóstico (Etapa 2) ya que sus resultados no se utilizan para establecer un diagnóstico final respecto al propósito deseado.

En este ámbito especial importancia tiene el ensayo específico de RT-qPCR para detectar la variante HPR-0 de ISAV, en cuyo caso se deberá realizar una comparación con otras variantes de virus ISA para determinar su exclusividad y para ello se deberá solicitar al Laboratorio Nacional de Referencia de ISAV un conjunto de muestras para análisis, las cuales consistirán en muestras de RNA o DNA (completo o sólo la región de estudio) correspondientes a diferentes HPRs, en distintas concentraciones. Los resultados deberán ser registrados, analizados e incluidos en el informe de validación para la obtención de la especificidad analítica.

2. Etapa 2 – Características del rendimiento diagnóstico de la prueba.

2.1. Sensibilidad (DSe) y especificidad diagnóstica (DSp)

La sensibilidad diagnóstica (DSe) corresponde a la proporción de animales positivos de referencia (animales que se sabe que están infectados) que dan respuesta positiva en el ensayo. Por su parte, se entiende por especificidad diagnóstica (DSp) como la proporción de animales negativos de referencia (animales que se sabe no están infectados) que dan respuesta negativa en el ensayo.

La estimación de estos parámetros es fundamental para evaluar el rendimiento de una prueba, por tanto, lo ideal es que estos cálculos deriven del análisis de un conjunto de muestras procedentes de animales de referencia, cuyos antecedentes y estado en cuanto a la enfermedad/infección en cuestión se conozcan y sean relevantes para el país o región en los cuales se va a utilizar la prueba. Comúnmente, las muestras de referencia negativas se obtienen de animales que viven en regiones donde la enfermedad no está, mientras que las muestras positivas suelen obtenerse de animales con signos clínicos que han sido confirmadas en el laboratorio. Ello puede dar lugar a estimaciones excesivamente optimistas de la DSe y la DSp porque las muestras no representan todo el espectro del proceso de la enfermedad, es decir, no se incluyen los animales subclínicos, que pueden tener

cargas de agente patógeno muy distintas a las de los animales que sufren un cuadro de la enfermedad aguda o crónica.

El número designado de muestras que se sepa que son positivas y muestras que se sepa que son negativas dependerá de cuáles sean los valores probables de DSe y de DS_p de la prueba candidata y del nivel de confianza deseado para las estimaciones (Tabla 1 y Jacobson, 1998).

Tabla 1. Cantidad teórica de muestras procedentes de animales que se sabe si están o no infectados, necesaria para establecer las estimaciones de DSe y DS_p en función del valor probable de DSe o DS_p y del margen de error y el nivel de confianza deseados.

Estimación de DSe o DS _p	2% de error permitido en la estimación de la DSe y la DS _p			5% de error permitido en la estimación de la DSe y la DS _p		
	Confianza			Confianza		
	90%	95%	99%	90%	95%	99%
90%	610	864	1493	98	138	239
92%	466	707	1221	75	113	195
94%	382	542	935	61	87	150
95%	372	456	788	60	73	126
96%	260	369	637	42	59	102
97%	197	279	483	32	45	77
98%	133	188	325	21	30	52
99%	67	95	164	11	15	26

De acuerdo a las limitaciones logísticas y financieras de nuestro sistema, se evaluará la factibilidad de un tamaño de muestra inicial inferior al exigido estadísticamente, en cuyo caso el intervalo de confianza calculado para la DSe y la DS_p indicarán menor confianza diagnóstica en los resultados. El tamaño de la muestra también puede resultar limitado por el hecho de que no se disponga de las poblaciones de animales de referencia ni los estándares de referencia de la OMSA.

Para calcular las estimaciones de DSe y la DS_p de la prueba candidata, los resultados de la prueba deben reducirse antes a categorías (positivo, negativo o indeterminado). Ello se logra insertando, en base al rendimiento analítico de prueba, uno o dos puntos de corte o valores umbral (límites de decisión) en la escala continua de resultados de la prueba.

