

Directrices de validación y verificación para la detección de SARS-CoV-2 por técnica de RT-PCR en tiempo real desde muestras de saliva

25 DE JUNIO DE 2021

Directrices de validación y verificación para la detección de SARS-CoV-2 por técnica de RT-PCR en tiempo real desde muestras de saliva

TABLA DE CONTENIDOS

I. CONSIDERACIONES PARA LA VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA.	4
Tamaño mínimo muestral para la evaluación de desempeño diagnóstico en una validación metodológica.	5
II. CONSIDERACIONES PARA EL USO DE UNA METODOLOGÍA VALIDADA.	6
Requisitos para Verificación	6
III. Anexo 1: Tamaño de muestra para validación	8
IV. Anexo 2: Ecuación 1	9
Ecuación del tamaño muestral	9
V. BIBLIOGRAFÍA	10

I. CONSIDERACIONES PARA LA VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA.

La validación es la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas de que se cumple los requisitos particulares para un uso específico previsto.

El estándar NCh-ISO 15189:2013, señala que el laboratorio debe validar los procedimientos de examen derivados de las fuentes siguientes (1):

- a) métodos no normalizados;
- b) métodos diseñados o desarrollados por el laboratorio;
- c) métodos normalizados utilizados fuera de su alcance previsto;
- d) métodos validados posteriormente modificados.

La validación debe ser tan amplia como sea necesario y confirmar, a través del aporte de evidencia objetiva (en la forma de características de desempeño), que los requisitos específicos para el uso previsto del examen se han cumplido.

El laboratorio debe documentar el procedimiento utilizado para la validación y registrar los resultados obtenidos. El personal con la autoridad correspondiente debe revisar los resultados de la validación y registrar la revisión (1).

Cuando se realicen cambios a un procedimiento de examen validado, se debe documentar el efecto de tales cambios y, cuando corresponda, se debe llevar a cabo una nueva validación (1).

Por otro lado, el Manual del estándar general de acreditación para Laboratorios Clínicos del Sistema Nacional de Acreditación (2), si bien no establece como requisito una validación de procesos analíticos, indica que para una adecuada gestión de los procesos los laboratorios clínicos deben tener un sistema de gestión de calidad con procedimientos documentados y evaluaciones periódicas de las etapas analítica y pos analítica implementado y validado, lo que incluyen los procesos analíticos antes de la implementación de una nueva metodología, con el objetivo de entregar garantías de calidad que aseguren los resultados, con la mayor exactitud diagnóstica de los análisis realizados (3).

El Instituto de Salud Pública de Chile, sugiere que el uso de métodos modificados fuera de su alcance previsto por laboratorios clínicos, estén basados principalmente en el grado de confianza establecido en la validación técnica y con esto demostrar que las modificaciones realizadas no afectarán el desempeño del método. En este sentido, se recomienda que el proceso de validación debe confirmar, mediante el suministro de evidencia objetiva, que se han cumplido los requerimientos para ser utilizada o aplicada esta metodología.

La validación puede incluir la determinación de los siguientes parámetros que se apliquen de acuerdo a las necesidades de la validación. Estos pueden ser:

- a) Sensibilidad
- b) Especificidad
- c) Valor Predictivo Positivo (VPP)
- d) Valor Predictivo Negativo (VPN)
- e) Precisión
- f) Límite de detección

Posteriormente, se desarrollan las pruebas experimentales de la validación y se evalúan los resultados obtenidos comparados con los criterios de aceptabilidad definidos, en este caso, por el Instituto de Salud Pública de Chile. Los **Criterios de Aceptabilidad**, según el uso previsto del análisis de diagnóstico *in vitro* para la detección de SARS-CoV-2 en muestras de saliva son:

Tabla 1.

Criterios de aceptabilidad para resultados de validación.

