

# **P**rocedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades  
Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

**48.**

## **Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos**

**2 0 1 3**

Coordinadora: Concepción Gimeno Cardona

**Autores: María Luisa Camaró Sala  
Vicente Catalá Cuenca  
Concepción Gimeno Cardona  
Rosana Martínez García  
Piedad Olmos Martínez**



ISBN-13: 978-84-616-6564-8

## **ÍNDICE DEL DOCUMENTO CIENTÍFICO**

### **1. Objetivos e importancia de la validación y verificación de métodos microbiológicos**

### **2. Modalidades o tipos de validación**

### **3. Tipos de métodos y grado de validación según el grado de normalización**

3.1. Métodos no normalizados

3.2. Métodos normalizados

3.3. Métodos normalizados con modificaciones en el alcance

3.4. Métodos normalizados sin información

3.5. Tipos de métodos definidos por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC)

### **4. Situaciones y obligaciones en la validación/verificación**

### **5. Particularidades de los métodos microbiológicos. Características de la medición microbiológica**

5.1. Materiales y cepas de referencia

5.1.1. Cepas de referencia de colección

5.1.2. Material de referencia certificado y cepas de estudios interlaboratorio

### **6. Validación/verificación analítica: su importancia en la certeza del diagnóstico clínico**

### **7. Importancia de la validación en la elección del método diagnóstico**

### **8. Validación/verificación de los métodos microbiológicos: etapas en el proceso**

### **9. La validación en el marco de los sistemas de gestión de calidad**

### **10. Parámetros de validación / verificación de un método. Definiciones**

10.1. Límite de detección del método

10.2. Límite de cuantificación

10.3. Selectividad/especificidad

10.4. Eficiencia

10.5. Intervalo de trabajo y rango lineal

10.6. Exactitud

10.7. Precisión

10.8. Incertidumbre de medida

10.9. Sensibilidad diagnóstica

10.10. Especificidad diagnóstica

### **11. Técnicas para la validación**

### **12. Actividades de aseguramiento de la calidad**

12.1. Control de calidad interno

12.1.1. Utilización de controles de calidad en cada serie

12.1.2. Repetición de ensayos

12.1.3. Utilización de gráficos de control

12.2. Control de calidad externo

12.3. Otros aspectos a verificar: control de ambientes y superficies, control de equipos y control de medios de cultivo y cepas

### **13. Validación clínica de resultados**

### **14. Bibliografía**

## **DOCUMENTO TÉCNICO**

### **PNT-VV-01. Validación de métodos moleculares**

# **P**rocedimientos en Microbiología Clínica

**Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y  
Microbiología Clínica**

**Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón**

## **48. VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN ANALÍTICA DE LOS MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS. 2013**

**Coordinadora: Concepción Gimeno Cardona**

**Autores: María Luisa Camaró Sala  
Vicente Catalá Cuenca  
Concepción Gimeno Cardona  
Rosana Martínez García  
Piedad Olmos Martínez**

### 1. OBJETIVOS E IMPORTANCIA DE LA VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

El desarrollo y realización de análisis de control microbiológico es una herramienta que tiene una repercusión decisiva en el ámbito del diagnóstico clínico, de la salud pública, la tecnología alimentaria y el medio ambiente.

Los laboratorios que realizan estos ensayos trabajan en un entorno de creciente exigencia y responsabilidad, tanto legal como social, que reclama un nivel de calidad y de confianza extraordinarios. Por ello, tanto los métodos de ensayo como los laboratorios que realizan los análisis deben asegurar, al máximo nivel permitido por el desarrollo científico y técnico, la fiabilidad de los resultados. Esto implica que, además de reunir los criterios técnicos que aseguren su validez, deben ser realizados con una serie de garantías, que permitan obtener resultados comparables, con independencia del laboratorio que los ejecute. En este sentido, el empleo de métodos de referencia, reconocidos y aceptados, es la herramienta más eficaz para obtener estas garantías.

Sin duda, de poco serviría el actual movimiento en favor de la creación y aplicación de criterios de acreditación para laboratorios de diagnóstico si no existiera paralelamente la seguridad de que las pruebas diagnósticas que se realizan en tales laboratorios están correctamente validadas. Aunque los laboratorios plenamente acreditados puedan generar resultados experimentales de elevada reproducibilidad, dichos resultados podrían llevar a error en cuanto a la presencia o ausencia de infección si el proceso de validación del ensayo no se hubiera realizado de forma adecuada. Por ello, la validación de un ensayo es el esqueleto que sustenta el producto básico de cualquier laboratorio de diagnóstico: la obtención de resultados analíticos y su interpretación.

En la actualidad, existe una amplia disponibilidad de métodos de ensayo (por ejemplo normas de ensayo que tienen reconocimiento internacional como métodos de referencia) que establecen el estándar científico a considerar, llegando incluso, cada vez con más frecuencia, a convertirse en métodos oficiales al ser protocolizados como reglamentación.

Los criterios de acreditación de técnicas deben mantenerse siempre de acuerdo con las tendencias que las comunidades científica y tecnológica establecen como más apropiadas, establecidas en este caso por métodos de referencia y como normas y documentos similares. Por esta razón, se ponen de manifiesto las ventajas que aporta el uso de métodos de referencia normalizados, como vía principal para garantizar la validez de los métodos y la fiabilidad de los resultados, frente a métodos de elaboración propia que requieren de procesos complejos de validación.

En los últimos años las actividades relacionadas con la verificación y validación de métodos analíticos

ha cobrado gran importancia, debido por un lado al continuo desarrollo y actualización de técnicas y equipos analíticos cada vez más complejos, y por otro lado, al interés de los profesionales en garantizar la calidad de sus procesos y resultados.

La *validación* puede definirse como el conjunto de procesos desarrollados para la “*confirmación mediante examen y, la aportación de evidencias objetivas que demuestren el cumplimiento de ciertos requisitos para el uso específico previsto de los procedimientos analíticos*”.

De esta definición se pueden remarcar algunos puntos fundamentales:

1) La validación se aplica exclusivamente a procedimientos. Aunque se ha utilizado esta palabra para equipos, en general se está sustituyendo esta palabra por la de cualificación o calificación.

2) Las palabras fundamentales desde el ámbito de la documentación son:

- Se refiere a un procedimiento de medida.
- Exige que existan unos requisitos preestablecidos y un uso previsto.
- Produce evidencias que deben quedar documentadas.

De la definición dada, queda claramente establecido que el objetivo es confirmar la adecuación del proceso de medida para el uso previsto.

En general, la validación de procedimientos se realiza cuando se pone en marcha una técnica analítica. Su objetivo es garantizar que los métodos cumplen determinados criterios, en términos de precisión, exactitud, etc. El proceso de validación es variable en función de diferentes criterios como, si se trata de un método normalizado o no, el tipo de método, según sea un método cualitativo o cuantitativo.

La validación es un proceso basado en estudios sistemáticos de laboratorio, mediante la cual se pone de manifiesto que un procedimiento analítico determinado posee unas características de funcionamiento adecuadas a la aplicación que se le quiere dar. Por tanto, una validación de un método de análisis incluye dos aspectos fundamentales: por una parte, la evaluación de los parámetros de calidad del método y del proceso, por otra, la adecuación de los mismos a unos requerimientos analíticos concretos determinados de antemano.

En función del método que se emplee, el laboratorio deberá elegir un tipo de validación. Por ello es necesario las modalidades de validación y los diferentes tipos de métodos existentes, según sean normalizados o no.

### 2. MODALIDADES O TIPOS DE VALIDACIÓN

Existen dos modalidades o tipos de validación en función de que se realice sobre un tipo de método u otro. En función del método que se emplee, los requisitos de validación varían. Así, se definen la validación primaria y la secundaria o verificación.

La **validación primaria** es un proceso exploratorio que tiene como meta establecer los límites operacionales y las características de desempeño de

un método nuevo, modificado o caracterizado en forma inadecuada. Debe dar origen a especificaciones numéricas y descriptivas para el desempeño e incluir una descripción detallada y precisa del objeto de interés. La validación primaria va precedida de la elaboración de un esquema de ensayo especialmente diseñado. Corresponde con la validación inicial que deben llevar a cabo los laboratorios y casas comerciales que diseñan un equipo diagnóstico, una prueba nueva o la unión en un solo protocolo de varios métodos normalizados o no. También corresponde con la caracterización que debe realizarse a una técnica que se desarrolla en un laboratorio para su propio uso (*in house*).

La Directiva de la Unión Europea sobre el diagnóstico *in vitro* de Productos Sanitarios (98/79/CE) demanda que existan datos que demuestren que el producto IVD (*In Vitro Diagnosis*) tiene un rendimiento declarado y que éste continuará correctamente después de que se haya enviado, almacenado y puesto en uso en su destino final (Directiva 98/79/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de octubre 1998 en diagnóstico *in vitro* médicos, 1998).

En el caso de que se trate de una técnica que va a ser comercializada, los datos deben ser presentados a los organismos internacionales (FDA: *Food and Drug Administration* en EEUU, marcado CE: Comunidad Europea; IVD, *In Vitro Diagnosis*). Un comité estudia estos datos presentados y si los considera suficientes y adecuados para caracterizar la técnica, los aprueba o no, y procede a su marcado (FDA en EEUU, CE en Europa). En el procedimiento descrito en el documento adjunto (*insert*) de la prueba deben quedar reflejados, tanto la forma de realización de la técnica como los datos de validación, para que puedan ser reproducidos y conocidos por los usuarios de la misma y utilizados como base para la validación secundaria, revalidación o verificación de ese producto en el momento de ser introducido en un laboratorio clínico para ser usado en diagnóstico clínico.

La **validación secundaria, revalidación, validación parcial o verificación** se realiza cuando un laboratorio procede a implementar un método desarrollado en otra parte. Esta validación se centra en la reunión de evidencias acerca de que el laboratorio está capacitado para cumplir las especificaciones establecidas en la validación primaria. Algunos organismos le denominan verificación y es la confirmación, mediante el aporte de pruebas objetivas, de que se cumplen los requisitos establecidos en las condiciones de uso de ese laboratorio. Se trata de la validación que hay que llevar a cabo cuando se introduce un equipo diagnóstico, método o prueba en un laboratorio clínico y que ya está validada primariamente por organizaciones internacionales.

Normalmente la validación secundaria emplea formas seleccionadas y simplificadas de los procedimientos empleados en la validación primaria, aunque posiblemente extendidas por un tiempo mayor. Las muestras naturales constituyen el

material de ensayo óptimo y el trabajo solo requiere tratar el procedimiento dentro de los límites operacionales establecidos por la validación primaria. En EEUU, la FDA y el CLIA 88 (*Clinical Laboratory Improvement Amendments*), considera a este proceso como la verificación y lo define como la “demostración y documentación realizada una sola vez de que las características de una prueba son comparables a las establecidas por el fabricante antes de ser usado en el diagnóstico. Las características incluyen: precisión, exactitud, sensibilidad, especificidad, y rango de resultados, límite de detección y/o cuantificación y cuando sea apropiado, valor predictivo. La validación parcial o verificación también puede denominarse como “*prueba inicial de desempeño*”, “*comprobación del método*”.

### 3. TIPOS DE MÉTODOS Y GRADO DE VALIDACIÓN SEGÚN EL GRADO DE NORMALIZACIÓN

A la hora de definir el alcance de la validación/verificación de un procedimiento analítico, es necesario tener en cuenta dos aspectos:

a. Grado de normalización o estandarización de los procedimientos analíticos. Si los procedimientos de análisis están descritos en normas internacionales, esto implica que han sido desarrollados por grupos o comités de expertos, por lo que se entiende que han estado sujetos a discusión, prueba y validación. Cuanto mayor sea el grado de normalización de un método (es decir, esté escrito por ejemplo en una norma ISO), menor validación será necesario realizar por el laboratorio.

b. Grado de automatización del procedimiento analítico. En este caso, los fabricantes de los equipos realizan las pruebas que permitan asegurar unos estándares de buen funcionamiento de los equipos y calidad de los datos generados por ellos; estas pruebas suelen estar descritas en términos de sensibilidad, especificidad, precisión, etc (por ejemplo, % coeficiente de variación, reproducibilidad interna en control positivo alto/bajo). Cuanto mayor sea el nivel de automatización del procedimiento, menor validación será necesario realizar por el laboratorio, pues menor variabilidad habrá en la realización del proceso.

En el caso de los laboratorios clínicos, los profesionales están muy acostumbrados a tener muy clara la diferenciación entre método comercial con marcado CE, aplicado exactamente como indica el fabricante, con alguna modificación (por ejemplo, cambio del método de extracción de los ácidos nucleicos en el caso de una técnica de PCR o aplicados a muestras que no aparecen validadas en el *insert*) y métodos desarrollados por el propio laboratorio usando reactivos comerciales que sí están bien caracterizados, pero que no está validado el proceso completo para el que el laboratorio clínico lo va a utilizar.

La *Federal Food, Drug and Cosmetic Act* define las pruebas o los tests IVD como “aquellos instrumentos, equipos, aparatos, máquinas, implantes, reactivos *in*

*vitro* o cualquier artículo similar o relacionado caracterizado para su uso específico en el diagnóstico, en el tratamiento o prevención de las enfermedades u otras condiciones en el ser humano. Estos ensayos se consideran como método tipo I. Deben llevar un procedimiento escrito (*insert*) donde queden claramente reflejados el uso específico de la prueba, las muestras para las que está validado, las instrucciones de recogida de dichas muestras, transporte y su preparación para el análisis, recomendaciones de almacenamiento, un resumen y explicación de las pruebas, instrucciones de realización paso a paso, características como la exactitud, precisión, especificidad y sensibilidad, límite de detección, recomendaciones de control de calidad, bibliografía y el nombre y la localización de la firma que lo manufactura, empaqueta y/o del distribuidor.

Es necesario saber que los ASR (*Analytical Specimen Reagents*) no son pruebas diagnósticas. Son componentes fundamentales de pruebas diagnósticas y se definen como "anticuerpos, tanto policlonales y, proteínas monoclonales específicas de receptores, ligandos, ácidos nucleicos, secuencias de ácido y reactivos similares que, a través de determinadas reacciones de unión o reacciones químicas con sustancias en una muestra, se destinan para su uso en una aplicación de diagnóstico para la identificación y la cuantificación de una sustancia química individual o ligando en muestras biológicas". Los ASR se pueden fabricar y vender en cualquier parte del mundo, pero deben estar fabricados de conformidad con las *Buenas Prácticas* actuales para garantizar que se fabrican bajo condiciones controladas que garantizan que los dispositivos cumplir con las especificaciones constantes a través de los lotes y en el tiempo. Es decir, corresponderían a los reactivos que se usan en las pruebas caseras (*in house*), si en estas se usan componentes comprados y no fabricados también *in house*. Es más reproducible la técnica casera si se usan estos reactivos.

Los productos solo en uso para investigación (RUO: *research use only*) se deberían destinar únicamente para fines de investigación, no para fines de diagnóstico. Los productos o equipos RUO se asemejan a menudo a dispositivos IVD, pero ya que el uso previsto es sólo la investigación, no se ajustan a la definición de IVD y no están regulados de igual forma. Los productos RUO se definen por regulaciones de la FDA como "en la fase de investigación del laboratorio de desarrollo y que no están representados como un producto eficaz de diagnóstico *in vitro*". Un producto RUO no tiene las características de validación y eficacia como un producto *in vitro* de diagnóstico, y los fabricantes no conocen aún claramente los resultados de los parámetros de validación primaria ni están sujetos a las mismas condiciones de reclamación ni tienen valores de referencia. Los productos RUO deben ser etiquetados como: "Sólo para uso en investigación. No debe utilizarse en procedimientos diagnósticos". Un producto etiquetado como RUO está a

disposición de los investigadores, quienes pueden evaluar si el producto puede ser potencialmente útil para algunos de diagnósticos especificados en su propósito. Los productos RUO se pueden utilizar en estudios preclínicos o entornos de investigación no clínicos. Los resultados no se pueden informar al paciente en un informe médico o en un expediente médico sin expresa especificación de su condición de RUO y no se deberían utilizar para evaluar la condición del paciente o para cualquier diagnóstico, pronóstico, seguimiento, o con fines terapéuticos.

Además, también en el caso de los laboratorios de diagnóstico clínico, pero fundamentalmente en los de aguas y alimentos, existen procesos tan protocolizados que se denominan "basados en norma ISO o normalizados", como por ejemplo la detección de *Legionella* en aguas. En el caso de los laboratorios clínicos, se puede considerar como método normalizado el aceptado por sociedades científicas o la comunidad científica en general y que ha pasado a ser el de referencia, y métodos alternativos a esos, que por su facilidad de uso, resultados clínicos comparativos mejores que los del método de referencia o por su fácil comercialización, han pasado a usarse incluso más que los considerados de referencia. Así pues, es fácil para esos centros clasificar a los métodos de ensayo en los tipos que se indican a continuación.

### 3.1. MÉTODOS NO NORMALIZADOS

En estos casos se deberá proceder a la validación formal del método (exactitud, precisión -repetibilidad, reproducibilidad-, selectividad y especificidad, intervalo de trabajo o rango, linealidad/ función respuesta, límites de detección y cuantificación, e incertidumbre). Existe una gradación de requerimientos distinta para los que provienen de la literatura científica y los que son procedimientos internos, basada fundamentalmente en la información disponible en uno u otro caso, por lo que el procedimiento de validación/verificación contará con este factor diferenciador.