Para efectos prácticos se asumirá para las pruebas de NAD una DSe y DS_p de 97% y se exigirá un 95% de confianza permitiendo un error de hasta el 5% (cuadro destacado en tabla 1), lo que se traduce en el uso inicial de 45 muestras positivas y 45 negativas para el analito buscado. Cabe mencionar que, con el paso del tiempo este número inicial podrá incrementarse, aumentando así la confianza diagnóstica de los resultados.

Para el cálculo de la DSe y de la DS_p se deberán tabular en forma cruzada los resultados de la prueba en una tabla de 2x2 como se muestra en el ejemplo de la tabla 2.

Tabla 2. Estimaciones de la sensibilidad y especificidad diagnósticas calculadas a partir de un conjunto hipotético de resultados de muestras analizadas procedentes de poblaciones que se sabe que están infectadas o de poblaciones que se sabe que no están infectadas.

		Muestras de referencia*			
		Que se sabe son positivas (45)		Que se sabe que son negativas (45)	
Resultados de la Prueba evaluada	Positivos	43	VP	FP	1
	Negativos	2	FN	VN	44
		DSe VP/(VP+FN) 95.6%		DS _p VN/(VN+FP) 97.8%	

* Basado en tabla 1 para una prueba con los siguientes parámetros:

- 1.- DSe y DS_p asumida para pruebas NAD de 97%
- 2.- 95% de confianza requerido
- 3.- 5% de error permitido

(*) VP = Verdadero positivo, VN = Verdadero negativo, FN = Falso negativo, FP = Falso positivo.

Al evaluar los resultados obtenidos en el ejemplo se observa que la DS_p calza con lo previsto (97%), sin embargo, la DSe es inferior (95,6%) al valor previsto (97%) y, por tanto, si se vuelve a mirar la tabla 1 se ve que es necesario aumentar el número de muestras a 59 para realizar el cálculo con mayor exactitud.

En el caso de una enfermedad que no sea endémica ni esté diseminada, inicialmente podría ser imposible obtener el número de muestras requerido, pero con el tiempo, la acumulación de datos adicionales permitirá el ajuste del punto de corte (umbral) o, en el caso de que no se precise ajuste, una mejora de la confianza en las estimaciones.

Cabe mencionar que, discrepancias entre técnicas clásicas de aislamiento y de NAD son comunes y estas deben analizarse considerando que la base de ambos sistemas analíticos es distinta, por ejemplo, uno de ellos requiere microorganismos viables y el otro no o una es más susceptible a los inhibidores que la otra. Las estrategias para resolver estas discrepancias, aunque no sean las únicas, consisten en la secuenciación (que permite demostrar que el agente patógeno de interés estaba en una muestra determinada) o el análisis mediante otra prueba molecular.

2.2. Reproducibilidad

la reproducibilidad corresponde al grado de concordancia de resultados de un mismo ensayo al aplicarlo a alícuotas de las mismas muestras analizadas en distintos laboratorios empleando el mismo protocolo y un equipo similar (preferiblemente el mismo).

Para evaluar preliminarmente la reproducibilidad puede utilizarse un grupo de al menos 20 muestras ciegas (idealmente 30) que incluyan 10 - 20 muestras positivas a diferentes cantidades del agente objetivo (cargas bajas, medias y altas) y 10 muestras negativas al agente objetivo, en al menos dos laboratorios diferentes en cuadruplicado y usando exactamente la misma prueba (protocolo, reactivos y controles). Es importante que en estas pruebas se evalúe todo el proceso desde la muestra original en la matriz correspondiente.

Para la determinación de la reproducibilidad diagnóstica final el laboratorio deberá tener disponibles los resultados de su participación en rondas de ensayos de comparación interlaboratorios.

2.3. Reconocimiento de prueba provisionalmente validada

El Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (Sernapesca) podrá, en ocasiones excepcionales, reconocer una prueba como “Provisionalmente Validada”, entendiéndose que este proceso en algunas ocasiones puede ser difícil, lento o extremadamente costoso de completar. Para ello deberán cumplirse las siguientes condiciones:

- Se han evaluado los parámetros básicos de la prueba, es decir, ASe, ASp y repetibilidad.
- Se han realizado las estimaciones preliminares de DSe, DSp y reproducibilidad.
- La prueba detecta un agente que no es endémico o no se encuentra diseminado.