Sensibilidad Diagnóstica	Mayor o Igual a 90%
Especificidad Diagnóstica	Mayor o Igual a 95%

Finalmente, se realiza el informe técnico de validación y de acuerdo a los resultados obtenidos, se aprueba el uso o no de esta metodología. Se deben informar los resultados cualitativos obtenidos de un panel de muestras compuestas por: verdaderos positivos (VP), falsos negativos (FN), falsos positivos (FP) y verdaderos negativos (VN). Se requiere que las muestras positivas por saliva reflejen la distribución natural de las cargas virales del SARS-CoV-2 en la población, con cargas virales altas, medias y bajas, donde aproximadamente entre el 15-20% de las muestras clínicas positivas analizadas en saliva, correspondan a cargas virales bajas (es decir, recuentos de RT-PCR Ct > 30).

Adicionalmente, como Agencia Nacional de Dispositivos Médicos, Innovación y Desarrollo (ANDID), sugerimos el uso de kits comerciales de detección de SARS-CoV-2 para técnica de RT-PCR en tiempo real, que cuenten con antecedentes de uso autorizado por una autoridad reguladora de alta vigilancia sanitaria en dispositivos médicos, como son algunas de las agencias que forman parte del Foro Internacional de Reguladores de Dispositivos Médicos (IMDRF, por sus siglas en inglés), tales como la FDA de Estados Unidos, TGA de Australia, HSA de Singapur, ANVISA de Brasil, HEALTH CANADA de Canadá, PMDA de Japón y MFDS de Corea del Sur, y así realizar un mayor análisis regulatorio y que su protocolo cuente con la sensibilidad y especificidad reportada por el fabricante, al igual que el tamaño de muestra usado para estimar aquellos parámetros donde se detalla el total de muestras positivas y negativas identificados por el método de referencia y kit comercial.

Tamaño mínimo muestral para la evaluación de desempeño diagnóstico en una validación metodológica.

El Instituto de Salud Pública de Chile ha considerado el uso del “User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline” del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para establecer un tamaño mínimo de muestras positivas detectadas conjuntamente por el método de referencia y el test candidato (n=50 verdaderos positivos*), y un tamaño mínimo de muestras negativas detectadas por el método de referencia (n=50 muestras negativas detectadas por método de referencia) (4).

Sin embargo, en el contexto de pandemia por SARS-CoV-2, y con los antecedentes publicados por la Food and Drug Administration (FDA) de Estados Unidos, para autorización de uso de emergencia (EUA), en materia de validación de un método diagnóstico para detección de SARS-CoV-2 por técnica molecular en muestra de saliva (5), también considera que los desarrolladores de estas pruebas, utilicen un tamaño mínimo de 30 muestras positivas detectadas por el método de referencia (n=30 muestras positivas) y un tamaño mínimo de 30 muestras negativas detectadas por el método de referencia (n=30 muestras negativas), para la evaluación de desempeño clínico.

Finalmente, se recomienda que, durante el proceso de validación los laboratorios previamente evalúen de forma interna el estado de su validación, antes de su finalización, considerando mejoras de ser necesario y así alcanzar un desempeño óptimo, de acuerdo a los criterios de aceptabilidad y tamaño mínimo muestral, recomendados por el Instituto de Salud Pública de Chile.

*verdaderos positivos: muestras detectadas positivas simultáneamente por método de referencia y candidato.

II. CONSIDERACIONES PARA EL USO DE UNA METODOLOGÍA VALIDADA.

El Instituto de Salud Pública de Chile, recomienda la implementación de un método de detección de SARS-CoV-2 por técnica RT-PCR en tiempo real en matriz de saliva, validado por algún laboratorio registrado con capacidad diagnóstica para PCR SARS-CoV-2 del país y que cumpla con los criterios de aceptabilidad definidos por el ISP (sensibilidad diagnóstica sea mayor o igual a 90% y especificidad diagnóstica mayor o igual a 95%), según el uso previsto del análisis de diagnóstico in vitro para la detección de SARS-CoV-2 en muestras de saliva.