En cualquier caso la validación debe tener en cuenta los objetivos y uso que se pretende de los resultados de los ensayos.

Según la norma UNE-EN.ISO 17025, el laboratorio podrá utilizar los métodos desarrollados o adoptados, siempre que hayan sido debidamente validados.

### 3.2. MÉTODOS NORMALIZADOS

En este caso, se presupone que el método ha sido elaborado mediante la colaboración de una serie de expertos y que han definido su rango de aplicación, equipos empleados, operatoria utilizada, etc.. Por tanto, ya existen valores de parámetros que permiten tomar una decisión sobre la aptitud del método para el uso previsto.

El método de validación se basa fundamentalmente en verificar la capacidad para cumplir de forma satisfactoria los requisitos establecidos en dichos métodos, tales como reproducibilidad, repetibilidad y exactitud.

### 3.3. MÉTODOS NORMALIZADOS CON MODIFICACIONES EN EL ALCANCE

En este caso, se presupone que el método ha sido elaborado mediante la colaboración de una serie de expertos y que han definido su rango de aplicación, equipos empleados, operatoria utilizada, etc. Por tanto ya existen valores de parámetros pero no estamos seguros que sean iguales a los obtenidos con el método modificado, por lo que es necesaria su revalidación.

### 3.4. MÉTODOS NORMALIZADOS SIN INFORMACIÓN

En este caso, se presupone que el método ha sido elaborado mediante la colaboración de una serie de expertos y que han definido su rango de aplicación, equipos empleados, operatoria utilizada, etc., aunque deja en duda algunos aspectos, como por ejemplo el rango del trabajo, las condiciones de trabajo, etc. Se deberán obtener una serie de parámetros para confirmar el cumplimiento de requisitos.

### 3.5. TIPOS DE MÉTODOS DEFINIDOS POR LA ENTIDAD NACIONAL DE ACREDITACIÓN (ENAC)

Asimismo, es necesario conocer también cual es la definición de tipos de métodos según las directrices definidas por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC), y que atendiendo a los dos aspectos indicados en el párrafo anterior, los clasifica en métodos tipo I, II, III y IV, con exigencias de validación distintas:

**3.5.1. Métodos normalizados (Tipo I):** son métodos desarrollados por un organismo de normalización o por otras organizaciones bien establecidas, cuyos métodos son generalmente aceptados por el sector técnico en cuestión. Estos métodos normalizados son considerados como de referencia ya que pueden ser utilizados para evaluar otros métodos desarrollados para la misma determinación. No requieren una validación completa, pero si la confirmación de su correcta aplicación. Se trata de métodos que el laboratorio aplica como ya está descrito en las normas

**3.5.2. Métodos alternativos al método de referencia (Tipo II):** son métodos que han sido validados por comparación con el método de referencia que corresponda, de acuerdo a un estándar aceptado y que sean reconocidos formalmente como equivalentes al método de referencia por una organización técnica competente e independiente de acuerdo a unos datos experimentales obtenidos por ejemplo en ejercicios de intercomparación. En esta categoría suelen incluirse los métodos desarrollados por los fabricantes de equipos. El laboratorio deberá poseer evidencias de la validación del método. Se tratarán a efectos de validación como los métodos de referencia.

### 3.5.3. Métodos normalizados con modificaciones o basados en métodos de referencia (Tipo III):

Son métodos descritos en procedimientos internos del laboratorio, que están basados claramente en métodos de referencia, y que no suponen una modificación técnica respecto del método de referencia, entendiéndose como “modificación técnica” aquella que ponga en cuestión la validez técnica del método (por ejemplo, cambios relevantes en los controles utilizados, cambios en las condiciones instrumentales, otras muestras, otros medios de cultivo, diferentes tiempos/temperaturas de incubación, equipos con distintas tolerancias a las especificadas, combinación de partes del método normalizado con partes de una referencia bibliográfica, etc.). Estos métodos deben mantenerse actualizados en relación con el método de referencia en que se fundamentan. No precisan de una validación completa, pero si la comprobación de su correcto funcionamiento.

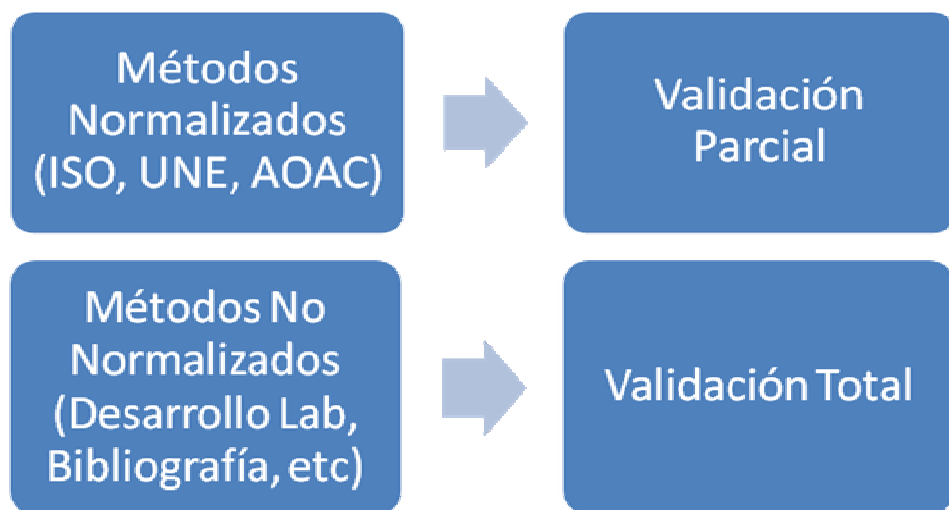
**3.5.4. Otros métodos (Tipo IV):** son aquellos métodos desarrollados por el propio laboratorio o por cualquier otra parte, por ejemplo un fabricante o proveedor, y que no disponen del reconocimiento de los métodos de referencia o alternativos. La validación de estos métodos deberá ser tan amplia como sea necesario para satisfacer las necesidades del tipo de aplicación o del campo de aplicación dados.

Las características de funcionamiento que al menos se deben confirmar en el caso de métodos de referencia, alternativos y basados en métodos de referencia (Tipos I, II y III), son la exactitud y la precisión.

En el caso de los métodos (Tipo IV), la validación deberá completarse estudiando las diferentes variables que pudieran verse afectadas por las modificaciones propuestas de entre los parámetros: especificidad, sensibilidad, exactitud relativa, desviación positiva, desviación negativa, repetibilidad, reproducibilidad, linealidad, incertidumbre y el límite de cuantificación dentro de una variabilidad establecida y, en caso necesario, determinar cuantitativamente estos parámetros. Las diferencias debidas a las matrices (tipos de muestra) deben tenerse en cuenta al analizar diferentes tipos de muestras, y los resultados deben evaluarse utilizando métodos estadísticos apropiados.

En la validación se han de tener en cuenta todos aquellos aspectos que pueden suponer una contribución de error al resultado final del laboratorio, ya sea cualitativo o cuantitativo, incluyendo características como: la manera de trabajar de cada persona, el error de funcionamiento asociado a los equipos, las características específicas de cada método, etc. (ver figura 1).

Los criterios que a continuación se exponen no son de obligado cumplimiento en la validación de los procedimientos analíticos; en función de las características del propio método y la disponibilidad de materiales de referencia se podrá aplicar uno, varios o todos los posibles.



**Figura 1.** Tipos de validación

El objetivo de la validación es diferente según los tipos de métodos microbiológicos, que se pueden clasificar en cualitativos y cuantitativos.

**A. Métodos cualitativos:** son aquellos en los que se pretende detectar la existencia o ausencia de un microorganismo determinado, claramente especificado, en una porción de sustancia (muestra).

**B. Métodos cuantitativos:** son aquellos en los que se desea indicar el número de unidades formadoras de colonia en una cantidad de sustancia, realizando un recuento concreto, cuantificar la concentración de anticuerpos específicos, de ácidos nucleicos (por ejemplo, carga viral, etc.). Su objetivo es detectar un valor numérico de un agente infeccioso en una muestra.

**C. Métodos semi-cuantitativos:** son aquellos en los que se indica el número de microorganismos en una cantidad de muestra determinada, teniendo en cuenta la estadística, como por ejemplo el Método del NMP (Número Más Probable).

**D. Otros métodos:** algunos autores destacan como otros métodos los de identificación, que en realidad son métodos cualitativos donde lo que interesa es la positividad o negatividad de una o varias pruebas. Los métodos de estudio de sensibilidad se pueden considerar como métodos cuantitativos en base a que el resultado es numérico en el caso de la concentración mínima inhibitoria (CMI), aunque como está basado en el crecimiento o no de microorganismos a determinadas concentraciones de antimicrobiano, no se cuantifica el microorganismo si no que se basan en la obtención de crecimiento o no del microorganismo a una determinada concentración de antimicrobiano. Los métodos moleculares basados en la amplificación de secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (PCR-RT) pueden ser cualitativos (detección del ácido nucleico diana) o

cuantitativos (cuantificación de la cantidad de ácido nucleico diana presente en la muestra).

El objetivo de la validación en los diferentes tipos de métodos, se define a continuación.

En los **métodos cualitativos** el objetivo de la validación es asegurar que: a) se detectan las muestras positivas hasta un nivel de positividad bajo; b) no se obtienen falsos positivos que podrían dar lugar a un resultado erróneo. Por ello, los parámetros más adecuados para evaluar son:

1. Límite de detección: es la manera de asegurar que el método es capaz de detectar e identificar la presencia de microorganismos diana, en muestras con poca carga microbiana.
2. Parámetros que tengan que ver con la correcta detección del método: sensibilidad, especificidad, falsos positivos, falsos negativos, eficiencia.

En los **métodos cuantitativos** los parámetros a tener en cuenta serán:

1. Precisión referida a la reproducibilidad.
2. Exactitud definida como recuperación. Este parámetro se considera fundamental para la evaluación del Control Interno de Calidad.
3. Rango: se validará en el rango de trabajo (placa contable).

Respecto a los **métodos semicuantitativos (número mas probable: NMP)**, se trata de métodos en los que el número de microorganismos por cantidad de muestra determinada se obtiene a través de unas tablas estadísticas, cuyo valor está incluido en un intervalo de confianza. En este caso, se mide la exactitud estableciendo la correlación entre los valores obtenidos en la tabla del NMP, con los valores de referencia, asignando un requisito de validación.

En el caso de los **métodos moleculares (PCR-RT)**, si la técnica que se utiliza es de fabricación propia o se modifica claramente un método normalizado o comercializado, el laboratorio realizará una validación que va a consistir, dependiendo de que se



trate de un método cualitativo o cuantitativo, en una verificación de los siguientes parámetros:

- Métodos cualitativos: límite de detección, precisión, exactitud, selectividad/especificidad; falsos positivos/negativos; sensibilidad; eficiencia.
- Métodos cuantitativos: linealidad (según aplique), rango de trabajo; sensibilidad, límite de cuantificación, límite de detección; precisión (repetibilidad, reproducibilidad); exactitud (recuperación); selectividad y especificidad e incertidumbre.

Las validaciones deben ser todo lo extensas que sea necesario para cumplir las necesidades de la aplicación o campo de aplicación dados. El laboratorio debe registrar los resultados obtenidos y el procedimiento utilizado para la validación.

#### 4. SITUACIONES Y OBLIGACIONES EN LA VALIDACIÓN/VERIFICACIÓN

Antes de incorporar una nueva técnica a la rutina del laboratorio, los métodos y procedimientos analíticos seleccionados se deben evaluar y demostrar que aportan resultados satisfactorios antes de comenzar a utilizarlos. Estas situaciones son:

- a) Cuando se incorpora un cambio en una técnica analítica que se encuentra en uso en el laboratorio, como por ejemplo cambio de un equipo para extracción, modificación de los controles utilizados, cambios en las condiciones instrumentales del método (tiempos, temperaturas, etc).
- b) Cuando se desea comparar el desempeño entre diferentes técnicas analíticas.

Cuando se valida un procedimiento analítico es necesario cumplir tres normas básicas:

- a) Debe validarse **todo el procedimiento analítico**; en algunos tipos de procedimientos puede entenderse que únicamente es necesario validar la etapa de medida instrumental (por ejemplo, secuenciación), esto es un error, ya que ésta suele ser la que introduce un error menor. Se ha de tener en consideración que el componente humano es el que incorpora una mayor contribución a la incertidumbre de la medida.
- b) Debe validarse **todo el intervalo de aplicación** del procedimiento analítico (niveles máximo, mínimo y medio del rango de trabajo).
- c) Debe validarse teniendo **en cuenta la variedad de muestras** (por ejemplo, sangre, plasma, orina, etc).

**Tabla 1.** Validación según el tipo de método

Tipo de método	Validación
No normalizado	Si
Normalizado con modificación en su alcance	Si
Normalizado con valores de reproducibilidad, repetibilidad, exactitud	Se debe comprobar que se cumplen los parámetros, pero se puede realizar mediante la evaluación de la calidad de los ensayos
Métodos normalizados sin información	Obtener los parámetros que faltan

Asimismo, debe quedar constancia de los registros del proceso de validación, generalmente en los propios registros de análisis del laboratorio, así como también de las conclusiones de la validación, contrastando si se cumplen los criterios de aceptación/rechazo definidos *a priori*; estas conclusiones pueden registrarse en el *Informe de Validación*.

La extensión y amplitud de la validación dependerá pues del método y de su aplicación. En la tabla 1 se resumen estos aspectos.

#### 5. PARTICULARIDADES DE LOS MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS. CARACTERÍSTICAS DE LA MEDICIÓN MICROBIOLÓGICA

Los métodos microbiológicos se han basado clásicamente y aún se basan esencialmente en la detección y cuantificación de microorganismos según su capacidad de crecer en un medio de cultivo específico y posterior confirmación del aislado mediante ensayos bioquímicos o inmunológicos. El aislamiento en cultivo permite disponer del microorganismo investigado, su identificación, el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos y además facilita la aplicación de marcadores epidemiológicos.

Junto al aislamiento en cultivo, la identificación bacteriana tradicional lleva asociada la confirmación del aislado mediante el estudio macro y microscópico de las colonias obtenidas así como la realización de pruebas bioquímicas, ya sea de un modo independiente o empleando sistemas multipuebas manuales o automatizadas, que permiten incrementar la rapidez y la fiabilidad.

Además, la demostración de la presencia de antígenos y/o de ácidos nucleicos constituye la base del denominado diagnóstico directo.

El proceso analítico microbiológico obliga a tener en cuenta una serie de características propias de los métodos microbiológicos que van a influir en su forma de validación, así como en el resultado final obtenido.

A diferencia de las ciencias físicas y químicas, en Microbiología se trabaja con microorganismos que se multiplican por división binaria y crecen exponencialmente.

Además, el número de colonias observadas es solamente una aproximación del número de partículas vivas, y la viabilidad se define como crecimiento por el propio método, que dependerá del medio de cultivo empleado, tiempo y temperatura de incubación. Hay una falta de referencias comunes internacionales y en consecuencia la tasa de recuperación absoluta no puede ser definida y la trazabilidad es imposible, presentándose los recuentos obtenidos como recuperaciones relativas. Dado que se trabaja con seres vivos, en muchas ocasiones impredecibles, los procesos de estabilización de las muestras para disponer de un valor de referencia o para poder realizar ensayos de reproducibilidad son complicados, siendo difícil, en muchos casos, asegurar completamente la estabilidad. Las características diferenciales se indican a continuación.

1. En ocasiones se trata de taxonomías imprecisas o se realizan agrupaciones de microorganismos sin relación taxonómica. Además debido a la constante evolución en taxonomía, microorganismos clasificados de una forma pueden llegar en un momento dado a pertenecer a un nuevo grupo.

2. La clasificación e identificación de los microorganismos se basa en el comportamiento y en su constitución y para ello se establecen comportamientos de individuos típicos de grupo, por lo que individuos no típicos, que se comporten de una manera diferente o cambios de cualquier tipo que afecten a su comportamiento (células estresadas) puede afectar al resultado final. Los métodos microbiológicos son poco robustos, dado que los análisis son seres vivos en ocasiones con comportamientos impredecibles. Efectos debidos a la muestra, estrés de incubación, calidad de los componentes de los sustratos, la microbiota acompañante y el entrenamiento de los técnicos pueden producir problemas de robustez.

3. Las muestras microbiológicas por su naturaleza pueden sufrir cambios impredecibles que afectan a la microbiota y que inciden en su detección y recuento. Las interacciones de factores bióticos y abióticos con el detector dificultan el aislamiento e identificación del microorganismo. La presencia de otros microorganismos puede modificar los resultados obtenidos debido a competencia por los nutrientes, el enmascaramiento del crecimiento del microorganismo, un comportamiento similar para la prueba efectuada, o la liberación de compuestos que inhiben el crecimiento del microorganismo diana.

4. La falta de uniformidad de las muestras microbiológicas debido a que contienen un número pequeño de microorganismos, supone un problema importante de variabilidad.

