



# **PROGRAMA DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES DE ANIMALES ACUÁTICOS**

## **NORMA TÉCNICA Nº 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.**

**UNIDAD DE ACUICULTURA  
SERVICIO NACIONAL DE PESCA  
CHILE**

**INDICE**

I.	OBJETIVO .....	3
II.	ALCANCE .....	3
III.	ANTECEDENTES GENERALES .....	3
IV.	ETAPAS DE LA VALIDACIÓN .....	4
1.	Estudios de viabilidad .....	4
2.	Desarrollo y estandarización del ensayo .....	5
2.1.	Selección de las concentraciones óptimas de reactivos, los parámetros de los protocolos y el equipo .....	5
2.2.	Repetibilidad analítica, estimaciones preliminares .....	6
2.3.	Determinación de los parámetros esenciales de control .....	6
2.4.	Sensibilidad y especificidad analítica .....	6
2.4.1.	Sensibilidad analítica (límite de detección) .....	6
2.4.2.	Especificidad analítica .....	7
2.4.3.	Rango .....	7
3.	Determinaciones de las características operativas del Ensayo .....	8
3.1.	Sensibilidad y especificidad diagnósticas .....	8
3.2.	Repetibilidad y reproducibilidad diagnósticas .....	9
4.	Mantenimiento y mejora de los criterios de validación .....	9
4.1.	Precauciones y controles .....	10
4.1.1.	Precauciones para evitar resultados falsos positivos .....	10
4.1.2.	Controles internos (miméticos) para evitar falsos negativos .....	10
V.	PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DE ENSAYOS DE RT-PCR ESPECÍFICO PARA VIRUSISA HPR0 .....	11
VI.	BIBLIOGRAFÍA .....	13

## **I. OBJETIVO**

La presente Norma Técnica tiene por objetivos:

1.- Establecer las condiciones para la validación de ensayos de PCR utilizados para el diagnóstico de enfermedades de animales acuáticos, de manera que éstos proporcionen en forma consistente resultados positivos o negativos para un componente, prediciendo con exactitud el estado de infección de los animales con un grado de certeza estadística.

2.- Establecer las condiciones para la validación de ensayos de RT-PCR para la detección específica de la variante HPR0 del virus de la Anemia Infecciosa del Salmón (ISA), de manera que éstos proporcionen en forma consistente resultados positivos o negativos, prediciendo con exactitud la presencia o ausencia de la variante HPR0 del virus ISA con un grado de certeza estadística.

## **II. ALCANCE**

Los procedimientos y exigencias incluidos en la presente norma deberán ser observados por los laboratorios para realizar la validación de los métodos de diagnóstico de las enfermedades de animales acuáticos por PCR.

## **III. ANTECEDENTES GENERALES**

La validación de métodos cualitativos consiste en un conjunto de estudios técnicos que permite conocer el grado en el cual los datos producidos por un proceso de medición permiten tomar una decisión técnica correcta para un determinado propósito, o bien, confirmar por análisis y evidencias objetivas, que un conjunto de requerimientos específicos son cumplidos.

Una prueba validada produce, de manera constante, resultados que identifican a los animales como positivos o negativos para un analito o proceso determinado que, por inferencia, indican con exactitud el estado de infección del animal con un grado predeterminado de certeza estadística.

Los laboratorios de diagnóstico deberán considerar la asignación de responsabilidades para el desarrollo de los procesos de validación, teniendo 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 por que éstos se realicen de acuerdo a los estándares de calidad requeridos por la norma.

Los procedimientos técnicos descritos en la presente norma están basados en las disposiciones incluidas en el capítulo 1.1.3 del Manual de Pruebas Diagnósticas de la Organización Mundial de Sanidad Animal, OIE (Ed. 2006).

Adicionalmente, se deberán considerar los procedimientos generales de validación de métodos de diagnóstico indicados en el capítulo 1.1.2 de Manual aludido en el párrafo precedente.