Esta metodología validada, puede ser implementada en otro recinto, para tal efecto, los laboratorios antes de su ejecución y puesta en marcha, deben realizar la verificación correspondiente, determinando internamente las características de funcionamiento del método validado.

La verificación de un método, corresponde a la confirmación mediante la examinación y presentación de evidencia objetiva, de que se han cumplido los requisitos específicos para un método validado, evaluando su desempeño de acuerdo al uso previsto para cual fue diseñado (6). Esto quiere decir, que si un laboratorio va utilizar un método el cual ya fue validado, no necesita validarse nuevamente, pero sí debe realizar la verificación de algunos de los parámetros que fueron reportados en la validación. **Por lo tanto, una metodología que fue validada, debe ser verificada por los laboratorios bajo sus condiciones propias de operación, antes de ser implementada y usada como rutina en la población.**

Requisitos para Verificación

El primer requisito para los laboratorios que deseen implementar una metodología validada por otra institución, es que esta debe cumplir **con los criterios de aceptabilidad** (Tabla 1). Basado en esto, debe realizar la verificación correspondiente tal como fue validada, es decir, sin sufrir modificaciones en cuanto al tratamiento de la muestra, método de extracción, kits/reactivos e instrumentos utilizados para la amplificación y detección. En caso que los laboratorios no sean capaces de replicar la metodología tal como fue validada, deberán realizar la validación correspondiente por considerarse como una metodología modificada (1).

Considerando los criterios de aceptabilidad de sensibilidad y especificidad, si la sensibilidad reportada en la validación del método es mayor o igual al 95%, se ha establecido que en una verificación, la muestra mínima sugerida es de 18 muestras positivas detectadas por hisopado nasofaríngeo (HNF), siempre y cuando la validación reportada cumpla con el estándar mínimo del CLSI para las muestras VP (Tabla 4). Si se opta por el criterio sugerido por la FDA de Estados Unidos, considerando los criterios de aceptabilidad de sensibilidad y especificidad, si la sensibilidad reportada en la validación del método es mayor o igual al 95%, se ha establecido que, en una verificación, la muestra mínima sugerida es de 18 muestras positivas detectadas por hisopado nasofaríngeo (HNF), siempre y cuando la validación reportada cumpla con el estándar mínimo de la FDA (Tabla 5). En caso que la validación reportada, no cumpla con lo descrito anteriormente, se requiere de un tamaño mínimo de 50 VP para la verificación de conformidad (4)

Para una especificidad reportada en la validación mayor o igual al 95%, la muestra mínima sugerida es de 18 muestras negativas detectadas por HNF, siempre y cuando la validación reportada cumpla con el estándar mínimo del CLSI para las muestras negativas detectadas por HNF (Tabla 4). Si se opta por el criterio sugerido por la FDA de Estados Unidos, considerando los criterios de aceptabilidad de sensibilidad y especificidad, si la especificidad reportada en la validación del método es mayor o igual al 95%, se ha establecido que, en una verificación, la muestra mínima sugerida es de 18 muestras negativas detectadas por hisopado nasofaríngeo (HNF), siempre y cuando la validación reportada cumpla con el estándar mínimo de la FDA (Tabla 5). En caso que la validación no cumpla con lo descrito anteriormente, se requiere de un tamaño mínimo de 50 muestras negativas detectadas por HNF para la verificación de conformidad.