5. La variación aleatoria debida a una distribución heterogénea de las partículas entre muestras paralelas, incluso en suspensiones perfectamente mezcladas, es una característica de los métodos microbiológicos. Los recuentos microbiológicos son variables aleatorias discretas que no siguen una distribución normal o Gaussiana. La variación aleatoria básica se puede explicar por la distribución

de Poisson, aunque imperfecciones técnicas y otras muchas causas dan lugar a una variación adicional o sobredispersión que apoya a la distribución binomial negativa como el modelo de sobredispersión en Microbiología.

6. En Microbiología son frecuentes la aparición de problemas inesperados, como contaminaciones, colonias que dificultan el recuento, inhibidores en la muestra, etc. que no son predecibles y que afectan al resultado.

7. Se pueden aplicar diversos caminos para la determinación de un mismo microorganismo dependiendo de que unas pruebas salgan positivas o negativas, lo que supone asegurar un sistema adecuado de registros que permita garantizar que se puede reproducir correctamente el trabajo realizado.

Siguiendo las recomendaciones de la guía de validación G-04 de ENAC, la validación de los métodos de ensayo debe reflejar las condiciones reales de ensayo. Esto puede conseguirse utilizando muestras contaminadas naturalmente o inoculadas con un nivel conocido de microorganismos contaminantes. El microbiólogo debe ser consciente que la inoculación de una matriz (muestra) con microorganismos contaminantes imita tan sólo de una manera superficial la presencia de contaminantes naturales. No obstante, a menudo es la mejor y la única solución disponible.

Por todo es necesario realizar una pequeña revisión de algunos conceptos generales que nos permitan abordar la validación partiendo de una única base común. En particular materiales y cepas de referencia.

#### 5.1. MATERIALES Y CEPAS DE REFERENCIA

En general en el campo de la medida microbiológica no se dispone de patrones como ocurre en el campo físico. Sin embargo, como consecuencia del avance de las necesidades de comparabilidad entre laboratorios ha sido necesario desarrollar herramientas similares. A estas muestras que tienen como objetivo ser una base común y fiable para todos los laboratorios se les ha denominado materiales de referencia.

Se define como **material de referencia** al "material o sustancia de la que uno o más de los valores cuyas propiedades son suficientemente homogéneas y claramente establecidos como para poder ser utilizados en la calibración de un aparato, la valoración de un método de medición o la asignación de valores a materiales". (Guía ISO 30:1992, Términos y definiciones utilizados en relación con los materiales de referencia).

Se defina como **material de referencia certificado** al material de referencia, acompañado de un certificado, en el que uno o más de los valores de sus propiedades han sido certificados mediante un procedimiento que establece su trazabilidad a una realización exacta de la unidad en la que se expresan los valores de dichas propiedades. Cada valor certificado se acompaña de una incertidumbre a un nivel establecido de confianza".

Para obtener los valores de la propiedad se ha empleado un **método de referencia**, que se define como un "método investigado a fondo que describe, con claridad y exactitud, las condiciones y los procedimientos para la medición de los valores de una o más propiedades, cuando se ha demostrado que tiene una exactitud y una precisión adecuadas para la finalidad pretendida y, por consiguiente, puede utilizarse para evaluar la precisión de otros métodos para la misma medición, permitiendo especialmente la caracterización de un material de referencia".

Sin embargo en el campo microbiológico se producen hechos diferenciadores importantes respecto de otros campos:

- a) Pueden producirse mutaciones.
- b) Los métodos no son definitivos y diferentes microorganismos pueden actuar de la misma manera.

Por ello, además, en Microbiología existen otro tipo de materiales que se utilizan tanto para comprobar la validez de los métodos como para controlar los medios de cultivo utilizados en los análisis microbiológicos. Son las denominadas cepas de referencia. Se entiende coloquialmente por **cepa de referencia** "un cultivo procedente de una colección reconocida". Evidentemente esta definición coincide con la existente para material de referencia y por tanto deberían ser consideradas también materiales de referencia. Sin embargo, también se entiende por material de referencia aquellas muestras suministradas por certificadores que tienen un valor conocido y certificado de un número concreto de microorganismos de un determinado tipo, obtenido mediante la aplicación de un determinado método. Este caso incluiría también las cepas que se han usado en ensayos de intercomparación. Por ello es conveniente una clarificación de estos dos tipos de "materiales de referencia".

**5.1.1. Cepas de referencia de colección.** Para demostrar la trazabilidad, el laboratorio debe de utilizar cultivos de referencia de microorganismos obtenidos de una colección nacional o internacional reconocida o de una organización reconocida por un organismo de acreditación.

Teniendo en cuenta que cada aislamiento microbiano de la naturaleza será, con mucha probabilidad, distinto de otro aislamiento de la misma especie, cuando se quiere realizar cualquier trabajo microbiológico en condiciones estándar, reproducible en cualquier momento y lugar, es necesario emplear el mismo aislamiento o cepa. Esta es la razón por la que en taxonomía microbiana se elige la cepa más característica de cada especie, que generalmente suele ser el primer aislamiento de la misma. Esta será la cepa tipo y servirá de referencia a efectos de identificación de otras cepas.

En los laboratorios de Microbiología se debe de utilizar, en función del ensayo de que se trate, una cepa microbiana determinada indicando cuál es. Sin embargo, y a diferencia del resto del material que se va a utilizar en el ensayo, que puede conseguirse, en la mayoría de los casos, con gran facilidad, no ocurre

lo mismo con los cultivos de microorganismos. Actualmente existen diversas colecciones en todo el mundo, la mayoría de las cuales están situadas en Europa. Unas de ellas tienen carácter muy general, guardando tipos muy variados de cepas microbianas (bacterias, mohos, levaduras, virus, etc.). Otras son más especializadas y conservan cultivos de microorganismos más específicos. Las colecciones de cultivos están afiliadas a la *World Federation Culture Collection* (WFCC) que es una organización internacional que se ocupa de su desarrollo. La WFCC posee en Japón el *World Data Center* (WDC) que reúne los datos de las colecciones y edita libros para difundirlos adecuadamente. Desde 1982 existe en Europa la *European Culture Collection Organization* (ECCO) que realiza una labor similar en Europa a la de la WFCC en el mundo. Desde 1989 funciona en Europa el *Information Center for European Culture Collection* (ICECC). Este centro publica libros y folletos con temas de interés para las colecciones de microorganismos y a la cual se puede consultar cualquier aspecto relacionados con los mismos.

En la actualidad existen ya muchas colecciones que editan catálogos proporcionando una gran información en los mismos. La más importante colección en el mundo es la *American Type Culture Collection* en Estados Unidos (ATCC) que mantiene prácticamente la totalidad de cultivos de microorganismos necesarios. En España, la única colección que funciona como servicio a la Microbiología es la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), que fue fundada en el año 1970. Posteriormente, en 1980, pasó a la Universidad de Valencia.

A partir de las cepas de referencia se producen las cepas de reserva y a partir de ésta las de trabajo, y todas ellas se deben tratar como un material de referencia más en el sentido de codificación y registros. El laboratorio debe elaborar un procedimiento interno en el que se describan las etapas de reconstitución de las cepas; el medio a utilizar, la producción de cepas de reserva y de trabajo, las pruebas bioquímicas a aplicar, concretando cuáles y cuándo el modo y tiempo de almacenamiento de todos los tipos de cepas (reserva y trabajo).

Las tres fases de producción de cepas (reconstitución, reserva y trabajo) deben estar codificadas y registradas de manera que haya trazabilidad de las cepas de trabajo a la original. Hay un procedimiento de ENAC en el que se trata ampliamente cómo deben mantenerse y manejarse estas cepas. (Análisis microbiológico: Documento aclaratorio. NT-32 Rev. 3 Abril 2012)

**5.1.2. Material de referencia certificado y cepas de estudios interlaboratorio.** Como ya se ha indicado son aquellos materiales o muestras suministradas por certificadores que se pueden utilizar para la evaluación de la calidad de los ensayos de métodos que exigen la cuantificación. Su importancia reside en que se dispone de un valor cuantitativo determinado que permite compararse

con un conjunto de laboratorios o con los datos dados por un certificador. Permiten detectar errores sistemáticos. Las características propias de un material de referencia son:

- a) Se describe el microorganismo
- b) Se indica un valor más probable
- c) Se indica un intervalo de confianza
- d) Se indican los métodos utilizados para obtener el valor del recuento
- e) Se indica el número de laboratorios participantes
- f) Se indican condiciones para la correcta conservación y reconstitución de las cápsulas o muestras

Las cuestiones a tener en cuenta para la correcta utilización de los materiales de referencia son:

- a) Seguir las instrucciones del fabricante
- b) Los resultados sólo son válidos para el método y el medio descritos, dado que muchos recuentos son dependientes del método o medio empleados, por lo que pueden producirse resultados no satisfactorios cuando se utilice este tipo de material de referencia.
- c) El número de laboratorios que han participado en la certificación, influye en los niveles de confianza del valor del recuento y puede suponer incluso que el valor certificado puede no ser útil para realizar actividades.

## **6. VALIDACIÓN/VERIFICACIÓN ANALÍTICA: SU IMPORTANCIA EN LA CERTEZA DEL DIAGNÓSTICO CLÍNICO**

Los factores que afectan a la concentración y composición del analizable en la muestra dependen también del hospedador, y en este sentido pueden ser bien inherentes a él (por ejemplo: edad, sexo, raza, estado de alimentación, posible embarazo, capacidad de respuesta inmunitaria) o bien adquiridos (por ejemplo: inmunidad adquirida por vía pasiva, inmunidad activa inducida por vacunación o infección). Además, pueden interferir factores independientes del mismo, como la contaminación o el deterioro de la muestra.

Los factores que pueden reducir la exactitud analítica del ensayo son pues muchos. Algunos de ellos pueden ser claramente identificados, como:

- a) la posibilidad de error debido al instrumental utilizado
- b) la formación del personal de laboratorio
- c) la elección y calibrado de reactivos
- d) los tubos o frascos de ensayo
- e) la calidad del agua, el pH y fuerza iónica de las soluciones tampón y diluyentes
- f) la temperatura y duración de las incubaciones
- g) el error derivado de la detección de analizables muy afines, como anticuerpos contra microorganismos con reactividad cruzada, factor reumatoide o anticuerpos heterófilos.
- h) otros

Los factores que influyen sobre la capacidad del resultado del ensayo para revelar con exactitud el estado del hospedador respecto al analizable o la infección en cuestión son, entre otros: la sensibilidad de diagnóstico (SnD), la especificidad de diagnóstico (EspD) y la prevalencia de la enfermedad en la

población estudiada. Sin embargo, esto es difícil de conocer y normalmente en la validación se hace referencia a la sensibilidad y especificidad analítica (SnA y EsA).

En este contexto, los términos «positivo» y «negativo» aluden a los resultados del ensayo, no a la condición del hospedador a la posibilidad de infección o de albergar anticuerpos o antígeno (sensibilidad y especificidad diagnóstica). En todas las referencias a «infección», deberá deducirse la existencia de alguna vía de exposición a un agente infeccioso que un ensayo permite detectar, ya sea directa (por ejemplo, presencia de antígeno) o indirectamente (por ejemplo, presencia de anticuerpos). La SnD y la EspD se calculan a partir de los resultados experimentales que depare la aplicación de un ensayo a muestras procedentes de individuos infectados y no infectados. La medida en que esos individuos de referencia sean representativos de todas las variables ligadas al hospedador o al entorno en la población que el ensayo pretende estudiar (población diana) tiene una influencia decisiva sobre la exactitud con la que luego podrá interpretarse un resultado.

Conseguir que un resultado positivo o negativo permita inferir con exactitud la condición de un individuo respecto a la infección en estudio constituye un objetivo básico del proceso de validación de un ensayo. Esa capacidad no depende únicamente de que el ensayo posea una exactitud y precisión elevadas y de una concienzuda estimación de su SnD y su EspD, sino que depende también en buena medida de la prevalencia de la infección en la población diana. La falta de una estimación actualizada de la prevalencia de la enfermedad en esa población puede comprometer la interpretación de un resultado tanto positivo como negativo. Es conocido que un ensayo validado con muestras de una determinada región o zona geográfica puede no dar resultados válidos cuando se aplica a otras poblaciones con prevalencia diferente de la infección.

Evidentemente, es preciso tener en cuenta muchas variables antes de considerar que un ensayo está «validado». Además, no hay consenso en torno al concepto mismo de validación de un ensayo, concretamente sobre si se trata de un proceso finito en el tiempo (durante el cual sólo se optimizan los factores inherentes al ensayo) o bien de un proceso continuo, lo que entraña una valoración del rendimiento del ensayo durante tanto tiempo como se venga utilizando. De ahí que la expresión «ensayo validado» suscite interpretaciones diversas.

Ante la pregunta: ¿qué es un ensayo “validado”? se puede responder que una prueba diagnóstica se considera validada cuando tiene resultados que revelan la presencia o ausencia de cierta sustancia en una muestra con un margen determinado de confianza estadística. En tal circunstancia, los resultados permitirán inferir el estado sanitario de los individuos respecto a una posible infección.

Un **ensayo validado** proporciona resultados coherentes y repetidos que permiten discriminar

entre positivos y negativos para un analizable (microorganismos, antígenos, toxinas, anticuerpos y ácidos nucleicos; todas estas sustancias se conocen genéricamente con la denominación colectiva de sustancias «analizables o *analytes*») y, por inferencia, debería permitir dictaminar la condición de los individuos respecto a una posible infección con un nivel predeterminado de certidumbre estadística.

La validación de un ensayo consiste en una serie de procesos relacionados entre sí que se enumeran a continuación:

1. Un proceso experimental: partiendo de la experimentación, se optimizan reactivos y protocolos para detectar la sustancia analizable con exactitud y precisión, y garantizar la repetibilidad y reproductibilidad del ensayo.
2. Un proceso relativo: la sensibilidad y especificidad de diagnóstico del ensayo se calculan con respecto a los resultados del ensayo sobre poblaciones de referencia cuyos antecedentes y eventual infección/exposición se conocen.
3. Un proceso condicionado: la clasificación de la población diana como infectados o no infectados viene condicionada por la medida en que la población de referencia usada para validar el ensayo sea representativa de la población a la que se aplicará la prueba (la realización de deducciones exactas sobre la presencia o ausencia de la infección a partir de los resultados de la prueba, así como los valores predictivos de los resultados positivos y negativos, dependen de la prevalencia estimada de la enfermedad/infección en la población diana).
4. Un proceso acumulativo: la confianza en la validez de un ensayo se incrementa con el tiempo, a medida que el uso demuestra la exactitud y la precisión de sus resultados, y confirma así su robustez (también es posible conferir al ensayo niveles crecientes de validez agregándole los resultados de poblaciones de referencia cuya condición sanitaria se conozca).
5. Un proceso continuo: el ensayo es válido únicamente mientras siga proporcionando resultados exactos y precisos, lo que se comprueba utilizando controles internos y externos.

## **7. IMPORTANCIA DE LA VALIDACIÓN EN LA ELECCIÓN DEL MÉTODO DIAGNÓSTICO**

Los pasos a seguir en la validación de pruebas tienen el propósito de responder a una pregunta importante: **“¿está una prueba determinada lista para ser implementada en un laboratorio clínico?”**.

Para responder a esta pregunta, la utilidad clínica de la prueba debe establecer, junto con su rendimiento analítico, sus características y limitaciones. Para comprender estas cuestiones, es necesario definir el uso previsto de la prueba e identificar y cuantificar las posibles fuentes de error, así como fuentes de variación analítica y la variación biológica. Por lo tanto, lo que parece una simple pregunta puede llegar a tener una respuesta bastante compleja.

La norma UNE-EN ISO/IEC 17025 en su apartado 5.4.2 establece que *“El laboratorio debe utilizar*

*métodos de ensayo que satisfagan las necesidades del cliente y sean apropiados para el uso previsto”*. Por tanto, debe tenerse en cuenta el ámbito de aplicación, tanto por el laboratorio en cuanto a la selección de los procedimientos de ensayo y su validación, como por el organismo de acreditación en las evaluaciones que realice.

Además, la norma establece que *“cuando el cliente no especifique el método a utilizar, el laboratorio debe seleccionar los métodos apropiados que hayan sido publicados en normas internacionales, regionales o nacionales, por organizaciones técnicas reconocidas o en libros o revistas científicas especializadas o especificados por el fabricante de equipos”*. Por tanto, en el caso de elegir un procedimiento de ensayo interno, es recomendable que se parta de métodos de referencia que sean ampliamente aceptados, conocidos y aplicados en el sector.

Antes de dar comienzo al proceso de validación es preciso elegir un método que permita detectar en la muestra un componente específico, dotado de especial relevancia para efectuar el diagnóstico. La elección de un método analítico requiere conocer a fondo dicho método, comprender el funcionamiento del agente infeccioso, de la respuesta inmunitaria que frente a él elabora el hospedador y, por último, disponer de estudios previos o mejor, usar métodos que hayan conseguido el marcado CE (Comunidad Europea), IVD (*In Vitro Diagnosis*), de forma que el uso del método en cuestión pueda resultar eficaz y fácil de aplicar en un laboratorio concreto. Para conseguir un ensayo validado es fundamental estudiar cuidadosamente la elección de un método de prueba adecuado.

