

## GUIA PARA LA EVALUACIÓN DE MÉTODOS CUALITATIVOS DE AMPLIFICACIÓN Y DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR

C. Zini, M. Núñez Fernandez

Centro de Química Aplicada (CEQUIMAP). Medina Allende y Haya de la Torre. Facultad de Ciencias Químicas. Ciudad Universitaria. 5000. Córdoba. Argentina. E-mails: [czini@fcq.unc.edu.ar](mailto:czini@fcq.unc.edu.ar), [mnunez@fcq.unc.edu.ar](mailto:mnunez@fcq.unc.edu.ar).

### ÁREA TEMÁTICA. (Marque una opción) REQUISITOS TÉCNICOS

**RESUMEN.** La evaluación de métodos es el proceso por el cual se evalúa el desempeño de una metodología; en el cual las magnitudes de los errores analíticos son determinadas experimentalmente, y en función de ello se determina la aceptabilidad para la aplicación del método. Comprende tanto actividades de validación como de verificación.

Para realizar la evaluación de métodos se debe establecer una guía de las actividades a desarrollar considerando el proceso completo. El cumplimiento de las mismas y el aporte de evidencia objetiva permiten demostrar la aptitud de la técnica así como la competencia del laboratorio para llevarla a cabo.

El presente trabajo es una guía que detalla las actividades involucradas en la evaluación de métodos cualitativos de amplificación y detección de ácidos nucleicos para diagnóstico molecular, considerando el proceso en su totalidad, desde la extracción de los ácidos nucleicos hasta la detección de los productos amplificados.

**Palabras clave.** Diagnóstico molecular, métodos moleculares cualitativos, validación, verificación.

### 1.- Introducción

La Evaluación de Métodos permite evaluar el proceso completo de una metodología y demostrar tanto la aptitud de la técnica como la competencia del laboratorio para llevarla a cabo. La misma comprende actividades de validación y verificación.

La validación de un método analítico es un proceso que se realiza por única vez a menos que las condiciones en las que el método fue desarrollado cambien, en cuyo caso es necesaria una revalidación. Ejemplos de situaciones que requieren una nueva validación son la incorporación de un nuevo tipo de muestras o cambios en un componente crítico o reactivo que pueda afectar el ensayo.

Para realizar la validación método analítico se debe:

- ✓ Establecer las condiciones por cumplir. El responsable del análisis debe hacerlo de manera confiable y científica, basándose en las necesidades del usuario y/o en alguna instancia oficial en caso de existir.
- ✓ Especificar los parámetros a considerar.
- ✓ Definir el tipo de muestra a utilizar.
- ✓ Aplicar el método a validar en las condiciones

establecidas.

- ✓ Obtener los valores de los parámetros considerados.
- ✓ Evaluar los resultados de la validación por comparación de los parámetros estadísticos obtenidos con las condiciones establecidas previamente.
- ✓ Declarar la validez del método para el propósito establecido.

Una vez que el método ha sido validado, con el objeto de demostrar su correcto desempeño en el tiempo, se lo verifica. El proceso de verificación es un proceso continuo y algunos de los procedimientos que nos permiten llevarlo a cabo son:

- ✓ Ensayos de aptitud / comparaciones interlaboratorios (internos o externos)
- ✓ Controles de calidad
- ✓ Calibración y mantenimiento del equipamiento
- ✓ Evaluación de la competencia del personal

Cada vez que se realiza la evaluación del método, cada una de las actividades realizadas debe estar documentada, de no ser así no tiene validez.

El presente trabajo tiene como objetivo establecer una guía de actividades para realizar la evaluación de métodos cualitativos de amplificación y detección de ácidos nucleicos para diagnóstico molecular, donde cada uno de los ensayos se realiza según lo establecido en sus respectivos protocolos considerando el proceso en su totalidad.

### 2.- Definiciones

Analito: característica a medir o detectar en la muestra analizada

Coefficiente de Variación: es la relación entre la desviación estándar de una muestra y su media. Es una medida de dispersión que suele expresarse como un porcentaje.

Especificidad: es la capacidad de un método para evaluar de manera inequívoca un analito en presencia de interferencias.

Falso negativo (FN): resultado negativo obtenido al analizar una muestra que contiene el analito a determinar.

Falso positivo (FP): resultado positivo obtenido al

analizar una muestra que no contiene el analito a determinar.

Límite de detección: es la menor cantidad de analito que puede ser detectada en una muestra, pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto.

Material control: dispositivo, solución, o preparado liofilizado utilizado en el proceso de control de calidad.

Material de referencia: material, suficientemente homogéneo y estable con respecto a una o más propiedades especificadas, para el cual ha sido establecida su aptitud para un uso determinado en un proceso de medición.