El reconocimiento provisional de una prueba por parte del Sernapesca significa que no se ha completado el proceso de validación, pero puede utilizarse oficialmente y así el laboratorio deberá desarrollar y seguir un protocolo para añadir y evaluar muestras, a medida que se disponga de ellas, con el fin de completar el proceso y cumplir este requisito. Este proceso debe limitarse a un periodo de tiempo concreto que el laboratorio deberá informar al Servicio cuando se solicite el reconocimiento provisional.

2.4. Reconocimiento de prueba validada

Al terminar la validación, suponiendo que las fases anteriores se hayan superado total y satisfactoriamente, la prueba puede considerarse “validada para el propósito inicial deseado”. El que se mantenga esta designación depende de si se lleva a cabo un seguimiento continuo del rendimiento de la prueba, como se describe en el numeral 2.5.

2.5. Seguimiento de la prueba tras la validación inicial

Para que una prueba siga considerándose validada, es necesario asegurarse de que la misma conserva las características de rendimiento tal como se definieron durante la validación. Esto se determina mediante un programa de garantía de calidad, en el cual se hará un seguimiento cuidadoso del rendimiento diario de la prueba al analizar los controles internos, así como de la tendencia a dar datos atípicos.

Los controles para la PCR son muchos y variados, pero los fundamentales que deben tenerse en cuenta son los siguientes:

- 1) Control respecto a la especie hospedadora. Este control permite comprobar que la especie hospedadora se ha muestreado adecuadamente, utilizando para ello la detección de un fragmento seleccionado del genoma del hospedador (*housekeeping gene*). Para el caso particular de los salmónidos (*Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss* y *Oncorhynchus kisutch*) este gen corresponde al factor de elongación 1 alfa (ELF-1 α), el cual deberá aplicarse según lo establecido por Sepúlveda *et al.*, 2013. Cada laboratorio, deberá definir y establecer los rangos de Ct (máximo y mínimo) en que considera adecuada la amplificación del mismo.
- 2) Control sin molde. Este control revela si se ha producido contaminación de la muestra, dando lugar a un producto amplificado cuando no debería haber, como en el caso de las muestras que no contienen el analito a detectar. Debe tenerse en cuenta el número y posición de los controles sin molde. En general, se distribuyen aleatoriamente varios controles sin molde (en alrededor de un 5% de los pocillos) durante la prueba o por la placa cuando se utilizan formatos de placas de 96 y de 386 pocillos.
- 3) Control positivo para el analito. Este control positivo, que tiene una actividad de ciclo umbral (Ct) de la qPCR situada dentro del intervalo de funcionamiento definido para la prueba, se utiliza en cada placa. Una buena opción para este control podría ser un plásmido que contenga la secuencia blanco, que puede utilizarse para comprobar si el nivel de amplificación de la prueba es el esperable.
- 4) Control de la inhibición. Teniendo en cuenta el procedimiento de muestreo y las matrices a utilizar se deberá establecer la necesidad de incluir este tipo de controles. Una opción es utilizar el *housekeeping gene*, específicamente el requerido por el Servicio, en la LABD NT-2, es el Factor de elongación 1 alfa (ELF-1 α), publicado por Sepúlveda *et al.*, 2014, sin embargo, se debe tener en cuenta que estos genes a menudo se encuentran en abundancia, de tal modo que a veces pueden detectarse incluso en presencia de sustancias inhibitorias.

En forma práctica, algunos laboratorios vuelven a analizar una parte (1–5%) de muestras retenidas para comprobar si la prueba está rindiendo siempre del mismo modo en todas las ejecuciones. Asimismo, es sabido que los virus de ARN evolucionan rápidamente y pueden producirse mutaciones puntuales, de tal modo que es necesario confirmar con regularidad al menos 1 vez al año usando 10 muestras positivas, las secuencias de nucleótidos de los puntos del partidador y la sonda para asegurarse de que siguen siendo adecuadas.

3. Modificaciones y mejoras

Con el tiempo, es probable que sea necesario aplicar modificaciones en la prueba para abordar posibles cambios en el propósito de la prueba, en los analitos estudiados o bien en las características técnicas, con el fin de mejorar la eficiencia o la relación costo-eficiencia de la prueba.