Para el proceso de validación, podrán utilizarse como muestras de referencia positivas aquellas obtenidas a partir de animales infectados por vía natural o infectados experimentalmente. Por su parte, las muestras de referencia negativas, serán aquellas que hayan demostrado, por técnicas de referencia de la OIE, ser negativas al agente objetivo.

Para la validación de pruebas diagnósticas de agentes exóticos, no diagnosticados en nuestro país, el material de referencia para la validación corresponderá a extracto de material genético inactivado.

#### **IV. ETAPAS DE LA VALIDACIÓN**

##### **1. Estudios de Viabilidad**

Esta etapa constituye un paso preliminar en la validación de un nuevo ensayo. Su objetivo es determinar si en un ensayo se puede detectar una gama de concentraciones de analito o agente, sin actividad de fondo. Esta etapa no será aplicable en la validación de métodos diagnósticos en que se defina procedimientos oficiales.

Para realizar esta comparación, se debe usar una matriz inoculada al menos 10 diluciones del agente objetivo, considerando concentraciones altas y bajas, y además

10 muestras sin el agente. Los resultados obtenidos por cada una de las técnicas debe registrarse claramente en una planilla.

## **2. Desarrollo y Estandarización del Ensayo**

### **2.1. Selección de las concentraciones óptimas de los reactivos, los parámetros de los protocolos y el equipo**

En esta etapa se debe establecer las concentraciones óptimas de los componentes químicos y biológicos, los parámetros físicos así como las condiciones de almacenamiento y preparación de los reactivos y sus concentraciones, según referencias del protocolo, los equipos y aparatos dentro de un grupo de opciones disponibles, necesarios para realizar el ensayo.

Para llevar a cabo esta etapa se debe ocupar una serie de diluciones de una misma muestra con el agente objetivo, comparando los resultados obtenidos al utilizar los diferentes ítem del mismo tipo.

En forma previa se debe establecer una lista maestra en la cual se definan todos los ítem a comparar y las diferentes posibilidades de cada uno de ellos, considerando reactivos, materiales, Kits de extracción, Kits de RT-PCR, equipos, entre otros.

Con la lista anterior se deben definir las comparaciones cruzadas para cada uno de los ítem a evaluar, utilizando 10 diluciones en base 10 del agente en la matriz y 10 muestras negativas de la matriz.

Se deben registrar y comparar los resultados obtenidos para cada ítem por separado, para así definir los más idóneos para su uso en el diagnóstico.

Una vez definidos todos los ítem con los que se trabajará se debe establecer y llevar a cabo el proceso de optimización del ensayo, el cual puede realizarse con las mismas 20 muestras (10 positivas y 10 negativas).

Los procedimientos de toma de muestra, transporte y preparación, deben ser realizados conforme los procedimientos técnicos establecidos en la Norma Técnica de Muestreo para Diagnóstico de Enfermedades de Animales Acuáticos (LABD/NT1) de este Servicio.

## **2.2. Repetibilidad Analítica, Estimaciones Preliminares**

En esta etapa se debe determinar el grado de repetibilidad analítica de la técnica a validar, entendiendo por repetibilidad analítica la capacidad del ensayo de obtener el mismo resultado a partir de la misma muestra de referencia, realizado en diferentes momentos por el mismo operario.

Para llevar a cabo esta etapa debe tomarse una o más muestras de referencia que posean el agente objetivo previamente cuantificado, y dividirse en 6 alícuotas.

Podrán utilizarse como muestras de referencia aquellas obtenidas a partir de animales infectados por vía natural o infectados experimentalmente. Cada alícuota debe analizarse en días o ciclos diferentes pero por el mismo operario. Se deberá repetir la prueba para cada operario que realice los análisis. Deben registrarse y compararse los resultados obtenidos. Se debe calcular la repetibilidad analítica de la técnica.

## **2.3. Determinación de los parámetros esenciales de control**

El objetivo de esta etapa es determinar la robustez de la técnica, es decir, qué tan estable es frente a pequeñas modificaciones en los parámetros principales tales como tiempos, temperaturas, etc.