Como para cualquier método, la calidad en la ejecución de los ensayos microbiológicos es una tarea compleja fruto de múltiples variables que no se pueden considerar de forma aislada y que a su vez suponen un compromiso entre el coste de los ensayos y la fiabilidad de los mismos. Es por ello que tal vez se deba asumir que no existe un método ideal y que indudablemente, los métodos están condicionados por los conocimientos actuales sobre los microorganismos a detectar. Reflexionando sobre las variables que influyen en el rendimiento de una prueba, se hace más fácil intuir los criterios que conviene tener presentes para su validación. Dichas variables pueden agruparse en tres categorías:

- a) La muestra: interacciones entre el hospedador y el microorganismo que influyen en la composición del analizable y su concentración en la muestra.
- b) El sistema de prueba: factores de orden físico, químico, biológico o dependientes del laboratorio que efectúa la prueba, y que pueden incidir sobre la capacidad del ensayo para detectar un analizable específico en la muestra.
- c) El resultado de la prueba: capacidad de un resultado, obtenido por un método de prueba concreto, para revelar con exactitud la condición del hospedador respecto al analizable en cuestión.

En el **anexo 1** se realizan comentarios específicos a la validación/verificación de los medios de cultivo y de métodos serológicos y moleculares.

## 8. VALIDACIÓN/VERIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS: ETAPAS EN EL PROCESO

El proceso de validación/verificación de un método debe estar cuidadosamente planificado, por ello deben contemplarse los siguientes pasos:

a) **Conocer el problema analítico a resolver.** Los procedimientos y el alcance de la validación no son siempre los mismos. Deben ser establecidos de acuerdo a las características del método de ensayo utilizado por el laboratorio y tener en cuenta las necesidades del solicitante de la prueba.

b) **Planificar las acciones a seguir.** Esto implica especificar los requisitos y condiciones a cumplir, determinar los parámetros de desempeño del método, establecer el diseño experimental y el método de análisis de resultados. El diseño experimental y el análisis de resultado tienen que ser estadísticamente válidos. En esta etapa es fundamental definir el alcance de la validación de acuerdo al método a emplear, especificar la muestra en la que se va a aplicar; establecer condiciones tales como temperatura y tiempo de incubación, límites de operación; realizar una clara descripción del/los microorganismos de interés; y establecer otras limitaciones y especificaciones. Si los parámetros de realización no están ya especificados, el laboratorio debe decidir cuáles deben ser caracterizados con el fin de validar el método, lo cual deberá estar fundamentado de manera fiable y científica. Se planificará todo en función del protocolo de validación.

c) **Llevar a cabo la validación y evaluar los resultados obtenidos, por comparación con los parámetros establecidos.** Confirmar la validez del procedimiento utilizado de acuerdo al propósito establecido y, si se han satisfecho los requisitos.

d) **Realizar el informe de validación.**

Así pues, se puede definir que los criterios generales de validación consisten en el proceso de evaluación de las características de un procedimiento de medida y la comprobación de que dichas características cumplen una serie de requisitos preestablecidos.

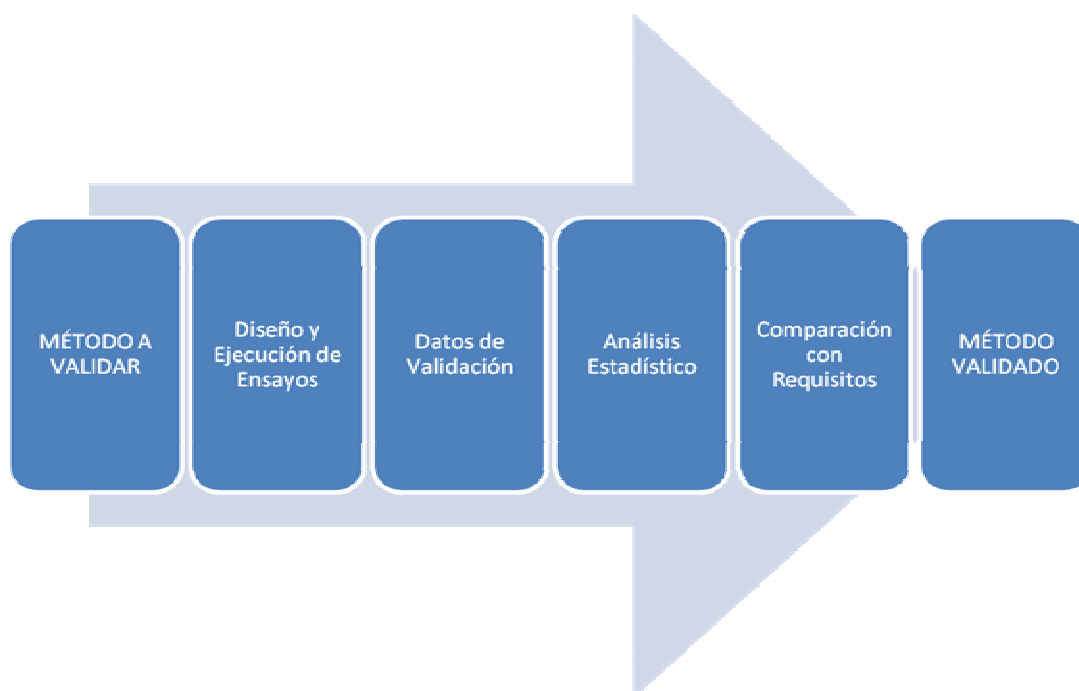
Una validación requiere una serie de actividades o **criterios generales de validación:**

1. Definición de requisitos: será función del tipo de método y definirá rangos para los parámetros.
2. Definición del método.
3. Obtención de muestras o cepas con valor de referencia para poder realizar comparaciones.
4. Aplicación del método a las muestras en las condiciones establecidas.
5. Obtención de valores de los parámetros.
6. Comprobación del cumplimiento de requisitos y declaración de validez del método.

En la **figura 2** se muestran las fases del proceso de validación.

La validación de los procedimientos analíticos requiere disponer de:

a) Un procedimiento analítico desarrollado (elaborado), es decir, el procedimiento que se pretende comprobar con el proceso de validación (por ejemplo, “*Detección de ARN de VHC, VIH-1 (subtipos M y O), VIH-2 y ADN VHB en muestras de Plasma EDTA por PCR*”).



**Figura 2.** Fases del proceso de validación

b) Instrumentos verificados y calibrados, según se requiera en cada caso, con el fin de asegurar que proporcionan medidas precisas y adecuadas al uso del laboratorio.

c) Materiales de referencia, cuando sea posible con certificado de valor o propiedad conocidos.

d) Microbiólogos cualificados. El personal que participa en los procedimientos analíticos a validar debe estar formado y cualificado.

e) Disponer de todos los medios necesarios (equipos, reactivos, etc).

Para realizar la validación, en primer lugar es necesario diseñar el plan de validación, ello puede reflejarse en un "protocolo de validación". La primera evidencia del proceso de validación la proporciona el protocolo. Este documento se corresponde con un plan de trabajo para llevar a cabo la validación. En él se recogen los experimentos que se van a realizar, cuándo se desarrollarán, las personas responsables de llevarlos a cabo, el material que se empleará, etc. El protocolo de validación debe ser específico para cada tipo de muestra y método. El protocolo debe elaborarse previamente a la validación, ya que su finalidad es establecer los objetivos experimentales de la validación.

El **protocolo de validación** debería incluir el siguiente contenido mínimo:

1) Código del protocolo, u otra identificación inequívoca del documento.

2) Responsable. Persona que diseña y aprueba la validación (por ejemplo, jefe de Sección Biología Molecular).

3) Objetivo del protocolo. Detalle del procedimiento y muestras que se pretenden validar (por ejemplo, PNT-01 Procedimiento Normalizado de Trabajo para la Determinación de la Carga Vírica del Virus de la Hepatitis C en Plasma EDTA).

4) Fecha de preparación del protocolo.

5) Alcance de la validación, incluyendo: ensayo, tipo de muestra, rango de trabajo, descripción de equipos empleados. Aquí tiene suma importancia la especificación de la muestra, especialmente cuando pueden causar diferencias significativas en la recuperación de los microorganismos y el rango de aplicación en el caso de los ensayos cuantitativos.

6) Metodología y diseño experimental, que debe incluir: la definición del analito, la naturaleza de las muestras (naturales o inoculadas) utilizadas para la validación, el acondicionamiento y preparación de las mismas, los microorganismos utilizados, la estandarización del inóculo, las condiciones del ensayo, etc.

7) Listado de equipos, instrumentos, materiales, medios de cultivo, reactivos y cepas de referencia.

8) Condiciones ambientales, cuando corresponda.

9) Parámetros a validar. En función de las características del método (cualitativo/cuantitativo, normalizado/no normalizado) deben seleccionarse los parámetros a validar por el laboratorio (por ejemplo, límite de detección, precisión, exactitud, etc). En otro apartado se describen los parámetros

comúnmente descritos en la bibliografía para cada tipo de método.

10) Criterios de aceptación/rechazo. Resultados definidos a priori, que deberá cumplir cada uno de los parámetros de aceptación. Los criterios de aceptación/rechazo podrán estar basados en:

a) Legislación.

b) Normas.

c) Especificaciones proporcionadas por los fabricantes de los equipos (por ejemplo, datos sobre sensibilidad y especificidad de los equipos).

d) Recomendaciones de las sociedades científicas de referencia, nacionales e internacionales.

e) Datos basados en la experiencia e historial de actividades del laboratorio.

f) Otras referencias.

En la definición de los criterios de aceptación/rechazo deberá tenerse en cuenta el rango, ya que es posible que sea necesario definir diferentes criterios para cada nivel (alto, bajo y medio).

11) Plan experimental. Detalle de las actividades concretas a realizar incluyendo: obtención de muestras para la validación (por ejemplo, sueros control), número de repeticiones de ensayos a realizar, personal técnico que intervendrá en la validación, etc.

12) Análisis estadístico.

13) Metodología para el cálculo de la incertidumbre, cuando corresponda.

14) Registros asociados.

15) Fechas previstas/planificadas para la realización de la validación.

El protocolo de validación debe ser revisado y aprobado por el responsable de la validación.

El PNT-VV-01 de este procedimiento nº 48: Validación de métodos moleculares, es un ejemplo de protocolo de validación en microbiología molecular.

## 9. LA VALIDACIÓN EN EL MARCO DE LOS SISTEMAS DE GESTIÓN DE CALIDAD

La aplicación de los conceptos de validación es requisito indispensable en la implantación de sistemas de gestión de calidad. Asimismo, tanto la verificación como la validación, constituyen aspectos diferenciales entre unos sistemas de calidad y otros.

Existe un amplio abanico de sistemas de gestión de calidad entre los que los laboratorios pueden seleccionar el que mejor se adapte a sus características y necesidades. A nivel internacional, estos sistemas vienen reconocidos por normas y organismos internacionales, como ISO (Organización Internacional de Normalización) o CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) en EEUU. Estos organismos tienen por objeto el desarrollo y publicación de normas y guías de consenso. Están formados por comités y grupos de trabajo expertos en las diferentes áreas, que son los encargados de elaborar las normas y guías; por ejemplo en ISO existe el comité técnico ISO/ISO/TC 212 Ensayos clínicos de laboratorio y sistemas de análisis de



diagnóstico *in vitro*, encargado de la elaboración de todas las normas relacionadas con el ámbito sanitario. El CLSI participa en este comité técnico por delegación de la organización ANSI (*American National Standards Institute*).

Adicionalmente, en cada país pueden existir organismos responsables de la elaboración, trasposición y publicación de normas, en España el organismo responsable de estas actividades es AENOR (Asociación Española de Normalización).

Existen diferentes tipos de normas, no obstante pueden clasificarse en dos tipos generales:

1. No certificables/acreditables. Se trata de normas que proporcionan una guía o información acerca de cómo pueden llevarse a cabo diferentes tipos de actividades. Existen normas para todos los ámbitos. A continuación se indican algunos ejemplos: Norma UNE-EN ISO 20776-2:2008. Sistemas de ensayo de laboratorios clínicos y de diagnóstico *in vitro*. Ensayo de sensibilidad de agentes infecciosos y evaluación del funcionamiento de los equipos de estudio de la sensibilidad antimicrobiana y Norma UNE-EN 12332/A1:2001. Productos sanitarios para diagnóstico *in vitro*. Medios de cultivo para microbiología. Criterios para las características funcionales de los medios de cultivo.

2. Certificables/acreditables. Estas normas proporcionan reconocimiento de cumplimiento de los requisitos en ellas descritos. Este reconocimiento es evaluado por entidades independientes, a través de la realización de auditorías. Entre los sistemas mayor aplicación e implantación en los laboratorios cabe destacar los siguientes:

a) ISO 9001. Esta norma se dirige a cualquier tipo de organización, incluyendo los laboratorios microbiológicos. Y tiene por objeto describir los procesos que desarrolla la organización, teniendo en cuenta la satisfacción de sus clientes y usuarios finales. El alcance del sistema es amplio y abierto (por ejemplo: Detección y recuento de *Legionella* spp). En España, las entidades responsables del reconocimiento de este tipo de sistemas son las diferentes organizaciones de certificación que existen en el mercado, como por ejemplo: SGS, Bureau Veritas, AENOR, TÜV, etc.

b) ISO 17025. Esta norma se dirige a laboratorios de ensayo y calibración, y tiene por objeto la descripción de los procesos analíticos de este tipo de laboratorios, así como todos aquellos procesos adicionales necesarios para garantizar el correcto desempeño de los procesos del laboratorio, con la finalidad principal de asegurar la fiabilidad y validez de sus resultados. El responsable de la acreditación según estas normas en España es la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC). En el ámbito sanitario, esta norma está ampliamente implantada para la Detección y recuento de *Legionella* spp – Identificación de *Legionella pneumophilla*.

c) ISO 15189. Esta norma es de aplicación a los laboratorios clínicos y, al igual que en el caso de la norma ISO 17025, tiene por objeto garantizar la validez y fiabilidad de los datos generados por el laboratorio. Es también ENAC la responsable de la acreditación de los laboratorios bajo esta norma.

Tanto la norma ISO 17025, como la norma ISO 15189 tienen un carácter eminentemente técnico, y en ambas normas los requisitos relativos a validación y verificación de los procedimientos analíticos son pilares fundamentales en el desarrollo e implantación de estos sistemas de gestión de la calidad.

Cuando un laboratorio se plantea implantar uno de estos sistemas de gestión de calidad, debe seleccionar el sistema que mejor se ajuste a sus características y necesidades sobre la base de criterios como:

- Objetivos pretendidos
- Requerimientos de su entorno
- Medios disponibles (humanos, económicos, etc)
- Motivación del personal
- Situación del laboratorio con respecto a los requisitos de los sistemas de calidad

## 10. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN/VERIFICACIÓN DE UN MÉTODO. DEFINICIONES

Los parámetros de un método, son las características del mismo, que le hacen apto para un uso previsto. La Guía de Validación ENAC, ya indica una serie de parámetros a tener en cuenta.

Los parámetros de validación de un determinado método deben estudiarse para cada microorganismo diana y para cada muestra.

La selección de las muestras a validar se realizará en función del alcance de acreditación y del uso clínico del método a validar. Para cultivo, se contará, al menos, con 6 muestras analizadas por duplicado en condiciones de reproducibilidad, es decir, introduciendo la mayor cantidad de variables posible en cada laboratorio: diferentes analistas, diferentes lotes de medio de cultivo, estufas (si fuese posible), etc. En todos los casos, se tendrán en cuenta los siguientes puntos:

a) Los cálculos estadísticos se realizarán siempre con los valores transformados logarítmicamente.

b) Los datos seleccionados deben abarcar todo el rango de lectura. En el caso de aislamiento en cultivo será de 10 a 100 ufc para siembra en masa y siembra en superficie en placas de 90 mm de diámetro, salvo que en el procedimiento de ensayo se indique un rango de lectura distinto.

A continuación se proporciona la **definición** y forma de cálculo de cada uno de ellos, así como sistemáticas propuestas para la determinación de cada uno de los valores.

### 10.1. LÍMITE DE DETECCIÓN DEL MÉTODO

Es la menor magnitud que puede examinarse de un analito (por ejemplo, microorganismo, etc), que



puede determinarse con un nivel aceptable de exactitud y precisión. Es la concentración real más baja de analito en una muestra que puede ser detectado consistentemente (por ejemplo, en el 95% de los especímenes probados) con una precisión aceptable, pero no necesariamente cuantificado, en condiciones de laboratorio de rutina y en un tipo de muestra definida. En el caso de los cultivos microbiológicos, es el número mínimo de organismos que pueden ser detectados en una cantidad de muestra con una probabilidad dada, pero en cantidades que no pueden ser claramente cuantificadas. Se establece determinando o una muestra o material de referencia apropiado. Se aplica generalmente a métodos cualitativos.

Su estimación deberá realizarse sobre muestras naturales con carga baja del microorganismo a estudiar o, en su defecto, con muestras inoculadas preferiblemente no esterilizadas para que exista microbiota interferente.

La cepa de referencia del microorganismo diana se inocula en caldo nutritivo y se incuba en agitación durante 18 h hasta el máximo crecimiento de su fase exponencial. Partiendo de esta suspensión bacteriana se realizarán diluciones seriadas (preferentemente a razón 1/2, es decir, 1, 1/2, 1/4, 1/8, etc.) en agua de peptona tamponada, con las que se inocularán alícuotas de la muestra correspondiente. Cada una de estas muestras se ensayará 10 veces por el método a evaluar.

