

Amunet Laboratorios

GUÍA PARA LA VERIFICACIÓN DE PRUEBAS MOLECULARES RÁPIDAS

Realizado por:

Coloque el nombre de la empresa/organización quien realizará el
proceso

Nombre de la prueba adquirida: _____

Número de catálogo o REF: _____

Fecha de inicio: _____

Fecha de finalización: _____

Nombre y firma de quién dirige/Responsable:

INTRODUCCIÓN

Las pruebas de diagnóstico molecular han revolucionado la forma en la que los laboratorios investigan los genomas del ser humano, virus y bacterias. Esto se les ha permitido inclusive sustituir varias pruebas convencionales en diversas áreas de la medicina¹. El uso de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT por sus siglas en inglés) permiten detectar la presencia de ADN o ARN y a su vez diferenciarlo como ocurre con las infecciones, generalmente los resultados otorgados pueden tardar entre 45-80 minutos o varias horas aunque esto dependerá completamente de la prueba. En la actualidad se dispone de los ensayos moleculares de diagnóstico rápido también conocidas como pruebas rápidas moleculares que se caracterizan por proporcionar un resultado más rápido llegando a ser de 15-30 minutos y funcionando de la misma forma, es decir detectan la presencia de ácido nucleico o ARN².

Estas pruebas están basadas principalmente en técnicas como amplificación mediada por bucle (LAMP), amplificación isotérmica con recombinasa y polimerasa (RPA) o repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas (CRISPR). De hecho, algunas de estas pruebas basadas en dichas técnicas, específicamente en LAMP, han sido aprobadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como por ejemplo para la tuberculosis (TB) y fármaco resistencia a rifampicina (RIF)³ o para la detección de SARS-CoV-2, esta última autorizada por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA)⁴. El uso de pruebas basadas en LAMP representan una serie de ventajas respecto a otras pruebas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), específicamente en uso de equipo simple y más accesible, ya que no requiere termociclador, un tiempo de reacción de hasta una hora como máximo, en determinados casos no es necesaria la extracción de ADN/ARN, puede llegar a ser más sensible además de que no requiere realizar una electroforesis o de un protocolo como sucede con la PCR en tiempo real, todo esto vuelve a las pruebas LAMP una opción funcional y fiable con poca inversión. Si bien, no es perfecta pues existe cierta probabilidad de obtener falsos positivos, sus ventajas siguen siendo mayores que sus contras⁵.

Cuando un laboratorio clínico busca implementar o sustituir por la prueba que utiliza actualmente, esta debe cumplir ciertos requerimientos los cuales permitirán determinar si una prueba es o no funcional para sus intereses.

Aclaración: debido a que los productos adquiridos en Amunet S.A. de C.V. incluyen resultados de una validación es que solo es aplicable la realización de una verificación.

Antes de continuar se explicará cuando es aplicable una validación y cuando una verificación:

- Realizar *validación* cuando el método deseado a implementar o sustituir será utilizado de forma diferente, modificado o ampliado con propósitos para el cual no fue fabricado a pesar de que este pueda tener autorizaciones, certificaciones, cuente con evidencia científica (artículo o revista), validación por el fabricante entre otros. Esto también incluye a aquellos métodos desarrollados o diseñados por el propio laboratorio⁶.
- Realizar *verificación* cuando el método deseado a implementar o sustituir será utilizado conforme lo especificado para el cual cuenta con autorización, certificación, evidencia científica (artículo o revista), validación por el fabricante entre otros⁶.

OBJETIVO DE LA GUÍA

Establecer las directrices para realización de una verificación de los productos adquiridos a Amunet S.A. de C.V., ya que únicamente contempla y solo es aplicable a sus productos.

OBJETIVO PARTICULAR

Verificar el desempeño analítico para el uso de la prueba rápida molecular **TB-DxNet** para su uso en el diagnóstico clínico para la detección del agente *Mycobacterium tuberculosis* en ADN extraído de muestras pulmonares (esputo, lavados, etc).

METODOLOGÍA

El fabricante ya proporciona los resultados de una validación, por lo que se procede a realizar una verificación. Siga cada una de las actividades de acuerdo con lo que se indica en su respectivo parámetro (P):

1. Selectividad

Tiempo estimado de realización: 1-2 horas.

Concepto: También conocida como especificidad, es la habilidad de un método de determinar de forma única y exclusiva el analito de interés aunque no necesariamente debe ser uno solo pues hay métodos que pueden detectar más de un analito aunque su especificidad se vea afectada, esto en función de la presencia de otros componentes bajo condiciones previamente establecidas^{7,8}.

Ejecución: En función a los requerimientos de la prueba es necesario una muestra de ADN extraído negativo, este puede ser libre de ADN de *Mycobacterium tuberculosis*; Otra muestra positiva a *Mycobacterium tuberculosis* en una concentración mayor a 120 copias/mL.