Para una sensibilidad reportada en la validación menor a 95%, la cantidad total de muestras positivas detectadas por HNF debe determinarse mediante la “Ecuación 1” (**ver Anexo N° 2 para criterios del tamaño muestral de la verificación**), siempre y cuando, la validación reportada cumpla con el estándar mínimo del CLSI para las muestras VP (Tabla 4). Si se opta por el criterio sugerido por la FDA de Estados Unidos, considerando los criterios de aceptabilidad de sensibilidad y especificidad, si la sensibilidad reportada en la validación del método es menor al 95%, se ha establecido que, en una verificación, la muestra mínima sugerida debe determinarse mediante la ecuación 1, siempre y cuando la validación reportada cumpla con el estándar mínimo de la FDA (Tabla 5). En caso que la validación no cumpla con lo descrito anteriormente, se requiere de un tamaño mínimo de 50 VP para la verificación de conformidad (4).

Considerando los valores obtenidos en la verificación del método, se debe calcular la sensibilidad y especificidad diagnóstica con sus respectivos intervalos de confianza (se sugieren intervalos de confianza exactos de Clopper-Pearson), para esto puede utilizar la siguiente herramienta:

- MedCalc (https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php)
- Software gratuito R (www.r-project.org) y R Studio (www.rstudio.com) (7).

El ISP considera que el criterio de aceptabilidad para la **verificación**, es una sensibilidad y especificidad reportada sobre o igual al intervalo inferior de la validación, por ejemplo:

- a) a) La validación del **Método A** para detección de SARS-CoV-2 en técnica RT-PCR en tiempo real para matriz saliva, reportó los siguientes parámetros de desempeño diagnóstico:
- Sensibilidad: 94,34% [IC: 84,34%-98,82%]
- Especificidad: 98,67% [IC: 92,79%-99,97%]

Tabla 2:

Evaluación de desempeño del Método A en comparación con la referencia.

		Referencia		
		Positivo	Negativo	Total
Método A	Positivo	50	1	51
	Negativo	3	74	77
	Total	53	75	128

- b) Considerando que la Sensibilidad es inferior a 95%, y además la cantidad de VP de la validación (n=50 VP) se encuentra acorde a las directrices del CLSI y la FDA (n=53) (Tabla 2), es que el tamaño mínimo muestral para realizar la **verificación** debe determinarse mediante la “Ecuación 1”. Por otro lado, la especificidad es mayor que un 95% y el total de muestras negativas detectadas por HNF (n=75) se encuentra acorde a las directrices por el CLSI y la FDA (n=75). Por lo tanto, se debe analizar para una **verificación** un mínimo de 21 muestras positivas y 18 muestras negativas, confirmadas desde una muestra de HNF.
- c) Se considera como criterio de aceptabilidad para la verificación, una sensibilidad y especificidad reportada sobre o igual al intervalo inferior de la validación del **Método A**, esto es, mayor o igual a 84,34% para sensibilidad y 92,79% para especificidad.
- d) El desempeño de un kit bajo evaluación debe ser comparado con el método de referencia usando una tabla 2x2, que presenta la clasificación de las muestras según resultado obtenido por cada test. Esta tabla 2x2 se utiliza comúnmente para presentar los resultados de manera más ordenada (ver anexo 1).

III. ANEXO 1: Tamaño de muestra para validación

El desempeño de un kit/metodología bajo evaluación puede ser comparada con un método de referencia usando una tabla 2x2, que presenta la clasificación de las muestras por cada test.

Tabla 3:

Tabla 2x2 para evaluar el desempeño de un test

		Test Referencia		
		Muestras Positivas (+)	Muestras Negativas (-)	Total
Test candidato	Muestras Positivas (+)	VP	FP	VP + FP
	Muestras Negativas (-)	FN	VN	FN + VN
	Total	VP + FN	FP + VN	VP + FN + FP + VN

Abreviaciones: VP: Verdaderos Positivos; FN: Falsos Negativos; FP: Falsos Positivos; VN: Verdaderos Negativos

Para realizar una **validación**, el ISP recomienda utilizar lo indicado por la normativa del CLSI (un mínimo de 50 muestras VP y 50 negativas detectadas por el método de referencia) o la indicación de emergencia sanitaria publicada por la FDA (30 muestras positivas y 30 negativas detectadas por el método de referencia). En un esquema de tabla 2x2 esto sería:

Tabla 4:

Tabla 2x2 para validar un test candidato según estándar CLSI.