Paralelamente, se efectuará la titulación de los inóculos por triplicado sobre un medio general de referencia, de tal modo que se pueda conocer la concentración total de microorganismos presentes en cada alícuota de la muestra.

Se calculará el límite de detección del método, a la probabilidad estipulada, como el menor número de microorganismos detectados. Por ejemplo, si se establece una probabilidad del 90%, se deberá confirmar a qué concentración del microorganismo, al menos 9 de las 10 muestras analizadas, son positivas (90%). El límite de detección se calculará con el promedio de los recuentos obtenidos con el medio de referencia en aquella dilución en la que se han obtenido con el método a validar un número de resultados de "presencia" mayor o igual a 9.

Con los resultados obtenidos (presencia/ausencia) de la aplicación del método a las muestras, hay que confirmar en qué nivel el número de presencias es superior a la probabilidad determinada (90%). Hay que comprobarlo con el valor de referencia correspondiente a esa dilución y considerar este límite como el límite de detección.

Los resultados obtenidos se evalúan como:

- Correcto" si se supera o iguala la probabilidad establecida.
- Incorrecto" si no se llega a la probabilidad definida para concentraciones de medida superiores al límite de detección propuesto.
- Fuera de límites" cuando no se supera la probabilidad establecida.

Ejemplo:

Valor dilución	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	Total presencias
V1	P/A*	P/A	--	--	--	--	--	--	P/A	P/A	R
V2	P/A	P/A	--	--	--	--	--	--	P/A	P/A	T
V3	P/A	P/A	--	--	--	--	--	--	P/A	P/A	X
V4	P/A	P/A	--	--	--	--	--	--	P/A	P/A	Y
V5	P/A	P/A	--	--	--	--	--	--	P/A	P/A	Z

\*P: presencia; A: ausencia; V: valor; M: muestra

Si Y es igual a 9 (equivalente a una probabilidad de detección del 90%), el límite de detección (LD) sería el valor resultante de la V4.

## 10.2. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Es la concentración mínima de un analito (por ejemplo, microorganismo, etc) que puede determinarse con un nivel aceptable de exactitud y precisión. Se aplica a métodos cuantitativos.

## 10.3. SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD

Grado en que un método puede determinar un analito particular en una muestra, sin ser interferido por otros componentes.

En la evaluación de selectividad y especificidad se consideran los siguientes parámetros:

- **Sensibilidad analítica** (proporción de muestras que contienen el analito investigado y responden positivamente al método). En general, es la fracción total del número de resultados positivos asignados correctamente con el método utilizado. La sensibilidad analítica es una característica inherente de un ensayo y es muy diferente de la sensibilidad diagnóstica o clínica del ensayo.

- **Especificidad analítica** (proporción de muestras que no contienen el microorganismo investigado y responden negativamente al método). Es la fracción total del número de resultados negativos asignados correctamente con el método utilizado. La especificidad analítica se refiere a la capacidad de un ensayo para detectar sólo el objetivo pretendido y que la cuantificación de la diana no se debe ver afectada por reactividad cruzada de otros analitos relacionados o potencialmente interferentes. Los dos aspectos de especificidad analítica son pues la *reactividad cruzada* y la *interferencia*. Ambos se determinan mediante la realización de estudios de interferencia.

#### 10.4. EFICIENCIA

Es la fracción total del número de resultados asignados correctamente con el método utilizado.

A continuación se expone la forma de calcular estos parámetros (10.3 y 10.4) y los falsos positivos y falsos negativos.

Para estos parámetros de validación de métodos cualitativos (**sensibilidad, especificidad, falsos positivos, falsos negativos, eficiencia**) se pretende demostrar la no influencia de microbiota acompañante en el resultado del ensayo por lo que se deberán preparar muestras que contengan el microorganismo objetivo y otros similares al objeto del estudio. Las muestras pueden provenir de:

- Muestras de ensayos de intercomparación en las que se conoce si existían o no microorganismos objeto y qué organismos le acompañaban.
- Muestras obtenidas como mezcla de cepas de reserva de diferentes microorganismos.
- Muestras materiales de referencia con valor conocido de diferentes microorganismos.

Para ello, se elabora una tabla anotando lo que contiene cada muestra, de manera cualitativa (positiva o negativa). Una muestra es positiva (+) si contiene el microorganismo objetivo y negativa (-) si no lo contiene.

Se debe disponer de al menos 20 muestras, siendo aconsejable 30, anotándose también como + o - los resultados obtenidos al aplicar el método a validar en función de haber detectado o no el microorganismo objetivo. Así, comparando lo obtenido con lo preparado se cataloga cada muestra según la tabla adjunta (ver **tabla 2**).

A continuación se describe someramente la forma de realizar estos cálculos:

Después de  $n$  ensayos, los resultados pueden dividirse en cuatro categorías:

- a = nº de presuntivos positivos encontrados como positivos (verdaderos positivos)
- b = nº de presuntivos negativos encontrados como positivos (falsos negativos)
- c = nº de presuntivos positivos encontrados como negativos (falsos positivos)
- d = nº de presuntivos negativos encontrados como negativos (verdaderos negativos)

**Desviación positiva o falso positivo.** Una desviación positiva ocurre cuando un método da un resultado positivo sin confirmación y el método de referencia da un resultado negativo. Esta desviación se convierte en un resultado falso positivo cuando puede demostrarse que el resultado verdadero es negativo.

En el caso de aislamiento en cultivo, se calculará el porcentaje de falsos positivos como el porcentaje de cepas o colonias ensayadas que tienen el aspecto característico de las colonias del microorganismo estudiado en el medio ensayado y que realmente no son el microorganismo estudiado.

$$\text{Falsos positivos} = \frac{c}{a + c}$$

**Desviación negativa o falso negativo.** Una desviación negativa ocurre cuando un método da un resultado negativo sin confirmación y el método de referencia da un resultado positivo. Esta desviación se convierte en un resultado falso negativo cuando puede demostrarse que el resultado verdadero es positivo.

Se calculará el porcentaje de falsos negativos como el porcentaje de cepas o colonias ensayadas que no tienen el aspecto característico de las colonias del microorganismo estudiado en el medio ensayado y que realmente son el microorganismo estudiado.

Se puede definir como un medio específico, cuando más del 90% de los cultivos positivos o colonias presuntivas son verdaderos positivos (es decir menos del 10% de falsos positivos) y cuando menos del 10% de los cultivos o colonias no presuntivas son verdaderos positivos (es decir menos del 10% de falsos negativos). Puede hacerse una interpolación de estos valores a otros métodos, aunque si es un método comercial o normalizado, es preferible la comparación con los datos publicados del método o los especificados en el *insert*.

$$\text{Falsos negativos} = \frac{b}{b + d}$$

**Sensibilidad analítica.** Es la fracción del total de positivos correctamente asignados en los recuentos presuntivos.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{a}{a + b}$$

**Especificidad analítica.** Es la fracción del total de negativos correctamente asignados en los recuentos presuntivos.

$$\text{Especificidad} = \frac{d}{c + d}$$

**Selectividad.** Logaritmo de la fracción de las colonias presuntivamente diana del total de colonias aparecidas.

$$\text{Selectividad} = \log \left[ \frac{(a + c)}{n} \right]$$

**Eficiencia**

$$E = \frac{(a + d)}{n}$$

Donde *n* es el número de muestras analizadas.  
Ejemplo: Muestra 1

Valor previo conocido (+)

Resultado ensayo (-)

Se indicaría como una **b**

Se agrupan y recuentan todas las variaciones que hayan dado y se obtienen así los valores de:

**Sensibilidad:**  $\frac{a}{(a + b)} \bullet 100$

**Especificidad:**  $\frac{d}{(c + d)} \bullet 100$

**Falsos (+):**  $\frac{c}{(a + c)} \bullet 100$

**Falsos (-):**  $\frac{b}{(b + d)} \bullet 100$

**Eficiencia:**  $\frac{(a + d)}{n} \bullet 100$

Con respecto a estos parámetros se aconseja establecer un valor para eficiencia mayor del 90% y para falsos negativos o positivos menor del 10%. Para sensibilidad y especificidad establecer criterios previos. Se aconseja que sean superiores al 90%.

**Tabla 2.** Cálculo de parámetros de validación de métodos cualitativos.

		MÉTODO A VALIDAR		
		Muestras +	Muestras -	
REFERENCIA	+	a	b	<b>a + b</b>
	-	c	d	<b>c + d</b>
		<b>a + c</b>	<b>b + d</b>	<b>N= a+b+c+d</b>

**10.5. INTERVALO DE TRABAJO Y RANGO LINEAL**  
Es el rango de concentración en el que pueden obtenerse una exactitud y precisión adecuada al objetivo del método. Se entiende por rango lineal el rango de valores de la propiedad de ensayo en la que se puede esperar una respuesta lineal del equipo.

Para evaluarlo, se debe proceder al análisis de diferentes concentraciones del mismo microorganismo. Una vez obtenidos todos los resultados de los distintos puntos, se calculará la media y la desviación estándar. A continuación, se calculará el cociente entre la concentración obtenida y la concentración obtenida con el método de referencia. Por último, se representará gráficamente, para cada uno de los compuestos, el valor de la concentración de microorganismos verdadera (*abscisas*) frente al cociente obtenido para cada punto de concentración.

El punto inferior y superior de concentración que se considerará lineal se obtiene interpolando en

abscisas los puntos 0.90 y 1.1 del eje de ordenadas respectivamente. Así mismo, se podrá considerar el rango lineal del método como el rango entre el límite de detección y el último punto de la recta.

El intervalo de trabajo se determinará como máximo como un múltiplo del rango lineal siempre y cuando la incertidumbre que se cometa en la disolución sea inferior a la del método en sí.

**10.6. EXACTITUD**

Es el grado de concordancia entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado. Su estudio implica disponer de un material de referencia frente al que comprobar si existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos por aplicación del método del laboratorio y el valor de referencia.

Su estudio presupone que se puede disponer de un valor de referencia frente al que comprobar si existen diferencias estadísticamente significativas

entre los valores obtenidos por la aplicación del método en estudio y el valor de referencia.

En el caso de microbiología y teniendo en cuenta la dificultad de la obtención del valor de referencia se emplea la exactitud relativa. Se puede expresar en términos de *exactitud* o *recuperación*.

**Exactitud relativa.** Es la concordancia entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado. O incluso el "Grado de correspondencia entre la respuesta obtenida por el método de referencia y la respuesta obtenida por un método alternativo en muestras similares". Pueden utilizarse como comparación los resultados obtenidos de los estudios de intercomparación.

NOTA: El término "exactitud" cuando se aplica en microbiología en ensayos de recuento, es equivalente a la recuperación media.

El resultado final se puede expresar como:

$$\text{Recuperación media} = \frac{\text{Valor medio obtenido}}{\text{Valor de referencia medio}} \times 100$$

## 10.7. PRECISIÓN

Es el grado de concordancia entre los resultados obtenidos al aplicar el procedimiento analítico repetidas veces bajo condiciones establecidas. La precisión depende sólo de la distribución de errores aleatorios y no tiene ninguna relación con el valor verdadero o el valor especificado. Se expresa como coeficiente de variación.

En el caso de que las condiciones establecidas sean mismo operador, laboratorio, aparato, en corto intervalo de tiempo y sobre la misma muestra y la diferencia entre dos resultados de ensayo pueda esperarse dentro de una determinada probabilidad (95%) a este valor se le llama repetibilidad.

**Repetibilidad.** Es la precisión en las condiciones en las que los resultados de una medición se obtienen con el mismo método, con el mismo operador, utilizando el mismo equipo de medida y durante un corto intervalo de tiempo (ejemplo, realización de muestras por duplicados). Grado de concordancia entre los resultados de sucesivas mediciones del mismo mesurando realizadas en las mismas condiciones de medición (en el mismo *run*).

En el caso de que las condiciones establecidas permitan cambiar (operador, laboratorio, aparato, etc.) y la diferencia entre dos resultados de ensayo pueda esperarse dentro de una determinada probabilidad (95%), a este valor se le llama reproducibilidad.

**Reproducibilidad.** Es la precisión en las condiciones en las que los resultados de una medición se obtienen con el mismo método, sobre el mismo mesurando, pero con diferentes operadores, equipos de medida, en diferentes días, etc. Grado de concordancia entre los resultados de sucesivas mediciones del mismo mesurando realizadas en

diferentes condiciones de medición (en diferentes *runs*).

La precisión está relacionada con la varianza de los resultados de nuestro ensayo sobre una muestra homogénea. Es una de las contribuciones de la incertidumbre de ensayo y por tanto es necesario conocerla y que esté por debajo de un nivel fijado a *priori*, dependiendo de la utilización que se vaya a hacer de nuestras medidas.

Se puede expresar de diversos modos:

- S (desviación estándar)
- Sr (desviación estándar de repetibilidad)
- SR (desviación estándar de reproducibilidad)

r = Repetibilidad. Diferencia máxima permitida entre dos resultados de ensayo obtenidos en condiciones de repetibilidad.

R = Reproducibilidad. Diferencia máxima entre dos resultados de ensayo obtenidos en condiciones de reproducibilidad

En general, el más importante es la reproducibilidad intralaboratorio, pues permite asegurar que los resultados obtenidos serán fiables en cualquiera de las posibles situaciones rutinarias en que puede ser realizado en un laboratorio clínico. Existen dos sistemáticas diferentes de cálculo general:

- a) Sistemática clásica de cálculo de exactitud y precisión.
- b) Sistemática basada en las diferencias entre duplicados.

La clave para seleccionar una sistemática u otra depende de si se dispone de muestras con valores de referencia estables y conocidos como para poder realizar repeticiones, en reproducibilidad (en general sólo materiales de referencia), o si estos valores no son estables y por lo tanto se deba trabajar con la técnica de duplicados.

### A) Cálculos cuando existe un valor de referencia estable

En el caso de un valor de referencia estable se procederá como una validación clásica, utilizando valores logarítmicos.

Para ello se realizará, con el valor de referencia estable, una serie de repeticiones ( $n \geq 10$ ) en condiciones de reproducibilidad. Los resultados obtenidos se transformarán en logaritmos.

Se calculará el valor medio ( $\bar{V}$ ) y la desviación estándar ( $S_m$ ), de los logaritmos obtenidos.

#### A.1. Cálculo de la exactitud (recuperación relativa) en el modelo A

Se calcula en Índice de Compatibilidad, con el fin de comprobar si existen o no diferencias significativas entre el valor de referencia y la media de las repeticiones, en reproducibilidad de las muestras.

$$IC = \frac{|VR - \bar{V}|}{\sqrt{\left(\frac{S}{\sqrt{n'}}\right)^2 + \left(\frac{S_m}{\sqrt{n}}\right)^2}}$$

Donde:  $V_R$  = Valor de referencia  
 $\bar{V}$  = Valor medio de las repeticiones

Si es de interlaboratorios, se calcula como  $\frac{S}{\sqrt{n'}}$

$n'$ : el número de laboratorios participantes (mayor de 10)

$S$ : como la media de la desviación estándar de los intervalos dados por la organización (en logaritmos).

$S_m$  = Desviación estándar

$n$  = número de repeticiones (mayor de 10)

Si  $IC \leq 2$ , no existen diferencias significativas.

Si  $IC > 2$  es que existen diferencias significativas.

Se calculará la recuperación relativa como:

$$Rec(\%) = 10^{+(\bar{v}-v_r)} \cdot 100$$

Se comparará con el valor establecido *a priori* para la exactitud solicitada expresada como recuperación (por ejemplo, 90%). El criterio del 90% es válido si el material de referencia tiene un valor asignado aplicando el mismo procedimiento y medio que el método a validar. En el caso de que  $Rec(\%)$  sea inferior al valor establecido e  $IC \leq 2$ , se procederá a repetir el estudio con otra muestra de valor de referencia estable que tenga menor incertidumbre.

#### A.2. Cálculo de la precisión en el modelo A

Se calculará el valor de precisión relativa como RSD RELATIVA:

$$RSD \text{ RELATIVA } (\%) = (1-10^{-Sm}) \cdot 100$$

Nota: En algunos casos a RSD relativa se le denomina Rep (Reproducibilidad %).

El criterio de comparación es suponer que la distribución de microorganismos sigue una distribución de Poisson cuya desviación estándar relativa (RSD POISSON) es:

$$RSD_{POISSON} (\%) = \frac{1}{\sqrt{C}} \cdot 100$$

Donde:  $C$  es la media de los valores obtenidos (para calcularla se realiza el antilogaritmo del valor  $\bar{V}$ ).

Dado que nos debemos permitir un cierto error propio, además del originado por la distribución de Poisson.

El criterio es que:  $RSD \text{ RELATIVA} \leq RSD \text{ POISSON} \cdot 1,2$

#### B) Cálculos con técnicas de duplicados

Se dispone de una serie de valores obtenidos por la aplicación del método en muestras con un valor de referencia conocido, pero no estable, por lo que es diferente para cada muestra y duplicado.

Dichas muestras como ya se ha indicado pueden provenir de:

- Ensayos de intercomparación.
- Valores obtenidos con un método ya validado.
- Muestras procedentes de diluciones de cepas de reserva, cuyo contenido ha sido cuantificado, mediante incubación en condiciones estándar sobre un medio no selectivo, del inóculo que se ha adicionado a las muestras para la aplicación del método a validar.