En caso de que se produzca un cambio en el propósito de la prueba, será obligatoria una validación revisada desde la Etapa 2 en adelante, pero existen algunas ocasiones en que las modificaciones tienen relación con que la prueba se aplicará a una población diferente de la que se validó o cuando se hace necesario hacer pequeñas modificaciones que permitan sobrellevar variaciones puntuales o mutaciones de los microorganismos.

3.1. Modificaciones técnicas, biológicas y reposición de reactivos por evaluaciones de la comparabilidad

Se consideran modificaciones técnicas los cambios de analistas, instrumental, equipos o de protocolos de extracción, por ejemplo, la conversión de una prueba en un sistema semiautomático o totalmente automático utilizando la robótica.

Por su parte se consideran modificaciones biológicas las modificaciones de matriz, tejido o incluso especie animal.

En ambos casos, modificaciones técnicas y biológicas debe determinarse si el cambio es mayor y requiere una revalidación completa (analítica y diagnóstica) o es menor y solo requiere demostrar mediante un estudio de comparabilidad si una prueba validada sigue cumpliendo con el objetivo previsto. Para ello deben tomarse en cuenta las bases biológicas de la prueba, en la tabla 3 se muestran algunos ejemplos de cambios mayores o menores.

Tabla 3: Ejemplos de cambios en pruebas de diagnóstico.

Tipo de Cambio	Cambios en una prueba	Cambios en la población o muestras estudiadas
Menor	<ul style="list-style-type: none"> • Sustitución de un reactivo agotado • Cambio de instrumento/plataforma • Paso de una manipulación manual a una robótica • Cambio en el procedimiento de extracción de ácido nucleico • Uso de partidores o sondas modificados (sustitución parcial de secuencias, por ejemplo, por degeneración) • Modificación de las condiciones de reacción de la PCR empleando los mismos partidores y sondas • Adición de una sonda más en la región amplificada 	

	<ul style="list-style-type: none"> • Cambio en la química de la sonda (NAD) 	
Mayor	<ul style="list-style-type: none"> • Cambio de partidores y sondas para cada blanco en distintas regiones de los mismos o distintos genes 	<ul style="list-style-type: none"> • Distintas especies • Distintos tipos de muestra, por ejemplo, sangre en lugar de esperma, o bien órganos o tejidos distintos

Para desarrollar una prueba de comparabilidad se debe, en primer lugar, realizar una comparación entre el método antes de la modificación y el método post modificación utilizando para ello un conjunto de 10 muestras negativas y 10 muestras positivas, estas últimas deben incluir muestras con cantidades alta, media y bajas del analito. Una vez que se tengan las muestras adecuadas deberán evaluarse por triplicado y en, al menos en 3 ejecuciones.

Los resultados de estas comparaciones deberán evaluarse visualmente, en primera instancia y luego realizar un diagrama de dispersión o un histograma que permita visualizar la correlación y dispersión de los datos. También puede ser útil el cálculo de las medias, desviación estándar y coeficiente de variación y, finalmente, un análisis estadístico básico para fijar límites superior e inferior y de esa manera evaluar los resultados. Cada laboratorio en base a su experiencia y tomando en cuenta los objetivos de la prueba deberá definir la aproximación estadística a utilizar y sus criterios de aceptación, quedando debidamente respaldadas en sus respectivos procedimientos de validación.

De acuerdo a los resultados de esta comparación se determina si las pruebas evaluadas son comparables. Algunas recomendaciones para las pruebas de qPCR es que las diferencias de Ct no sean mayores a 1, 2 o 3 Ct en el 95% de las muestras. Por otra parte, si las pruebas resultan no ser comparables y se evidencia que los cambios afectan las características del método documentado previamente se requerirá de una revalidación.

Para el caso de la reposición de reactivos agotados (partidores, sondas, controles o muestra estándar) es fundamental preparar y analizar repetidamente un repuesto antes de que estos se agoten evaluando que no se produzcan desviaciones en los resultados producto del uso del nuevo reactivo respecto al anterior y, si estas se producen, evaluar la proporcionalidad y considerarla. Es recomendable cambiar solo un reactivo cada vez para evitar evaluar más de una variable.