		Test Referencia	
		Muestras Positivas (+)	Muestras Negativas (-)
Test candidato	Muestras Positivas (+)	VP ≥ 50	FP
	Muestras Negativas (-)	FN	VN
	Total	VP + FN	FP + VN ≥ 50

Abreviaciones: VP: Verdaderos Positivos; FN: Falsos Negativos; FP: Falsos Positivos; VN: Verdaderos Negativos

En el contexto de emergencia de salud pública, para realizar una validación, el ISP recomienda utilizar lo indicado por la FDA. En un esquema de tabla 2x2 esto sería:

Tabla 5:

Tabla 2x2 para validar un test candidato según criterio FDA.

		Test Referencia	
		Muestras Positivas (+)	Muestras Negativas (-)
Test candidato	Muestras Positivas (+)	VP	FP
	Muestras Negativas (-)	FN	VN
	Total	VP + FN ≥ 30	FP + VN ≥ 30

Abreviaciones: VP: Verdaderos Positivos; FN: Falsos Negativos; FP: Falsos Positivos; VN: Verdaderos Negativos

IV. ANEXO 2: Ecuación 1

Se utilizará la fórmula de tamaño muestral para la estimación de una proporción con una confianza del 95% y un error máximo admisible correspondiente a un 10%.

Ecuación del tamaño muestral

Considerando que la sensibilidad o especificidad de un test de diagnóstico es una proporción, se utilizó la siguiente fórmula para determinar el tamaño de muestra (8,9):

$$n = \frac{z_{\alpha/2}^2 * P * (1 - P)}{d^2}$$

(Ecuación 1)

Dónde:

Z: es el percentil de la función de distribución de la Gaussiana (Normal (0,1)).

α : es la probabilidad que el intervalo de confianza no contenga al parámetro.

P: es la proporción (en este caso la sensibilidad o especificidad predeterminada)

d: es el error máximo admisible, valor que corresponde a un error de tolerancia para la estimación del parámetro.

Se utilizará la fórmula de tamaño muestral para la estimación de una proporción con una confianza del 95% y un error máximo admisible correspondiente a un 10%

En este caso, al reemplazar los valores de percentil y error máximo admisible correspondiente en la Ecuación 1 se tiene:

$$n = \frac{1,96^2 * P * (1 - P)}{0,1^2}$$

V. BIBLIOGRAFÍA

1. NCh-ISO 15189:2013 Laboratorios clínicos - Requisitos para la calidad y la competencia, segunda edición.
2. MANUAL DEL ESTÁNDAR GENERAL DE ACREDITACIÓN PARA LABORATORIOS CLÍNICOS. Superintendencia de salud. https://www.supersalud.gob.cl/observatorio/671/articulos-4530_manual_LC_pdf.pdf. Revisada el 24 de febrero de 2021
3. ISO/IEC 17025:2017 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración., ISO Geneva.
4. EPI2-A2. User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute. Vol. 28, No. 3.
5. Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). FDA; 2020 Disponible en: <https://www.fda.gov/media/135659/download> [Acceso el 11 de mayo de 2020].
6. La adecuación al uso de los métodos analíticos. Una guía de laboratorio para validación de métodos y temas relacionados. EUROCHAM – España. Primera Edición-Española. Disponible en: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_ES.pdf.
7. R-Team, R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2015.
8. Banoo S, Bell D, Bossuyt P, Herring A, Mabey D, Poole F, et al. TDR Diagnostics Evaluation Expert Panel: Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2010;8(12 Suppl):S17-29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21548184>
9. Zhou X, McClish DK, Obuchowski NA. *Statistical methods in diagnostic medicine*. 2nd ed. Hoboken, N.J: Wiley; 2011. 545 p. (Wiley series in probability and statistics).