Se debe hacer un listado con todos los puntos críticos posibles de la técnica que puedan interferir en los resultados (tiempo, temperaturas, reactivos, materiales, equipos, etc). Una vez definidos los parámetros, se debe proceder a definir un rango en el que se hará variar cada una de estas condiciones. Se debe elegir una muestra positiva al agente y dividirla en tantas alícuotas como parámetros se deba evaluar. Se ejecutan los ensayos haciendo variar los parámetros como se había predefinido, y se registran los resultados obtenidos. En base a estos, se determina la robustez del ensayo y se definen cuáles son los puntos críticos, los que deben quedar establecidos en los procedimientos.

## **2.4. Sensibilidad y especificidad analítica**

### **2.4.1. Sensibilidad Analítica (límite de detección)**

La sensibilidad analítica del método se define como la cantidad más pequeña de copias de genoma del agente objetivo que puede detectarse y distinguirse a partir de un resultado cero.

En esta etapa se determina el límite de detección del ensayo o la concentración más baja en la cual se obtiene un resultado positivo con un 95% o 99% de confianza. Para este proceso se utiliza una curva de regresión logística.

Se deberá escoger una muestra que posea el agente diana previamente cuantificado. 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, se calcula la concentración en la que es posible detectar un 95% o 99% de muestras positivas y un 5% o 1% de muestras negativas. Los resultados deben ser graficados.

#### **2.4.2. Especificidad Analítica**

Se define como la capacidad de un ensayo para distinguir entre el agente objetivo y otros agentes.

El objetivo de este paso es determinar las posibles reacciones cruzadas que podría presentar la técnica con agentes diferentes al agente objetivo, la capacidad del ensayo de detectar distintas variantes de este y las capacidades de la técnica en diferentes matrices.

Para determinar la especificidad del método, se deberá analizar un mínimo de 2 réplicas de muestras con los principales agentes patógenos de salmones, en particular aquellos estrechamente relacionados con el agente objetivo. Estos análisis se deberán repetir para las distintas 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.

#### **2.4.3. Rango**

Se debe establecer el rango del ensayo, definido como el intervalo existente entre la concentración mínima y máxima en que el agente infeccioso objetivo ser detectado en forma fiable en una muestra. Esta estimación debe considerar la optimización del ensayo en la fase lineal de la curva de respuesta a la dosis.

### 3. Determinación de las características operativas del ensayo

#### 3.1. Sensibilidad y especificidad diagnósticas

La sensibilidad diagnóstica corresponde a la proporción de animales de referencia que se sabe que están infectados y que dan respuesta positiva en el ensayo. Por su parte, se entiende por especificidad diagnóstica, la proporción de animales de referencia que se sabe no están infectados y que dan respuesta negativa en el ensayo.

El objetivo de este paso es determinar la sensibilidad y especificidad diagnóstica y además la tasa de falsos positivos y negativos de la técnica en base al análisis de muestras de referencia.

Para ello se debe seleccionar 30 muestras positivas y 30 negativas para el agente objetivo, previamente chequeadas mediante una técnica de referencia OIE.

Estas deben ser analizadas en duplicado, registrando los resultados obtenidos. Sobre la base de éstos se calcula la sensibilidad y especificidad diagnósticas, así como el porcentaje de falsos positivos y negativos esperables, de acuerdo a la siguientes fórmulas:

**Sensibilidad diagnóstica:** Capacidad del método para detectar muestras verdaderamente positivas cuando son positivas.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VF}{VF+FN} * 100$$

**Especificidad diagnóstica:** Capacidad del método para detectar muestras verdaderamente negativas cuando son negativas.

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN+FP} * 100$$

**Falsos positivos (Desviación positiva)\*:** Probabilidad que una prueba entregue resultado positivo, siendo ésta negativa.

$$\text{Falsos positivos} = \frac{FP}{VN+FP} * 100$$



**Falsos negativos (Desviación negativa)\*:** Probabilidad que una prueba entregue resultado negativo, siendo ésta positiva.

$$\text{Falsos negativos} = \frac{FN}{VP + FN} * 100$$

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

### 3.2. Repetibilidad y Reproducibilidad Diagnósticas

La repetibilidad corresponde al grado de concordancia entre las réplicas en la misma serie de pruebas y entre una serie y otra.