Se calculan los logaritmos de los resultados obtenidos y se presentan en una tabla.

Se agrupan por niveles entendiéndose como nivel aquellos resultados, cuyo valor transformado en logaritmo, tiene la misma parte entera (Ejemplo, 1.0-2.0; 2.0-3.0; etc.).

Valor Referencia	Valor validación	DIF
Log $X_1$	Log $Y_1$	Log $X_1 - \text{Log } Y_1 = d_1$
Log $X_2$	Log $Y_2$	Log $X_2 - \text{Log } Y_2 = d_2$
Log $X_n$	Log $Y_n$	Log $X_n - \text{Log } Y_n = d_n$

Para cada nivel se calcula:

$\bar{X}$  – Valor de referencia medio

$d$  – Media de las diferencias

$S_d$  – Desviación estándar de las diferencias

$n$  – Número de muestras en el nivel

A partir de estos datos se calcula la exactitud y la precisión como:

#### B.1. Cálculo de la exactitud (recuperación relativa) en el modelo B

Inicialmente se debe comprobar estadísticamente que no existen diferencias significativas entre los valores de referencia y los valores del método. Para comprobar esto, se calcula:

$$t_{\text{calc}} = \frac{\bar{d}}{S_d/\sqrt{n}}$$

Se compara  $t_{calc}$  con  $t_{tab}$  (Student) para  $n-1$  grados de libertad y 95% de nivel de confianza.

Si  $t_{calc} < t_{tab}$  no existen diferencias significativas entre el valor de referencia y el método.

Para determinar la exactitud, calcular la recuperación relativa media (Rec) y verificar si cumple los criterios establecidos:

$$Rec = 10^{-\bar{d}} \cdot 100$$

Los criterios se establecerán en función del tipo de valor duplicado para valores procedentes de ensayos de intercomparación, ó métodos ya validados ( $Rec \geq 90\%$ ).

Para valores procedentes de diluciones de cepas valoradas a partir de medio no selectivo, hay que utilizar la recuperación indicada para el medio del método a validar por el fabricante del mismo.

#### 10.8. INCERTIDUMBRE DE MEDIDA

Es la estimación que caracteriza el intervalo de valores en el que se sitúa, generalmente con una alta probabilidad dada, el valor verdadero de la magnitud medida.

Se puede estimar a través de los resultados obtenidos en la validación.

- **Incetidumbre operacional (O).** Componente de la incertidumbre debida a la sobredispersión.

- **Incetidumbre intrínseca (U).** Debido a la distribución de los microorganismos y está relacionada directamente con el número de colonias crecidas en las placas donde se realiza el recuento.

- **Incetidumbre combinada.** Raíz cuadrada de la suma cuadrática de las incertidumbres asociadas a cada uno de los componentes que influyen en el resultado.

- **Incetidumbre expandida.** Es la incertidumbre combinada multiplicada por un factor de cobertura,  $K=2$ , para conseguir un nivel de confianza del 95%.

#### 10.9. SENSIBILIDAD DIAGNÓSTICA

La sensibilidad diagnóstica sólo es pertinente cuando un ensayo se usa para detectar una condición o enfermedad en una población. La sensibilidad diagnóstica se define como la proporción o porcentaje de los individuos con una patología dada que son identificados por el ensayo como positivo para la condición. Un ensayo con alta sensibilidad analítica no necesariamente tiene aceptable sensibilidad diagnóstica. Un ensayo con sensibilidad analítica perfecta puede dejar de dar un resultado positivo si la sustancia objetivo del análisis no está presente en la muestra procesada debido a mala praxis en la recogida de la muestra o a inadecuación de la misma o el procesamiento de la muestra.

#### 10.10. ESPECIFICIDAD DIAGNÓSTICA

Se refiere al porcentaje de individuos que no presentan una condición dada y están identificados por el ensayo como positivo para la condición. En algunas situaciones, la especificidad de diagnóstico

de un ensayo puede disminuir sin pérdida de especificidad analítica. Las situaciones que contribuyen a la disminución especificidad diagnóstica de las pruebas en enfermedades infecciosas incluyen reacciones de falsos positivos que se producen a causa de la contaminación de la muestra o de la detección de otros microorganismos, sus antígenos, ácidos nucleicos que no son los responsables del cuadro infeccioso.

### 11. TÉCNICAS PARA LA VALIDACIÓN

Para la validación es conveniente utilizar una o varias de las técnicas siguientes para la determinación del desempeño de un método:

1. Contaminación de muestras artificialmente. La validación de métodos microbiológicos debe ser reflejo de las condiciones de ensayo reales. Esto se puede conseguir utilizando muestras contaminadas naturalmente o muestras contaminadas o fortificadas a un determinado nivel. En general, el proceso consiste en la preparación de una muestra agregando el material interferente a una muestra real que contenga el material a ensayar. Una segunda alícuota de la muestra original se diluye con un solvente, y ambas se analizan determinándose la diferencia entre ambas.

2. Uso de materiales de referencia o materiales de referencia certificados. Esta alternativa tiene algunos inconvenientes como el elevado coste económico, la posibilidad y facilidad de encontrar un material de referencia suficientemente representativo de la muestra a validar.

3. Comparación de resultados obtenidos con otros métodos alternativos. Se analizan muestras de pacientes por el método en estudio y otro método de comparación, luego se estima el error sistemático basándose en las diferencias observadas entre ambos métodos. El método de comparación debería ser, en la medida de lo posible, el de referencia (*gold standard*).

4. Comparaciones interlaboratorios (validación por pares de valores). La validación por pares de valores es aplicable cuando no es posible utilizar ninguno de los métodos anteriores, es decir no es posible realizar contaminación artificial de las muestras, no se puede disponer de muestras de valor de referencia estable, o cuando siéndolo no se disponga de cantidad suficiente. Esta sistemática se basa en la utilización de resultados de intercomparaciones en las que haya participado el laboratorio, y utilizar estos datos como valores de referencia.

La participación en intercomparaciones permite una evaluación del sesgo de forma que el laboratorio pueda demostrar que se mantiene dentro de los criterios de aceptación definidos por normas, reglamentos, por el cliente o por el laboratorio.

### 12. ACTIVIDADES DE ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

La validación de pruebas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas no concluye con una serie finita de experimentos basados en unas pocas muestras de referencia. Exige un proceso con una vigilancia y un mantenimiento constantes, y una

reevaluación de sus parámetros de rendimiento sobre cada una de las poblaciones a las que se aplica.

Como parte del sistema de calidad y para verificar los resultados del día a día, el laboratorio debe implementar una serie de actuaciones planificadas y sistemáticas que permitan demostrar de una forma objetiva la validez de los resultados generados y proporcionar su necesaria fiabilidad.

El tipo, la frecuencia y el nivel técnico de dichas actividades dependerán, sobre todo, del tipo de análisis y debe abarcar todas las actividades analíticas, desde el procesamiento de muestras hasta la obtención del resultado final.

El sistema definido, conocido como aseguramiento de la calidad, debe cumplir los cuatro aspectos fundamentales de cualquier actividad técnico-científica, planificación, realización, control de resultados y acciones a tomar. En el plan se contemplarán los parámetros o familia de parámetros a controlar, la actividad de evaluación a desarrollar, la frecuencia de realización y el responsable de control. En dicho plan, deberá incluirse tanto los parámetros como las matrices en las que el laboratorio normalmente trabaja.

El aseguramiento de la calidad incluye actividades internas y externas. Todas las actividades de aseguramiento de la calidad deberán planificarse de forma que, en el tiempo y en función del alcance del método se incluya una adecuada representación de la variedad de muestras con las que trabaja el laboratorio, complementándose así los resultados obtenidos en la validación inicial.

Por último, la periodicidad de las actividades de control de calidad tanto interno como externo deberá establecerse considerando diversos factores como pueden ser:

- La robustez del método utilizado (en función de los controles específicos incluidos en el mismo, método de referencia o de rutina, pruebas de confirmación, datos de validación, vigencia del método etc.).

- La frecuencia con la que el laboratorio ejecuta dichos análisis (dado que se debe asegurar que el laboratorio mantiene la destreza en la ejecución del mismo en cuanto a los materiales, equipos y cualificación del personal).

- Los resultados históricos de aseguramiento de calidad, así como la correcta evaluación de los mismos.

La comprobación periódica del funcionamiento de los métodos tiene por objeto garantizar que los procesos analíticos siguen cumplimiento los criterios y resultados obtenidos en la validación inicial. Estas actividades deben ser programadas por el laboratorio y realizarse con una periodicidad definida y a intervalos planificados.

## 12.1. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Son actividades realizadas para verificar que los procedimientos analíticos siguen cumpliendo los criterios de calidad (por ejemplo, repetición de muestras, contaminación de muestras). Su objetivo

principal es evaluar el funcionamiento de los procedimientos a lo largo del tiempo; asimismo, constituyen una herramienta muy valiosa para la formación y cualificación del personal del laboratorio. El laboratorio debería disponer de un plan de control de calidad que incluya al menos muestras y procedimientos sobre los que se realizarán los controles, periodicidad (por ejemplo, trimestral, mensual, etc), responsable/s de realización, criterios de aceptación/rechazo. Una vez realizados los controles deben registrarse los resultados y la conclusión respecto al cumplimiento/incumplimiento de los criterios.

Los controles internos de calidad son una de las herramientas más frecuentemente empleadas en el laboratorio. Consiste en una comprobación, a lo largo del tiempo, de la ejecución adecuada y correcta de todos los pasos que componen el proceso de análisis, incluyendo el ajuste o calibración del instrumento de medición. En la práctica supone la evaluación continua de los parámetros de validación. Los controles de calidad microbiológicos pueden incluir:

**12.1.1. Utilización de controles de calidad en cada serie.** Puede utilizarse este sistema cuando los ensayos se realizan por series en los que presumiblemente las variaciones de reactivos, personal, equipos, etc. son muy pequeñas y, además, se dispone de material de referencia o material trazable, debe quedar establecido el límite de aceptación bien mediante gráfico o tabla.

**12.1.2. Repetición de ensayos.** Se trata de realizar una repetición del ensayo, con distinto analista, método, etc. o bien una lectura de placas cruzada entre analistas.

**12.1.3. Utilización de gráficos de control.** Uno de los parámetros a verificar en el control de calidad de un método es la exactitud, suma de la veracidad y la precisión, y que habitualmente se comprueba asegurando la trazabilidad de los resultados proporcionados por el método analítico a una referencia, ya sea un material de referencia certificado o un ejercicio de intercomparación. Sin embargo estas actividades no se realizan rutinariamente en el laboratorio y para asegurar sistemáticamente la trazabilidad de los resultados, una de las herramientas más utilizadas son los gráficos de control. Consisten en representaciones gráficas sencillas que, mediante el análisis en el tiempo de una muestra control, permiten evaluar si un proceso analítico está bajo control estadístico, y controlar las tendencias y su estabilidad.

Para la realización de los ensayos correspondientes al plan de evaluación interna de la calidad se deben emplear:

- Muestras naturales, positivas y negativas.
- Muestras positivas y negativas, preparadas a partir de materiales de referencia y materiales de referencia certificados que permite comprobar la exactitud de un proceso analítico, ya que los valores de incertidumbre de sus componentes son conocidos. Dichos materiales deben ser homogéneos, es decir, presentar una composición

regular respecto a una o varias propiedades especificadas, y estables cuando son almacenados en las condiciones definidas, conservando un valor de la propiedad dada dentro de los límites establecidos, por un periodo de tiempo definido. Además, han de presentar similitud con la muestra real y deben ser trazables, propiedad que permitirá establecer el resultado previsible por comparación directa con los patrones apropiados mediante una serie de comparaciones reales.

- Análisis de blancos.

En los ensayos cuantitativos debería realizarse un control de la precisión empleando muestras naturales sin inocular y/o muestras naturales inoculadas, y un control de la recuperación. En el caso de los ensayos cualitativos, el control de calidad interno debe incluir actividades que garanticen un adecuado control del método a niveles de contaminación cercanos al límite de detección. Todas las actividades de control de calidad deben realizarse, siempre que sea posible, con muestras naturales positivas (ya sean inoculadas o contaminadas de modo natural) como negativas.

Debido a la singularidad de los análisis microbiológicos, los controles de calidad deben contemplar también el control de las condiciones de trabajo como la esterilidad, productividad y selectividad de los medios de cultivo, controles ambientales y de superficie, controles de las cepas de referencia de reserva y de trabajo empleadas, y en general de todos aquellos aspectos que afecten a la buena práctica en la realización de los ensayos. Deberán además establecerse los criterios para la desviación permitida.

## 12.2. CONTROL DE CALIDAD EXTERNO

La principal actividad que se puede considerar como evaluación externa de la calidad, es la participación en ejercicios de intercomparación. Consisten en la realización simultánea, por parte de distintos laboratorios, del análisis de una muestra de acuerdo con unas condiciones predeterminadas. Esta herramienta permite evaluar la capacidad del laboratorio de realizar un ensayo concreto, obteniendo información externa e independiente que asegura, en la medida de lo posible, que la validación de su método y su estrategia de control interno de calidad son suficientemente eficaces y por tanto puede asegurar con cierto grado de confianza que no tiene un sesgo en sus resultados de rutina. En el ámbito microbiológico, los ejercicios de intercomparación constituyen uno de los mejores medios de que dispone un laboratorio para comprobar la bondad del diseño, planificación y control de sus actividades, materializadas en los resultados que genera.

El programa y frecuencia de ejercicios en los que se participa deberá ser coherente con el empleo de otras herramientas de control implantadas en el laboratorio para asegurar la adecuación al fin pretendido del método de ensayo.

El laboratorio deberá realizar una evaluación de los posibles proveedores de ejercicios de

intercomparación, de modo que pueda seleccionar el más adecuado a sus necesidades, y como mínimo la información analizada incluirá la planificación de los trabajos, el número de rondas, el rango de trabajo, el número de participantes, los parámetros y matrices a analizar, el transporte de las muestras, las instrucciones, la estadística empleada, el método de evaluación de los participantes y el contenido del informe. En cualquier caso, la norma ISO 17043 establece los criterios de calidad que un proveedor de ejercicios de intercomparación debe cumplir, y la acreditación del proveedor por esa norma es una herramienta muy útil para que el laboratorio pueda seleccionarlo de un modo sencillo.

Aspectos importantes a considerar por un laboratorio cuando participa en un ejercicio de intercomparación son los estudios de homogeneidad y estabilidad que aseguren la calidad de la muestra ensayada, y los estudios estadísticos empleados, que deberán estar basados en estadísticas robustas de modo que se reduzca la influencia de valores extremos. El valor asignado se obtendrá en la mayoría de las ocasiones por consenso entre los participantes, dado la dificultad en microbiología de encontrar material de referencia certificado. También es fundamental la evaluación del rendimiento que hace el proveedor. En este sentido, el sistema más habitualmente empleado es el del *z-score*, donde se relaciona la diferencia entre el resultado obtenido por el laboratorio y el valor asignado considerado como verdadero, con un valor de referencia o diana de incertidumbre y que utiliza el organizador para considerar que los resultados son adecuados.

El proveedor del control externo de calidad deberá establecer una evaluación frente a objetivos de calidad que sea independiente de los resultados obtenidos por los laboratorios participantes, de modo que ésta sea adecuada al fin pretendido para lo cual puede emplear un criterio de precisión, obtenido bien a partir de una legislación, de un modelo matemático de precisión, de un estudio intercolaborativo entre laboratorios expertos, o como ocurre en la mayoría de los ensayos microbiológicos a partir de un histórico de precisión obtenido en circuitos anteriores para dicho parámetro y método.

Entre los múltiples usos que permite la participación en ejercicios de intercomparación, destacan los siguientes:

a) Permite confirmar la correcta validación inicial de un método por medio de la comparación de los resultados de exactitud y precisión con los obtenidos en la validación y permite evaluar si la incertidumbre estimada por el laboratorio es realista.

b) Los datos obtenidos de la participación en ejercicios de intercomparación pueden ser utilizados para la validación de métodos de medida, siempre y cuando los tipos de parámetros y los intervalos de trabajo sean coherentes con el objetivo de la validación.

Esta herramienta de control de calidad representa un examen de la pericia del laboratorio para proporcionar resultados con un nivel apropiado de



calidad. Pero también pueden cubrir otros objetivos como son:

- a) La evaluación del desempeño y su seguimiento continuado para un procedimiento o medida específico.
- b) La identificación de problemas en el laboratorio y adopción de acciones correctivas.
- c) El establecimiento de la eficacia del ensayo.
- d) La identificación de diferencias entre laboratorios.

### 12.3. OTROS ASPECTOS A VERIFICAR: CONTROL DE AMBIENTES Y SUPERFICIES, CONTROL DE EQUIPOS Y CONTROL DE MEDIOS DE CULTIVO Y CEPAS

Otros aspectos que es necesario controlar en el laboratorio, y que pueden tener una influencia sobre el funcionamiento de los procedimientos analíticos son:

- **Control de ambientes y superficies.** Es necesario controlar la posible contaminación por microorganismos de las diferentes áreas analíticas (por ejemplo, bancadas de laboratorio, cabinas de

flujo laminar, etc.), con el fin de evitar que esto pueda afectar a los resultados analíticos.