Aclaración: No se detectan todos los agentes perteneciente *Mycobacterium complex*

Número de muestras para el ensayo: Dos; Una positiva (+) y Una negativa (-).

i. Para ello puede hacer cualquiera de las dos opciones:

A) Utilice los controles (+/-) provistos por la prueba TB-DxNet.

B) Purifique la muestra con el kit MagnetiDNA provisto por la prueba.

NOTA: Si cuenta ya con otro kit de purificación aprobado para diagnóstico purifique la muestra según las indicaciones del kit que disponga, pero en último paso es fundamental diluir el ADN en agua grado biología molecular o Tris-HCl 10 mM pH 8 en vez del buffer de elución provisto por el kit de purificación de ADN.

Recomendación: Elija la primera opción (inciso A).

ii. Siga las instrucciones utilizando los respectivos equipos y cantidades señaladas en el instructivo de uso de la prueba TB-DxNet.

iii. Resultados esperados:

Muestra positiva	Muestra negativa
Muestra positiva a ADN de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> con una concentración ≥ 120 copias/mL.	Muestra negativa a ADN de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> o < 120 copias/mL.
RESULTADO POSITIVO	RESULTADO NEGATIVO

iv. Registre el resultado obtenido en la tabla 1 ubicada en la página 4 de este documento.

2. Repetibilidad

Tiempo estimado de realización: Dependiente a elección.

Concepto: Se expresa como la precisión bajo las mismas condiciones de operación realizadas en un intervalo corto de tiempo, a ese parámetro también se le llama como precisión intra-ensayo⁹.

Ejecución: Para la estimación de este parámetro es necesario realizar como mínimo 9 análisis pudiendo emplear muestras de pacientes, muestras control entre otros. La

realización del análisis (prueba) puede ser de forma continua, es decir realizar los 9 análisis a la vez, dividir en secciones o realizarlas durante el transcurso del día (24 horas).

Nota: El operador debe ser el mismo.

Número de muestras para el ensayo: Nueve; Cuatro positivas (+) y Cinco negativas (-).

- i. Elija una de las siguientes opciones de muestras para realizar la actividad:
 - A)** Muestras pulmonares de pacientes positivos/negativos a *Mycobacterium tuberculosis* a las que se le extrajo el ADN siguiendo exactamente las indicaciones del manual (diluir ADN en agua grado biología molecular o Tris-HCl 10 mM pH 8).
 - B)** Controles positivos/negativos a *Mycobacterium tuberculosis* (diluidos en agua grado biología molecular o Tris-HCl 10 mM pH 8).
- ii. Siga las instrucciones utilizando los respectivos equipos y cantidades señaladas en el instructivo de uso de la prueba TB-DxNet.
- iii. Resultados esperados:

Muestras positivas	Muestras negativas
Acorde al fabricante: $\geq 90\%$ de las muestras positivas debe obtenerse un resultado positivo.	Acorde al fabricante: $\geq 90\%$ de las muestras negativas debe obtenerse un resultado negativo.

RESULTADO IGUAL O 11% MENOR A LO DECLARADO POR EL FABRICANTE

- iv. Registre el resultado obtenido en la tabla 1 ubicada en la página 4 de este documento.

3. Reproducibilidad

Tiempo estimado de realización: Dependiente de quien realice y elección.

Concepto: Se expresa como la precisión entre laboratorios, también puede ser por medio de la variación de uno o más factores aplicando una metodología estandarizada⁹.

Ejecución: Para la estimación de este parámetro es necesario realizar como mínimo 9 análisis empleando las mismas muestras del parámetro anterior (repetibilidad). El único factor variable de forma obligatoria será el día y la realización del número de análisis será a elección, por lo que se pueden realizar corridas de 2 en días consecutivos diferentes o 4 y 5 en dos días con una distancia de 3 días, uno del otro, esto por mencionar un ejemplo.

Nota: El operador debe ser el mismo.

Número de muestras para el ensayo: Nueve; Cuatro positivas (+) y Cinco negativas (-).

- i. Utilice las mismas muestras del parámetro anterior.
- ii. Siga las instrucciones utilizando los respectivos equipos y cantidades señaladas en el instructivo de uso de la prueba TB-DxNet.
- iii. Resultados esperados:

Muestras positivas	Muestras negativas
Acorde al fabricante: $\geq 90\%$ de las muestras positivas debe obtenerse un resultado positivo.	Acorde al fabricante: $\geq 90\%$ de las muestras negativas debe obtenerse un resultado negativo.

RESULTADO IGUAL O 11% MENOR A LO DECLARADO POR EL FABRICANTE

iv. Registre el resultado obtenido en la tabla 1 ubicada en la página 4 de este documento.