Por su parte, la reproducibilidad corresponde al grado de concordancia de resultados de un mismo ensayo realizado en diferentes laboratorios.

Para la determinación de la repetibilidad del método, se deben seleccionar un número de 10 muestras de campo, 6 positivas y 4 negativas al agente objetivo. Se deben ejecutar los ensayos con 10 replicas para cada muestra y se deberán registrar los resultados obtenidos.

Esta determinación deberá ser realizada para cada uno de los analistas que realicen el ensayo al interior del laboratorio y los resultados obtenidos deberán ser comparados.

Para la determinación de la reproducibilidad diagnóstica el laboratorio deberá tener disponibles resultados de su participación en rondas de ensayo interlaboratorios.

### 4. Mantenimiento y mejora de los criterios de validación

Para supervisar la repetibilidad y precisión de un ensayo, los laboratorios deberán participar en pruebas de anillo, cada 6 meses. En caso que ello no sea factible, deberá realizar al menos dos pruebas interlaboratorios al año.

En el caso de agentes presentes en el país, adicionalmente deberá considerarse en esta etapa la secuenciación de al menos 20 muestras positivas cada 6 meses, de los segmentos conservados utilizados para el diagnóstico del agente objetivo, con el fin de detectar posibles variaciones geonómicas que puedan causar fallas de la técnica o modificación de sus características. La frecuencia y cantidad de muestras para la genotipificación, podrá variar según lo establezcan los programas sanitarios específicos para cada enfermedad.

## **4.1. Precauciones y controles**

### **4.1.1. Precauciones para evitar resultados falsos positivos**

Los resultados falsos positivos pueden deberse a restos de productos de muestras positivas o a contaminación cruzada por productos de la PCR de ensayos anteriores. Para evitar este tipo de errores se deben aplicar las buenas practicas de laboratorio en todas las etapas de desarrollo del ensayo.

Se debe tomar en cuenta una serie de procedimientos de prevención. Las muestras y mezclas deben manejarse en campanas de bioseguridad con luz UV utilizada frecuentemente. Los materiales debe ser propios de cada sección relacionada con el ensayo, incluyendo micropipetas, puntas, soportes para tubos exclusivos, abridores de tubos, etc.

El laboratorio debe contar con áreas separadas para la extracción (zona sucia), preparación y distribución de mix o mezcla de PCR (zona limpia), carga del material extraído (zona sucia), equipos (zona sucia).

El número y tipo de controles a incorporar en el proceso de análisis deberá ajustarse a lo indicado en la Norma Técnica LABD/NT2.

### **4.1.2 Controles Internos (miméticos) para evitar falsos negativos**

Los resultados falsos negativos se atribuyen mayormente a efectos inhibidores o errores en el procedimiento de análisis que determinan fallas en la obtención o pérdida del material genético del agente objetivo.

En los casos que la metodología de análisis lo establezca, se deberán emplear controles internos mediante la detección de un fragmento seleccionado del genoma del hospedador. En el caso de diagnosticarse mediante la presencia de ARN, el control debe corresponder a ARN mensajero del hospedador, preferiblemente transcrito de un gen de mantención (House keeping gene).

En el caso del diagnóstico de ISA, IPN y Alphavirus en la especie *Salmo salar* el fragmento corresponde a EF1 $\alpha$ . Previo al inicio de los ensayos con EF1 $\alpha$ , cada laboratorio debe establecer los rangos de CT en que considera positiva la amplificación del mismo. Esto debe realizarse mediante la construcción de una curva de concentraciones de ARN, que permitan estimar si es que existe, el CTs equivalente al

arrojado en muestras en donde el agente no está presente (matriz de RNA de tejido). Se considerará que muestras iguales o inferiores a este CT no contienen suficiente ARN para realizar el ensayo de diagnóstico.