- **Control de equipos.** Es fundamental que los todos los equipos que resulten críticos para los ensayos dispongan de un plan de actividades de mantenimiento, verificación y calibración; estas actividades están encaminadas a asegurar que los posibles errores detectados en los equipos son subsanados, así como a asegurar que el error asociado a los equipos, es asumible por el laboratorio (por ejemplo, calibración de estufa, termociclador, verificación y calibración de balanzas, etc.).

- **Control de medios de cultivo y cepas, según aplique.** En caso de que se utilicen, y ya sean comerciales o preparados por el laboratorio, deberán realizarse los correspondientes controles de productividad, selectividad, etc., de manera que errores en la preparación o estado de estos materiales no afecten a los procedimientos analíticos. En la **tabla 3** se indican los diferentes aspectos a verificar y su control

**Tabla 3.** Aspectos a verificar y su control

<b>Criterio</b>	<b>Validación/ Verificación</b>	<b>Control</b>
<b>Objeto</b>	Proporcionar garantía de validez de un procedimiento previamente a su puesta en funcionamiento	Control de desempeño de un procedimiento a lo largo del tiempo
<b>Tipos de métodos</b>	Todos	Prácticamente todos
<b>Periodicidad</b>	Antes de la implantación de un método, o ante cambios técnicos en un método ya en uso	Según determine el laboratorio (mensual, trimestral, etc.)
<b>Responsable</b>	Responsable Técnico (por ejemplo, Jefe Sección/Servicio; Facultativo)	Personal Técnico (Responsable de calidad)

### 13. VALIDACIÓN CLÍNICA DE RESULTADOS

Es habitual que el concepto de *validación* se utilice de manera genérica, no diferenciando entre “*validación de resultados*” y “*validación de los procedimientos analíticos*”. La validación de resultados, se refiere a la evaluación y autorización de resultados por parte del facultativo correspondiente, con el fin de emitir el correspondiente informe de resultados al solicitante. La validación de los procedimientos analíticos consiste en la realización de las pruebas necesarias para asegurar que los procedimientos de análisis proporcionan datos válidos, y confiables técnicamente.

La validación de resultados implica la revisión de los resultados obtenidos por el facultativo, con el fin de aceptar o rechazar los resultados analíticos obtenidos, teniendo en consideración además de los datos primarios obtenidos como consecuencia de la

aplicación de las técnicas analíticas, otros aspectos como:

- Datos demográficos de los pacientes (por ejemplo: sexo, edad, raza, etc.)
- Otros resultados analíticos relacionados
- Historial del paciente
- Resultados de los controles de calidad realizados
- En caso de que existan, intervalos de referencia o rangos de normalidad
- Existencia de valores CUT OFF o umbral de decisión

En algunos casos, y en función de aspectos como la complejidad de las técnicas y el grado de automatización de los procesos analíticos, la validación también puede ser realizada por personal técnico del laboratorio, hasta un determinado nivel de revisión de los resultados.

#### 14. BIBLIOGRAFÍA

1. AOAC International. Qualitative and quantitative microbiology. Guidelines for methods validation (1999).
2. CEN/TC 275 WG 6 TAG 4. Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for detection of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR- Part 2: Method for qualitative detection. Version 9. Junio 2011.
3. Directiva 98/79/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de octubre 1998 en diagnóstico *in vitro* médicos, 1998.
4. Guía G-ENAC-04. Rev. 3. Guía para la acreditación de laboratorios microbiológicos. Noviembre 2002.
5. Guía G-ENAC 9. Guía para la expresión de la incertidumbre de los resultados cuantitativos.2005.
6. Guía ISO 30:1992. Términos y definiciones utilizados en relación con los materiales de referencia.
7. Informe técnico sobre normalización de métodos moleculares basados en la amplificación de ácidos nucleicos por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), aplicados al análisis microbiológico de aguas y alimentos. Sociedad Española de Microbiología (SEM). Primera edición. Marzo 2007.
8. Jacobson, RH. Validación de pruebas serológicas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Rev Sci Tech Off Int Epiz. 1998;17: 507-526.
9. Norma ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. 2005.
10. Norma ISO 22118: 2011. Mycobiology of food and animal feeding stuffs- Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens- Performance characteristics.
10. Norma ISO 22119: 2011 Microbiology of food and animal feeding stuffs. –Real time polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens. General requirements and definitions.
11. Norma NF T90-471: Detection and quantification of *Legionella* and/or *Legionella pneumophila* by concentration and genic amplification by polymerase chain reaction by real time polymerase chain reaction (RT - PCR). Abril 2010.
12. Norma ISO 16140: 2003. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Protocolo para la validación de métodos alternativos.
13. Norma UNE-EN ISO 22174:2005. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de patógenos en los alimentos. Requisitos generales y definiciones.
14. Norma ISO/TR 13843. Water Quality.Guidance on validation of Microbiological Methods. 2000.
15. Norma ISO/TS 19036. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations. 2006.
16. Norma ISO 8199. Water quality. General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture.
17. Norma ISO 7218. Microbiology of food an animal feeding stuffs. General rules for microbiological examinations. 2007.
18. Norma ISO 29201. Water quality. Variability of test results and the uncertainty of measurement of microbiological enumeration methods. 2012.
19. Norma ISO 17994. Water quality – Criteria for establishing equivalence between microbiological methods. 2004.
20. Nota técnica NT-32. Rev. 3 Abril 2012.ENAC. Análisis microbiológico. Documento aclaratorio.
21. Rabenau HF, Kessler HH, Kortebusch M, Steinhorst A, Berger A. Guidelines for the methodical validation and verification of virus diagnostic laboratory tests. J Clin Virol. 2007; 40: 93-98.
22. UNE-EN ISO 20836:2007. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de patógenos en alimentos. Criterios de funcionamiento de los termocicladores.
23. UNE-EN ISO 20837:2007. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de patógenos en alimentos. Requisitos para la preparación de las muestras para la detección cualitativa.
24. UNE-EN ISO 20838:2007. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de patógenos en alimentos. Requisitos para la amplificación y la detección para los métodos cualitativos.

## ANEXO 1

### 1. Validación / verificación de los medios de cultivo en Microbiología

La importancia de la calidad de los medios de cultivo en el resultado de los ensayos es definitiva, ya que constituyen el auténtico “detector” de la presencia de microorganismos. Por ello se deben considerar los siguientes controles a establecer en los medios de cultivo, según se indica a continuación.

Se podrían distinguir dos tipos de medios de cultivo:

- a) Los preparados internamente por el laboratorio a través de ingredientes individuales.
- b) Los listos para su uso, entregados por el fabricante.

Para cada medio de cultivo se deberían garantizar los siguientes aspectos:

- 1) Que la composición del medio es la deseada.
- 2) Que funciona correctamente en cuanto a recuperación o inhibición de microorganismos específicos y cambios de color de otros requeridos.
- 3) Que se mantiene en estado correcto hasta su utilización, por ejemplo después del autoclavado.
- 4) Que es estéril en el momento de su uso.

Todo ello supone el establecimiento de una sistemática que indique:

- 1) Forma de uso, preparación y almacenamiento.
- 2) Sistemas de esterilización.
- 3) Pruebas de confirmación de requisitos.
- 4) Periodos de almacenamiento y caducidad.

La demostración de estos requisitos requiere la realización de una serie de pruebas que pueden dividirse en:

- 1) Inspección visual.
- 2) Pruebas de esterilidad.

Si es un medio preparado en el laboratorio además debe hacerse:

- 3) Pruebas de productividad y selectividad.
- 4) Controles de mantenimiento de propiedades pH

La **inspección visual** se realiza por la persona responsable a la recepción del producto, y antes de ser utilizado. Tiene como objetivo garantizar que no se aprecian defectos. (por ejemplo, pérdidas de humedad, etc.) que pusieran en cuestión el funcionamiento correcto.

Los medios deshidratados que estén aglutinados, cuarteados o presenten un cambio de color deben ser desechados. Los medios preparados que no cumplan las condiciones de grosor (4 mm) también deberían ser desechados o comprobados antes de su uso. Asimismo garantizará que se respeta la fecha de caducidad.

**Pruebas de productividad y selectividad.** Tienen como objetivo garantizar:

- a) La correcta recuperación, identificación y aislamiento, si aplica, del microorganismo de interés.

- b) La inhibición de microorganismos acompañantes en el caso de medios selectivos.

Para la evaluación de los medios selectivos se elegirán los microorganismos de forma que se puedan realizar las pruebas de productividad, selectividad o diferenciación del medio.

Los caldos de cultivo serán evaluados inoculando cepas de microorganismos que son susceptibles de crecer en dicho medio, y con aquéllos cuyo crecimiento debe de ser inhibido. A estos controles se les denomina positivos y negativos.

El resultado del desarrollo de los microorganismos en un medio de cultivo selectivo para su crecimiento debe de ser comparable cuantitativamente al obtenido con un medio no selectivo.

Cuando se utiliza un microorganismo cuyo crecimiento ha de verse inhibido por un medio selectivo, no debe de desarrollarse o debe de experimentar una clara reducción en comparación con el desarrollo experimentado en un medio no selectivo.

Es aconsejable utilizar un procedimiento cuantitativo que consiste en inocular en el medio de cultivo un número conocido y pequeño de microorganismos y evaluar el número de microorganismos recuperados. Este método puede utilizarse para establecer el nivel de recuperación por debajo/encima del cual se rechaza un lote (según se trate de controles positivos o negativos).

Estas pruebas se realizarán por el laboratorio con mayor o menor frecuencia en función del tipo de medios (interno o externo) y de la información suministrada por el proveedor en el segundo uso. En el caso de medios comerciales evaluados y con marcado CE o provenientes de un fabricante con certificación ISO 9000 no es necesario realizarlas, sin embargo, es útil conocer cómo se realizan estas pruebas para los medios preparados en el propio laboratorio y para comprobar las características de los medios comerciales de las distintas marcas. Sobre todo en el caso de medios para la recuperación de microorganismos de crecimiento difícil (por ejemplo, *Legionella pneumophila*, *Bordetella pertussis*...)

Hay que asegurarse de que las propiedades del producto quedan definidas en un documento, “especificación”, que se pueda solicitar a los fabricantes cuando se realizan los pedidos.

El contenido mínimo de la especificación que debe aportar el fabricante es, la identificación del producto, la caducidad, las condiciones de almacenamiento, el plan y frecuencia de muestreo, el control de la esterilidad que incluya los criterios de aceptabilidad y los controles de la eficacia, incluyendo el microorganismo utilizado, con referencia a la colección de cultivos de procedencia y los criterios de aceptabilidad, así como la fecha de emisión de la especificación

También debe de solicitarse al proveedor una garantía escrita de que cumple las especificaciones de calidad establecidas (certificado de control de calidad) que acompañará a cada lote enviado.

## **2. Pruebas a realizar para validación/verificación de métodos serológicos y de microbiología molecular (Rabenau, 2007).**

Existen diferentes protocolos. En este apartado comentamos los publicados por estos autores.

### 2.1 Verificación de los marcados IVD / CE con ensayos o pruebas y sistemas para la detección de anticuerpos específicos, detección de antígenos o ácidos nucleicos (NAT)

Si una nueva prueba con marcado IVD / CE, como la detección de anticuerpos específicos del virus, o la detección de antígenos víricos o ácidos nucleicos se introduce en el laboratorio de diagnóstico de rutina, deben llevarse a cabo experimentos para verificar la precisión y, en caso de una prueba cuantitativa NAT o sistema de prueba, la linealidad.

En el caso de un sistema de prueba o test cualitativo, puede utilizarse una muestra positiva y otra positiva baja para la determinación de la precisión intraensayo. Cada muestra se ensaya tres veces dentro de una misma carrera o "run". Para la precisión interensayo, pueden usarse una muestra positiva y un positivo bajo. Cada muestra se prueba una sola vez en tres días diferentes.

En el caso de una prueba cuantitativa o sistema de prueba para la detección de anticuerpos específicos de virus o antígenos víricos, deben usarse al menos cuatro muestras positivas (positivos bajos). Tres se utilizan para la determinación de la precisión intraensayo (introduciendo cada muestra tres veces en una carrera o run) y dos positivos altos y uno bajo para la determinación de la precisión interensayo (cada muestra se prueba una vez en tres días diferentes).

Para una prueba NAT cuantitativa se pueden utilizar tres positivos y tres positivos bajos para la determinación de la precisión intraensayo y uno positivo y otro positivo bajo para determinar la precisión interensayo. A fin de optimizar el flujo de trabajo de la verificación, puede ser útil utilizar el primer resultado de la prueba de precisión intraensayo como primer resultado de las pruebas de un día, lo que permite una reducción del número de pruebas para calcular la precisión interensayo a dos. En el caso de una prueba con marcado IVD / CE cuantitativa, además debe verificarse la linealidad, mediante el análisis de una dilución en serie (serie de dilución en base 10 con al menos tres etapas de dilución) de una muestra positiva en duplicado.

### 2.2 Validación de las pruebas de elaboración propia o sistemas de ensayo para la detección de anticuerpos específicos, la detección de antígenos o NAT

Si una prueba casera o *in house* para la detección de anticuerpos específicos frente al virus, la detección de antígenos víricos o NAT se introduce de rutina en el laboratorio de diagnóstico, deben realizarse experimentos de validación para calcular la sensibilidad, la especificidad, la precisión y, en caso de una prueba cuantitativa, la linealidad. La sensibilidad se determina probando 10 muestras con resultado positivo alto y 10 positivos bajos, mientras que la especificidad se determina mediante el análisis de 20 negativos, pero utilizando muestras con potencial reactividad cruzada para anticuerpos contra microorganismos de la misma familia, además de sueros positivos para factor reumatoide y de sueros que contienen autoanticuerpos para pruebas. Para las pruebas de NAT, se deben analizar muestras positivas para los microorganismos de la misma familia y muestras enriquecidas con material de referencia o cepas con potencial de reactividad cruzada. Para cada analito con potencial reactividad cruzada se debe probar al menos un positivo alto (con al menos  $10^5$ TCID<sub>50</sub>/ml o  $10^5$  equivalentes genómicos / ml). El cálculo de la precisión inter e intraensayo es similar a los casos anteriores, excepto que la extensión en la validación de las pruebas cuantitativas con respecto a muestras positivas es mayor (deben usarse al menos seis positivos en lugar de tres para la determinación de la precisión intraensayo y al menos dos en lugar de uno para la determinación de la precisión interensayo). En caso de una prueba de NAT de elaboración casera cuantitativa, además debe ser validada la linealidad, mediante el análisis de diluciones en serie (series de dilución en base 10 con al menos cuatro etapas de dilución) de dos muestras positivas por duplicado en 2 días.

En el PNT-VV-01 de este procedimiento n° 48 se presenta el método a seguir para la validación de pruebas moleculares mediante PCR.



Servicio de Microbiología Hospital..... .....	Validación de métodos moleculares	PNT-VV-01	
		Edición Nº 01	Página 2 de 7

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El propósito del presente procedimiento es describir el proceso seguido por el servicio de Microbiología para llevar a cabo la validación de los métodos microbiológicos definidos en el laboratorio. En particular a los métodos moleculares basados en la amplificación de secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (PCR-RT), tanto cualitativos (detección del ácido nucleico diana) como cuantitativos (cuantificación de la cantidad de ácido nucleico diana presente en la muestra).

Este procedimiento es de aplicación en:

- Métodos *in house*
- Métodos de referencia (métodos normalizados): no requieren una validación completa, pero sí la confirmación de su correcta aplicación.
- Métodos alternativos adquiridos comercialmente y validados según la norma ISO16140/ISO/TR13843, ISO 17994 y que sean reconocidos formalmente como equivalentes al método de referencia por una organización técnica competente e independiente. Se tratarán a efectos de validación como los métodos de referencia.
- Métodos basados en métodos de referencia (basados en normas): no requieren una validación completa, pero si la confirmación de su correcto funcionamiento.

Asimismo, en el caso de métodos normalizados sin información, se podrán utilizar los criterios de este procedimiento para calcular aquellos parámetros que se considere necesario, al objeto de comprobar que dichos métodos cumplen los requisitos definidos en la validación.

## 2. DOCUMENTOS DE CONSULTA

Como referencias básicas para la elaboración de este procedimiento se han tomado los criterios establecidos en los siguientes documentos:

- Norma UNE EN ISO 17025: 2005. Evaluación de la conformidad. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.
- Norma ISO 16140 (2003). Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Protocolo para la validación de métodos alternativos.
- Norma ISO/TS 19036 (2009). Microbiology of food animal feeding stuffs. Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations. Amendment 1. Measurement uncertainty for low counts.
- Norma ISO/DIS 29201: 2010 Water quality. The variability of test results and the uncertainty of measurement of microbiological enumeration methods.
- Nota técnica NT-32 Rev. 3 Abril 2012. ENAC. Análisis microbiológico. Documento aclaratorio.
- Norma NF T90-471: 2010. Detection and quantification of *Legionella* and/or *Legionella pneumophila* by concentration and genomic amplification by polymerase chain reaction by real time polymerase chain reaction (RT - PCR).

- Manual de Calidad del Servicio de Microbiología. Registros de la Calidad.
- Informe técnico sobre normalización de métodos moleculares basados en la ampliación de ácidos nucleicos por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), aplicado al análisis microbiológico de aguas y alimentos. Sociedad Española de Microbiología (SEM). Primera edición: marzo 2007.