Robustez: capacidad del método de no ser afectado por variaciones pequeñas, pero deliberadas, en los parámetros del mismo. Provee una indicación de su confiabilidad en las condiciones normales de uso. Se pueden aplicar tests estadísticos para evaluar los resultados obtenidos al variar ciertos parámetros y poder determinar si el método mantiene su desempeño.

Validación: confirmación, mediante el examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto.

Verdadero negativo (VN): resultado negativo obtenido al analizar una muestra que no contiene el analito a determinar.

Verdadero positivo (VP): resultado positivo obtenido al analizar una muestra que contiene el analito a determinar.

Verificación: confirmación mediante el aporte de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos especificados.

### 3.- Desarrollo

#### 3.1.- Equipos

Los equipos utilizados en la evaluación métodos deben cumplir con los requerimientos de calidad establecidos en sus respectivos instructivos. Algunos de estos requerimientos son: vigencia de las verificaciones del equipamiento, tareas de mantenimiento y limpieza, controles diarios de temperatura. Las evidencias que confirman el cumplimiento de dichos requerimientos deben encontrarse en el legajo de cada equipo.

#### 3.2.- Reactivos

El listado de todos los reactivos e insumos utilizados en los ensayos realizados para la evaluación del método se encuentra en los protocolos correspondientes. La gestión de reactivos e insumos que se lleva a cabo en el laboratorio implica asentar en los registros correspondientes los datos del producto, su verificación, modo de preparación y fraccionamiento. La evidencia de esta gestión debe estar disponible.

#### 3.3.- Items a ensayar

Para realizar los ensayos de validación se pueden utilizar:

- Estándares o materiales de referencia de concentraciones conocidas del analito a determinar.
- Materiales de control.
- Sobrenadante de cultivo celular conteniendo el analito de interés.
- Transcritos o plásmidos cuantificados mediante métodos apropiados.
- Muestras negativas contaminadas con el analito de interés.
- Muestras de pacientes analizadas por otro método.
- Muestras provenientes de ensayos de aptitud / comparaciones interlaboratorios.

#### 3.4.- Parámetros de Validación

Para MÉTODOS CUALITATIVOS los parámetros a determinar son: *Especificidad*, *Robustez* y *Límite de detección*

##### 3.4.1.- Especificidad

La especificidad de este tipo de métodos está determinada por los siguientes factores:

- Diseño de los oligonucleótidos y sondas que reconocen específicamente al gen seleccionado para su detección.
- Rigurosidad de las condiciones en las que se lleva a cabo la reacción de amplificación y detección de los productos de la misma.

Existen varias formas de evaluar la especificidad de un método:

La Especificidad Analítica Teórica del método, se obtiene comparando las secuencias de los oligonucleótidos y sondas diseñados con secuencias publicadas en bancos de datos (por ej: GenBank) buscando una posible reacción cruzada.

La Especificidad Analítica Experimental se determina analizando muestras negativas contaminadas con una serie de sustancias de características similares o no al analito de interés, para observar si existe reacción cruzada o algún tipo de interferencia.

Además, en el caso particular de que el analito en estudio sea algún tipo de microorganismo, la capacidad del procedimiento analítico para detectar todos los genotipos del mismo se demuestra utilizando paneles de referencia.

La Especificidad Diagnóstica del método se define como la proporción de sujetos que no poseen un trastorno clínico determinado, cuyos resultados son negativos o dentro del límite de decisión. Se la calcula empleando la siguiente fórmula:

$$E = 100 \times NV / (FP + NV)$$

Referencias: NV = negativo verdadero;  
FP = falso positivo

### 3.4.2.- Robustez

La robustez de este tipo de metodología puede ser demostrada durante su desarrollo, introduciendo pequeñas variaciones en las concentraciones de los reactivos o en las distintas etapas del método, como por ejemplo: distintas columnas de purificación de ácidos nucleicos, distintas temperaturas de hibridación de los oligonucleótidos, diferentes volúmenes de carga de muestra, etc. Utilizando los valores obtenidos para cada variable, se realiza el análisis estadístico correspondiente y se determina si la medición ha sido afectada o no.

El parámetro elegido para realizar las comparaciones es el coeficiente de variación (CV) que se calcula empleando la siguiente fórmula:

$$CV = S / X$$

Referencias: S= desviación estándar  
X = media

Otra manera de evaluar la robustez es analizando un número determinado de muestras negativas contaminadas con el/los analitos de interés en una concentración final superior al límite de detección determinado previamente. El análisis de dichas muestras debe dar un resultado positivo.