## **V. PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DE ENSAYOS DE RT-PCR ESPECÍFICO PARA VIRUS ISA VARIANTE HPR0**

Para realizar la validación de la técnica de PCR específica para la detección de la variante HPR0 de virus ISA, deberán realizarse los procedimientos indicados en los puntos IIV. 2, 3 y 4 precedentes, incorporando las modificaciones que se indican a continuación:

### **1. Desarrollo y Estandarización del Ensayo**

#### **1.1 Selección de las concentraciones óptimas de los reactivos, los parámetros de los protocolos y el equipo**

Las muestras que se utilizarán en la evaluación de cada condición se obtendrán mediante la realización de una curva de calibrado de diluciones en base 10 de una muestra positiva. A partir de esta curva se seleccionarán 6 diluciones, las que deben corresponder a las 4 últimas diluciones con señal detectable y las dos diluciones siguientes. Adicionalmente se utilizarán 3 muestras negativas al agente, para tener un total de 9 muestras por condición.

Se deben registrar y comparar los resultados obtenidos para cada ítem por separado, para así definir los más idóneos para su uso en el diagnóstico.

Una vez definidos todos los ítems con los que se trabajará se debe establecer y llevar a cabo el proceso de optimización del ensayo, el cual puede realizarse con las mismas muestras (6 positivas y 3 negativas).

Los procedimientos de toma de muestra, transporte y preparación, deben ser realizados conforme los procedimientos técnicos establecidos en la Norma Técnica de Muestreo para Diagnóstico de Enfermedades de Animales Acuáticos (LABD/NT1) de este Servicio.

## **1.2 Repetibilidad Analítica, Estimaciones Preliminares**

Para llevar a cabo esta etapa deben tomarse 3 diluciones de una muestra de referencia positiva a la variante HPR0 previamente secuenciado, una con un bajo valor de Ct (20 a 25 aprox.), una con valor medio de Ct (26 a 30 aprox.) y una con alto valor de Ct (32 a 35 aprox.) y adicionalmente se incluirán dos muestras negativas. Estas 5 muestras deberán dividirse en 5 alícuotas cada una.

Cada alícuota debe analizarse en triplicado en 5 días o ciclos diferentes por el mismo operario. Se deberá repetir la prueba para cada operario que realice los análisis. Deben registrarse y compararse los resultados obtenidos. Se debe calcular la repetibilidad analítica de la técnica.

## **1.3 Sensibilidad y especificidad analítica**

### **1.3.1 Sensibilidad Analítica (límite de detección)**

En esta etapa se determina el límite de detección del ensayo o la concentración más baja en la cual se obtiene un resultado positivo con un alto grado de confianza.

Se tomará la penúltima dilución detectable como positiva de la curva de calibrado realizada en el punto 1.1 y se deberán hacer 4 diluciones seriadas en base 5 a partir de esta muestra. Cada dilución deberá ser analizada en quintuplicado. Lo anterior se deberá realizar en paralelo para la detección del segmento 8 según Snow et al, 2006 y para la detección específica de la variante HPR0 del ISAv. Los resultados deberán registrarse y sobre la base de estos, se calcula el valor de Ct más alto en el que es posible detectar con un alto grado de certeza las muestras positivas.

### **1.3.2 Especificidad Analítica**

Se define como la capacidad de un ensayo para distinguir entre la variante HPR0 del virus ISA, otras variantes del mismo virus y otros agentes.

El objetivo de este paso es determinar las posibles reacciones cruzadas que podría presentar la técnica con otras variantes del mismo virus u otros agentes diferentes al agente objetivo.

Para determinar la especificidad del método, se deberá analizar en duplicado un mínimo de 2 muestras con los principales agentes patógenos de salmones, en particular aquellos estrechamente relacionados con el agente objetivo. Además se deberán incorporar dos muestras de una o más muestras de RNA positivas a virus ISA pero de HPR diferentes al 0.

Para realizar la comparación con otras variantes de virus ISA se deberá solicitar al Laboratorio de Referencia de ISA 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 HPR, en distintas concentraciones. Los resultados de deberán ser registrados, analizados e incluidos en el informe de validación para la obtención de la especificidad analítica.

## **VI. BIBLIOGRAFÍA**

1. Manual de Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Quinta Edición, 2006.