Tabla 1. Formato para la descarga de los 20 resultados a obtener de la verificación.

P	Análisis	Valor esperado	Valor obtenido	Área: Biología molecular		Observaciones
		Positivo/ Negativo	Positivo/ Negativo	Correlaciona	No correlaciona	
1	1					
	2					
2	3					
	4					
	5					
	6					
	7					
	8					
	9					
	10					
	11					
	12					
3	13					
	14					
	15					
	16					
	17					
	18					
	19					
	20					
Realizó:		Suma % de correlación				TOTAL:

DICTAMEN:

Por el fabricante:	Por el establecimiento
≥ 90% de correlación se considera exitoso	____% de correlación en función de quien dirige/Responsable se considera exitoso

Conclusión: Describa brevemente los resultados obtenidos y si la prueba es o no funcional de acuerdo a sus intereses.

4. Exactitud relativa (Opcional ya que esta más orientado a validación)

ATENCIÓN: La realización de este paso es única y exclusivamente opcional, los resultados obtenidos dependerán de distintas variables.

Tiempo estimado de realización: Dependiente de quien realice y elección.

Concepto: Es el grado de concordancia entre los resultados del método evaluado y los obtenidos utilizando el método de referencia, es decir el que se utiliza actualmente¹⁰.

Ejecución: Para la estimación de este parámetro es necesario realizar al menos 20 muestras y un análisis por cada una. Las muestras deben ser en una proporción 40/60 (8 positivas a *Mycobacterium tuberculosis*; 12 negativas a *Mycobacterium tuberculosis*) si bien se seguirá lo indicado en el instructivo de uso de la prueba, no se emplearán los mismos equipos o la

dilución del ADN. El operador, así como la realización de los análisis serán a elección de quien ejecuta y/o dirige la realización de este parámetro.

ACLARACIÓN: Las muestras que serán utilizadas para este parámetro deberán ser caracterizadas previamente con otro método diferente a los que se utilizarán preferentemente.

Nota: Se recomienda extender el análisis a 50 muestras.

Número de muestras para el ensayo: ≥ 20 ; Ocho positivas (+) y Doce negativas (-).

- i. Utilice la cantidad de muestras indicadas.
- ii. Siga las instrucciones utilizando los equipos elegidos y cantidades señaladas en el instructivo de uso de la prueba TB-DxNet.
- iii. Siga la metodología establecida por el método que actualmente utiliza o haya sido aceptado.
- iv. Resultados esperados de forma **óptima**:

Muestras positivas	Muestras negativas
Acorde al fabricante: $\geq 90\%$ de las muestras positivas debe obtenerse un resultado positivo.	Acorde al fabricante: $\geq 85\%$ de las muestras negativas debe obtenerse un resultado negativo.

Sensibilidad (S) y Especificidad (E) iguales o superiores a los indicados en el instructivo de uso de la prueba TB-DxNet

- v. Registre el resultado obtenido en la tabla 2 ubicada en la página 5 de este documento.

Tabla 2. Formato para la descarga de los ≥ 20 resultados a obtener de la verificación.

Número de muestra	Resultados		Correlaciona	No correlaciona
	TB-DxNet	Método aceptado	+/-	+/-
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				
Suma			TOTAL:	
% de				

correlación		
-------------	--	--

Conclusión: Describa brevemente los resultados obtenidos y determine su funcionalidad con base a los resultados esperados.

Fuentes:

1. CDC. Molecular Methods. Link: <https://www.cdc.gov/labquality/molecular-methods.html>
2. CDC. (2019). Información sobre pruebas moleculares rápidas, RT-PCR y otras pruebas moleculares para el diagnóstico de infección por el virus de la influenza.
3. WHO. (2016). The use of loop-mediated isothermal amplification (TB-LAMP) for the diagnosis of pulmonary tuberculosis: policy guidance. ISBN: 9789241511186
4. FDA. (2021). EMERGENCY USE AUTHORIZATION (EUA) SUMMARY FOR THE COLOR SARS-COV-2 RT-LAMP DIAGNOSTIC ASSAY.
5. Soroka M, Wasowicz B, Rymaszewska A. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): The Better Sibling of PCR? Cells. 2021 Jul 29;10(8):1931. doi: 10.3390/cells10081931. PMID: 34440699; PMCID: PMC8393631.
6. CENAM & EMA. (2017). Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico. p6.
7. FDA. Calidad de métodos analíticos. Capítulo 13.
8. Métodos analíticos adecuados a su propósito. Traducción libre. Centro Nacional de Metrología. (1998).
9. European Medicines Agency. (1995). ICH Topic Q 2 (R1) 'Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology'.
10. Servicio de Acreditación Ecuatoriano. (2018). Guía, Validación de métodos de ensayo en laboratorios clínicos.