## 3. PROCEDIMIENTO

### 3.1. VALIDACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES CUALITATIVOS

Son aquellos cuyo resultado se expresa como presencia ("Se detecta") o ausencia ("No se detecta") del microorganismo diana en la cantidad de muestra procesada.

En el caso de método comercial con marcado CE y en el que se utilicen exactamente los pasos validados previamente por la casa comercial solo sería necesario comprobar la precisión y la exactitud. Si se trata de un método de desarrollo propio, o modificación del método comercial (ya sea por cambio en el método de extracción o en las características de alguno de los equipos utilizados) el laboratorio deberá obtener los siguientes parámetros:

#### 3.1.1. Parámetros del funcionamiento del método

- 1) Límite de detección experimental: se define como la concentración más baja del microorganismo diana que puede ser detectada de forma reproducible con un 95% de probabilidad. Así, para 20 repeticiones, el límite de detección será aquel nivel más bajo que presente dos o menos resultados negativos.
- 2) Eficiencia: engloba los conceptos de *sensibilidad analítica* (fracción total del número de resultados positivos asignados correctamente con el método utilizado), *especificidad analítica* (fracción total del número de resultados negativos asignados correctamente con el método utilizado), *falsos positivos* (número de resultados positivos asignados erróneamente) y *falsos negativos* (número de resultados negativos asignados erróneamente). La *eficiencia* se define como la fracción total de resultados correctamente asignados, con el método utilizado debe ser superior al 90%.
- 3) Inclusividad: mide la capacidad del método para detectar el analito entre un amplio grupo de cepas diana, sin tener en cuenta el efecto de la matriz o muestra. Es claramente un parámetro exclusivo del método de PCR que no está afectado por el tipo de muestra.
- 4) Exclusividad: ausencia de interferencia en el método de un grupo de cepas no diana, sin tener en cuenta el tipo de muestra. Es claramente un parámetro exclusivo del método de PCR que no está afectado por el tipo de muestra.
- 5) Cualquier parámetro que sea crítico o normativo en el método utilizado: cada laboratorio debe conocer cuáles son sus criterios de aceptación o utilizar los publicados en documentos normalizados o

de expertos. Por ejemplo en la detección de virus entéricos en alimentos, en el documento CEN/TC275/WG6/TAG4, se indica que se deberá comprobar:

- La eficiencia de la extracción viral: deberá ser  $\geq$  1%.
- La eficiencia de amplificación: deberá ser  $>$  25%.

En el caso de que se trate de métodos de tipo I, II y III, el laboratorio deberá realizar una validación complementaria que consistirá en la comprobación del límite de detección y de la eficiencia, así como aquellos parámetros que se consideren esenciales o críticos para el buen funcionamiento del método. Para los métodos de tipo IV (*in house*) el laboratorio precisará realizar una validación completa en la que se deberá incluir también el estudio de la inclusividad y exclusividad, así como en los casos anteriores el estudio de aquellos parámetros que se consideren esenciales o críticos para el buen funcionamiento del método.

1) Límite de detección experimental:

Se seleccionarán tantos tipos de muestra cómo se vayan a validar. Lo ideal es trabajar con muestras reales que lleguen al laboratorio para su análisis y que no contengan el microorganismo diana.

Una validación completa debería incluir, al menos 60 resultados por cada tipo de muestra, siendo deseable que un 50% estén contaminados con el

ácido nucleico de la cepa diana y el otro 50% sean negativos. El número mínimo para una verificación sería de 10 muestras por tipo de muestra.

El método a validar puede incluir pasos previos de enriquecimiento o de concentración y debería tener una sensibilidad de 1 a 10 ufc o equivalentes genómicos víricos en la cantidad de muestra procesada. Las muestras se inocularán por tanto a niveles de concentración del microorganismo diana bajos y del orden del límite esperado. Para ello de cada muestra se prepararán dos alícuotas una de ellas sin inocular nos servirá como blanco y la otra se inoculará al nivel deseado. Sobre ambas muestras se aplicará el procedimiento a validar.

El inóculo se podrá valorar en unidades formadoras de colonia por cultivo, cantidad de ácido nucleico por espectrofotometría, unidades genómicas/reacción por PCR a tiempo real, etc.

Para inocular las muestras se utilizará en general y siempre que sea posible material de referencia obtenido de colecciones de cepas internacionalmente reconocidas.

2) Eficiencia:

Con los resultados obtenidos tanto en las muestras inoculadas como en las no inoculadas se irán rellenando las tablas en las que queda reflejado:

MUESTRA	RESULTADO TEÓRICO	RESULTADO TEÓRICO	MÉTODO VALIDAR	MÉTODO VALIDAR	CLASIFICACIÓN
	+	-	+	-	

VALOR TEÓRICO: para una muestra no inoculada es negativo y para una inoculada es positivo. Se asignarán a cada pareja un valor de referencia: a, b, c y d según se indica a continuación:

	MÉTODO A VALIDAR		
	Resultado +	Resultado -	
Resultado teórico +	a	b	a + b
Resultado teórico -	c	d	c + d
TOTAL	a + c	b + d	n

A partir de los valores se calcula:

**Sensibilidad**=  $a/(a+b)$  porcentaje de positivos correctamente asignados.

**Especificidad**=  $d/(c+d)$  porcentaje de negativos correctamente asignados.

**Falsos positivos**=  $c/(a+c)$  porcentaje de positivos erróneamente asignados.

**Falsos negativos**=  $b/(b+d)$  porcentaje de negativos erróneamente asignados.

**Eficiencia E = (a+d)/n** (es una medida del porcentaje de aciertos).

N°	a		Sensibilidad %	
	b		Falso negativo %	
	c		Falso positivo %	
	d		Especificidad %	
Total:			Eficiencia %	

**Requisito:** la eficiencia debe ser mayor del 90%.

Comparar los resultados obtenidos con los requisitos establecidos.

### 3 y 4) Inclusividad y exclusividad:

Consiste en evaluar la detección de 30 cepas diana y 30 cepas no diana sin estimar el efecto matriz.

El nivel de concentración de cepas diana debe ser claramente detectable, por ejemplo del orden de 100 unidades genómicas/reacción.

Para cepas no diana la concentración se ajustará al nivel habitualmente esperado en la muestra en función del tipo de microorganismo, por ejemplo 1000 unidades genómicas/reacción.

En el Anexo A del borrador de la Norma ISO 22118.2011 aparece un listado de los mínimos microorganismos que deben usarse en la detección de la exclusividad.

También se puede realizar una evaluación a partir de los datos bibliográficos con las experiencias disponibles y las interferencias detectadas en dichas referencias.

Para un mayor conocimiento del método utilizado es conveniente verificar, también el rendimiento o eficiencia de la PCR a tiempo real.

### 5) Otros parámetros

#### 5.1) Verificación del rendimiento o eficiencia de la PCR a tiempo real:

Se realiza una suspensión inicial de microorganismo diana, procedente de una cepa de referencia, a una concentración estimada de 10<sup>9</sup> ufc/ml, la cual se comprobará mediante siembra por duplicado de 1ml de la dilución 10<sup>2</sup> ufc/ml en un agar adecuado.

A partir de la suspensión inicial se realiza la extracción del ácido nucleico diana, como se indique en el procedimiento a validar y se realizan diluciones decimales del extracto, hasta obtener una suspensión con una concentración teórica de 1 copia/reacción.

Se realiza la amplificación/detección por triplicado de cada dilución como se indique en el procedimiento a validar, con el fin de detectar el nivel mínimo en el que se observa señal de amplificado, sin pérdida de la linealidad. A partir de la recta, se obtiene (la mayoría de los *software* de los equipos de PCR a tiempo real calculan automáticamente este parámetro) la eficiencia, relacionada con la pendiente de la recta de la siguiente forma:  
Eficiencia = 10<sup>(-1/m)</sup> - 1.

Donde m es la pendiente de la recta.

Con los resultados obtenidos hay que comprobar que la eficiencia deberá estar comprendida entre 95-105% y un coeficiente de correlación (R<sup>2</sup>) >95%.

#### 5.2) Verificación del límite instrumental o de detección de la PCR a tiempo real:

A continuación se expone un ejemplo para verificar el límite instrumental de la PCR a tiempo real: para ello se realiza como en el caso anterior una suspensión del microorganismo diana a una concentración estimativa de 10<sup>9</sup> ufc/ml.

A partir de esta suspensión se realizan diluciones decimales seriadas, hasta llegar a una concentración teórica de 1 ufc/ml. Posteriormente se procede a la extracción del ácido nucleico diana de cada una de las suspensiones, como se indique en el procedimiento a validar.

Se realiza la amplificación/detección por triplicado de cada dilución para obtener como en el caso anterior una recta y poder establecer cual es la menor concentración del microorganismo diana en ufc/ml por debajo de la cual se pierde la linealidad. En caso necesario, con este valor se podrá establecer la concentración del control de extracción de la PCR a tiempo real, que será 10 veces superior al mismo.

### 3.2. VALIDACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES CUANTITATIVOS

Son aquellos que permiten la cuantificación del ácido nucleico diana presente en la muestra.

El laboratorio deberá obtener los parámetros que se indican a continuación.

#### 3.2.1. Parámetros del funcionamiento del método

1) Exactitud del método: se define como la recuperación media del método de ensayo a validar. Requisito: documental (ejemplo, recuperación media ≥ 25% NORMA AFNOR XP T 90-471).

2) Precisión del método: grado de concordancia entre resultados obtenidos al aplicar el método de ensayo repetidas veces bajo las condiciones establecidas.

3) Incertidumbre: estimación que caracteriza el intervalo de valores en el que se sitúa, con una alta



Servicio de Microbiología Hospital..... .....	Validación de métodos moleculares	PNT-VV-01	
		Edición N° 01	Página 5 de 7

probabilidad dada, el valor verdadero de la magnitud medida.

4) Límite de detección experimental de la PCR: se define como la concentración más baja de unidades genómicas por reacción del ácido nucleico diana que puede ser detectada de forma reproducible con un 95% de probabilidad.

5) Límite de cuantificación de la PCR: se define como la concentración más baja de unidades genómicas por reacción del ácido nucleico diana que se puede determinar cuantitativamente con un nivel aceptable de precisión y exactitud a través de una validación.

6) Eficiencia y linealidad de la reacción: se define como el grado de ajuste de los puntos experimentales a una recta.

7) Inclusividad y exclusividad: definido en los métodos cualitativos.

### 3.2.1.1. Estudio de la eficiencia de la reacción

La recta de calibrado da la correlación entre el logaritmo de las concentraciones y el Ct (Cycle threshold o ciclo de corte):

$$y = mx + b$$

Donde:

y: Ct de la muestra

x: log. de la concentración

m: pendiente de la recta

b: ordenada en el origen

Los requisitos que debe cumplir la recta de calibrado son:

1.- La eficiencia deberá estar comprendida entre 95-105%, y se calcula como:

$$\text{Eficiencia} = 10^{(-1/m)} - 1$$

Donde m es la pendiente de la recta.

2.- La pendiente "m" debe estar comprendida entre -4.115 y -2.839.

### 3.2.1.2. Estudio de la exactitud e incertidumbre de la linealidad de la PCR-RT

Se realizarán, al menos, diez series de trabajo diferentes con soluciones patrón de ácidos nucleicos de concentraciones comprendidas entre  $10^0$  a  $10^6$  UG (unidades genómica por ml de reacción).

Con los valores de los Ct obtenidos en las series de trabajo se calcula:

- El Ct promedio y la desviación típica de los valores de los Ct de cada uno de los estándares

- La construcción de la recta de calibrado con los valores de Ct promedio para cada uno de los estándares.

- El cálculo de los valores de la concentración (UG/reacción) en logaritmos para cada uno de los

estándares con la recta de calibrado obtenida en el punto anterior.

- El promedio y la desviación típica (S) de las concentraciones calculadas.

- El cálculo del sesgo (bias) para cada uno de los estándares, obtenido como diferencia entre el promedio de la concentración calculada y el valor teórico asignado.

- El cálculo de la exactitud de la linealidad (ELIN) como :

$$E_{LIN} = \sqrt{Bias^2 + S^2}$$

Este valor tiene que ser < 0,15.

- El cálculo de la incertidumbre de la linealidad:

$$U_{LIN} = E_{LIN} \times tk-2$$

Donde:

$E_{LIN}$ : exactitud de la linealidad

t es la T-student.

K: n° de series o repeticiones.

Por definición del límite de detección y de cuantificación y de los resultados obtenidos en el estudio de la exactitud de la linealidad se puede concluir que:

Límite de detección: se corresponde con el primer punto de la recta que no cumple el criterio de exactitud de la linealidad (< 0,15) y se detecta el 95% de las veces.

Límite de cuantificación: Se corresponde con el primer punto de la recta que cumple el criterio de exactitud de la linealidad (< 0,15).

### 3.2.1.3.-Cálculo de la recuperación media y la incertidumbre del ensayo

Se realizará para cada tipo de muestra que se vaya a validar. Lo ideal es trabajar con muestras reales que lleguen al laboratorio para su análisis.

De cada muestra se tomarán tres alícuotas, una para la realización del blanco y otras dos que se inocularán y se procesarán en reproducibilidad. Como mínimo se necesitarán 30 muestras inoculadas en tres niveles de contaminación del microorganismo diana.

Con los datos obtenidos se calculará:

- La recuperación media en logaritmos (Rmedia) como el promedio de las diferencias entre las concentraciones en logaritmos de cada una de las muestras inoculadas, y la concentración también en logaritmos de su correspondiente inóculo.

- La varianza ( $S^2$ ) en logaritmo de las diferencias anteriores.

Servicio de Microbiología Hospital..... .....	Validación de métodos moleculares	PNT-VV-01	
		Edición N° 01	Página 6 de 7

- La incertidumbre en logaritmos (log) :

$$I_{\log} = 2 \times \sqrt{R_{\text{media}}^2 + S^2}$$

#### 3.2.1.4. Sensibilidad, especificidad, falsos positivos, falsos negativos

Se valorará de la misma manera que en los ensayos cualitativos.

Para los métodos de tipo IV (*in house*) el laboratorio precisará realizar una validación completa en la que el se deberá incluir también el estudio de la inclusividad y exclusividad, así como en los casos anteriores el estudio de aquellos parámetros que se consideren esenciales o críticos para el buen funcionamiento del método.

#### 4. REGISTROS

La validación de un método microbiológico, se registrará en un formato donde constará la siguiente información:

- 1) Método microbiológico: Se indicará el método microbiológico objeto de la validación.
- 2) Responsable de la validación.
- 3) Objetivos/ uso previsto.
- 4) Relación de documentos: Se indicará una relación de todos los documentos que han sido necesarios para la elaboración del procedimiento de validación, (Datos adicionales, fichas de trabajo donde se recogen los datos primarios, equipos y resultados).
- 5) Parámetros de validación.
- 6) Indicar los parámetros que deben estudiarse para realizar la validación del método y los requisitos establecidos.

7) El jefe de servicio o el responsable del área establecerá en función de los valores obtenidos la validez o no del método.

8) Sistemática de validación prevista.

a) Se describirá, en secuencia ordenada, cada una de las etapas de realización de la validación del método analítico.

b) Preparación e inoculación de las muestras.

c) Realización: se describirá, en secuencia ordenada, el proceso seguido para determinar cada uno de los parámetros.

9) Interpretación del resultado: se establecerán los criterios de aceptación o rechazo, a partir de los datos obtenidos y los establecidos *a priori*.

10) Otros registros:

En la validación de los métodos moleculares cuantitativos se adjuntarán, si procede, las hojas de cálculo que acompañan al procedimiento correspondiente.

La Unidad de Control de Calidad, será responsable del archivo de los registros relacionados con la validación del método analítico correspondiente. Los registros deberán reflejar todos los datos necesarios para reproducir de forma documental, las pruebas realizadas para la validación del método, así como la declaración final de validez o no del método (válido, no válido, válido con restricciones).

Estos registros se conservarán durante al menos 5 años a partir del fin de la vigencia del método, con objeto de estar capacitados para establecer la diferencia de los resultados entre los métodos nuevos y los antiguos, y compararlos entre ellos.

En el anexo 1 de este PNT se incluye un ejemplo de hoja para el registro de la validación de los métodos microbiológicos

## Anexo 1. Protocolo de validación de métodos microbiológicos

N° de Protocolo:

Responsable:

1.- Objetivos del estudio

2.- Fecha de realización

3.- Alcance de la validación

Analito (ej. agente infeccioso)

Muestra

Rango de trabajo

Procedimiento de ensayo

 (Código del procedimiento de ensayo)

Tipo de Método

 Cualitativo
  Cuantitativo
  Semi-Cuantitativo

Nombre y código de los equipos empleados

4.- Parámetros de Validación

- Selectividad/Especificidad  
 Límite de detección  
 Límite de cuantificación  
 Intervalo de linealidad  
 Precisión: Repetibilidad  
 Precisión: Reproducibilidad  
 Exactitud  
 Otros

5.- Criterios de aceptación

% aciertos

% fallos

LD =

LC =

R<sup>2</sup> ≥

CL ≥

CV% ≥

CV% ≥

E% ≤

Indicar

6.- Relación de experimentos

## Límite de Detección

Descripción

## Selectividad / Especificidad

Descripción

## Parámetro

Descripción

7.- Observaciones

Cargo

Firma

Fecha