### 3.4.3.- Límite de detección

Para este tipo metodología se define como la menor concentración de ácido nucleico que puede ser detectada en un 95% de las determinaciones. Para establecerlo utilizamos un estándar o material de referencia. Si éste no estuviera disponible se utilizarán muestras reales confirmadas serológicamente y valoradas. También es posible utilizar muestras procedentes de un ensayo de aptitud/comparaciones interlaboratorios tomando como valor de referencia el valor indicado por el ente organizador.

En la determinación del límite de detección los experimentos se deben realizar en varios días a fin de que las desviaciones estándar reflejen la eficacia de la prueba en un rango de condiciones típicas del laboratorio, pero sin un cambio en el lote de los reactivos.

Se realiza en primer lugar una serie preliminar de diluciones del material conteniendo una concentración conocida del analito a determinar que nos permite acercarnos al valor límite. La menor dilución detectada se analiza en varios días y con una cantidad suficiente de repeticiones que permita asegurar la confiabilidad del método. La dilución elegida como límite de detección deberá ser detectada al menos el 95% de las veces.

## 3.5.- Evaluación de los resultados obtenidos

Una vez obtenidos los valores de los parámetros considerados en la validación deben compararse con las condiciones establecidas previamente. En el caso de cumplir con dichos requerimientos se declara la validez del método para el propósito determinado y puede implementarse en el laboratorio.

Para que este proceso tenga validez todas las actividades realizadas deben quedar registradas en un “Informe de Validación”, el cual debe estar firmado por el director técnico del laboratorio.

### 3.6.- Revalidación del Método

Una nueva validación es necesaria si el método actual se modifica para satisfacer necesidades especiales, tales como la adición de un nuevo tipo de muestra, o si se realizan cambios de cualquier tipo que puedan afectar el ensayo. Frente a situaciones de este tipo se deben completar algunas actividades de revalidación y de esta manera se asegura que el ensayo aún mantiene las características de desempeño establecidas por el laboratorio.

### 3.7.- Verificación del Método

Una vez que el método ha sido validado, con el objeto de demostrar su correcto desempeño en el tiempo, se lo verifica. Para llevar a cabo la verificación o seguimiento del desempeño del método analítico es importante diseñar e implementar un plan de control y aseguramiento de la calidad, que incluya controles que permitan monitorear todos los componentes del proceso analítico que puedan afectar los resultados. Lo ideal es que los controles estén en la misma matriz y sean tratados de la misma manera, desde la preparación de la muestra hasta la obtención de los resultados, que las muestras a analizar. El número y la frecuencia de los controles es definido por el fabricante o lo establece el laboratorio.

En los análisis cualitativos por técnicas de amplificación de ácidos nucleicos en cada corrida se debe incluir:

- Un control positivo para cada analito, cuya concentración sea cercana al límite de detección.
- Un control negativo
- Un blanco
- Un control interno

Otro tipo de controles/ acciones que el laboratorio puede incluir en el plan de control y aseguramiento de la calidad se mencionan a continuación:

- Tener en cuenta la calidad de los reactivos empleados para poder asegurar que se obtienen los resultados esperados y mantener la reproducibilidad del sistema.
- Utilizar cartas de control que permitan identificar rápidamente posibles errores y el origen de los mismos.
- Evaluar la competencia del personal

- Realizar el mantenimiento y calibración del equipamiento
- Participar en ensayos de aptitud externos e internos

El laboratorio deberá registrar los controles y acciones que realice para verificar los métodos

En todos los casos el resultado obtenido en las distintas actividades de verificación se debe confrontar con las condiciones establecidas previamente por el laboratorio. En el caso de exceder los límites se da la solución apropiada al problema, según el conocimiento y la experiencia adquirida.

#### 4.- Bibliografía

- Guía para la Validación de Métodos de Ensayo*. DC-LE-05 V2. OAA.
- *Norma IRAM-ISO 15189 – Laboratorios de análisis clínicos. Requisitos particulares para la calidad y la competencia.*
- Procedimiento General de Evaluación de Métodos* (PG 12.02)
- Procedimiento Operativo: Detección Molecular de Ácidos Nucleicos de los virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH-1), Hepatitis C (VHC) y Hepatitis B (VHB) en muestras de sangre humana* (PO QM. 02).
- Real-time PCR in clinical microbiology: verification, validation, and contamination control*. Sloan, L. M. 2007. Clin. Microbiol. Newsl. 29:87–95.
- Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology ICH Harmonised Tripartite Guideline* [Q2(R1)]
- Validation of Laboratory-Developed Molecular Assays for Infectious Diseases*. Eileen M. Burd. Clin. Microbiol. Rev. Vol. 23 N° 3: 550-576 (2010).
- Validation of Nucleic Acid Amplification Technology (NAT) for the Detection of Hepatitis C Virus (HCV) RNA in Plasma Pools*. [EDQM; PA/PH/OMCL (98) 22, DEF].