

Directriz de la OIE

Patrones de referencia internacional para los ensayos de reacción en cadena de la polimerasa

1. Introducción

1.1. Finalidad

Este documento facilita orientaciones para la preparación, validación y distribución de los controles de ensayos moleculares como Patrones de Referencia internacional para los ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizados en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas de los animales. El diagnóstico por PCR se ha impuesto como la técnica más avanzada para la mayor parte de las enfermedades infecciosas de los animales de interés para la OIE. Si bien las técnicas de PCR, en particular la PCR en tiempo real, ofrecen excelentes prestaciones en cuanto a sensibilidad y especificidad, es esencial disponer de controles apropiados. En estas directrices, el término "Patrones" hace referencia a los ácidos nucleicos, salvo indicación contraria. La OIE designa estas preparaciones normalizadas como patrones o estándares de referencia primaria para su uso con las pruebas descritas en el *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres (Manual Terrestre)*. El diagnóstico por PCR se ha impuesto como la técnica más avanzada para la mayor parte de las enfermedades infecciosas de los animales de interés para la OIE. Si bien las técnicas de PCR, en particular la PCR en tiempo real, ofrecen excelentes prestaciones en cuanto a sensibilidad y especificidad, es esencial disponer de controles apropiados.

1.2. Definiciones

1.2.1. Patrón

Un patrón se define como una sustancia (en este caso, ácido nucleico) que ha demostrado, a través de una extensa serie de pruebas analíticas, ser un material auténtico y de alta pureza, de una fuente reconocida, meticulosamente preparado, científicamente confirmado, obtenido a partir de materiales clínicos o sintetizados artificialmente y de estado conocido.

1.2.2. Protocolo de prueba normalizado

El protocolo de prueba normalizado designa un procedimiento de prueba validado y aceptado internacionalmente, de conformidad con el *Manual Terrestre* de la OIE.

1.2.3. Patrón de referencia internacional

El término «patrón de referencia internacional» es sinónimo de patrón de referencia primario. Representa el patrón con el que se comparan y calibran todos los demás.

1.2.4. Patrones de referencia secundarios

Los patrones secundarios se preparan por comparación directa con el patrón de referencia internacional y deben ofrecer prestaciones similares a las del patrón primario cuando se utilizan en el protocolo de prueba normalizado. Por lo general, un laboratorio de referencia nacional se encarga de preparar el patrón secundario para su distribución y uso por los laboratorios nacionales o locales designados. En ese caso, el patrón secundario se denomina patrón nacional o local.

1.2.5. Patrones de trabajo o internos

Los patrones de trabajo o internos pueden ser sinónimos de los patrones secundarios o bien patrones terciarios calibrados con respecto al patrón secundario. Los patrones de trabajo se definen como un material debidamente caracterizado a partir de un lote del patrón de referencia primario para apoyar las pruebas de rutina de los lotes con fines de control de

calidad en los ensayos biológicos de PCR. Se calibran siempre con respecto al patrón de referencia primaria o el patrón de referencia oficial y deben estar disponibles en cantidad suficiente para su uso por los laboratorios de diagnóstico con objeto de estandarizar las pruebas de rutina diarias.

1.3. **Ámbito de aplicación**

Los patrones de referencia desempeñan un papel fundamental en la calibración y confirmación de la validez de la prueba, así como en el control de calidad de las conclusiones obtenidas a partir de los datos analizados, y son factores clave para garantizar la continuidad de la prueba, la calidad de los resultados, la estabilidad de los reactivos y la comparabilidad entre experimentos. En los análisis de control de calidad, es esencial establecer y utilizar patrones de referencia a fin de garantizar el grado de exactitud de los resultados y supervisar el funcionamiento del ensayo.

Los patrones de referencia internacional están destinados normalmente a utilizarse en laboratorios de referencia internacional, nacional u otros para la calibración de los ensayos normalizados y como modelos para la producción de patrones secundarios; mientras que los patrones secundarios o de trabajo, mas no el patrón internacional, se utilizan diariamente para estandarizar las pruebas. Los patrones de referencia internacional son necesarios para garantizar que un determinado ensayo de PCR pueda medir la presencia del ácido nucleico diana a un nivel especificado de sensibilidad diagnóstica. La sensibilidad diagnóstica se refiere al riesgo de que se produzca una reacción falso-negativa en el ensayo de PCR cuando en realidad el animal está infectado.

La importancia de los patrones de referencia es tal que se precisa establecer los protocolos adecuados para su producción y cualificación a fin de que sean bien caracterizados, cualificados y estables. La selección y caracterización de los patrones de referencia se realizará en un Laboratorio de referencia designado, el cual utilizará un procedimiento operativo normalizado aceptado internacionalmente y reactivos aceptados internacionalmente. Para la mayor parte de los ensayos, deben establecerse tres patrones de referencia primarios:

- Un patrón fuertemente positivo con un número de copias diana que rebase al menos 10 000 veces el límite de detección del ensayo específico de PCR (véase el Capítulo 3.6.3 *Desarrollo y optimización de las pruebas de detección de ácido nucleico* del *Manual Terrestre* de la OIE),
- Un patrón débilmente positivo con un número de copias diana que rebase al menos 50 veces el límite de detección del ensayo, que se podrá generar mediante una dilución definida del control fuertemente positivo. El patrón débilmente positivo es indispensable para garantizar la sensibilidad diagnóstica de la prueba.
- En las metodologías semicuantitativas (por ejemplo, PCR en tiempo real con transcriptasa inversa [RT-PCR]), el patrón fuertemente positivo podría emplearse para producir una serie de diluciones con un número conocido de copias de la secuencia diana, que podría utilizarse como curva de calibración. Para los ensayos no cuantitativos y cuantitativos (por ejemplo, RT-PCR convencional), el patrón de referencia débilmente positivo podrá ser el único patrón positivo requerido.
- Un patrón negativo que contenga un elevado número de copias diana irrelevante.

1.4. **Metodología**

Por lo general, la metodología para la creación y uso de los patrones es específica del tipo de material estándar. También se podrán aceptar otras metodologías distintas de la propuesta en este documento, que no constituye un marco reglamentario obligatorio, sino que facilita orientaciones que ilustran cómo se cualifican los nuevos patrones y los desafíos de su mantenimiento. Los Laboratorios de referencia de la OIE que producen un patrón internacional deben ponerse en contacto con otros Laboratorios de referencia de la OIE, en particular con aquellos designados para la misma enfermedad, con objeto de organizar un sistema interlaboratorios que permita alcanzar una mayor coherencia en los resultados de los laboratorios participantes. La realización de una prueba de aptitud aportaría más valor al patrón internacional, garantizaría la armonización

entre los laboratorios, fomentaría la creación de redes y fortalecería la cooperación entre los Centros de referencia de la OIE.

A continuación, se proponen algunas pautas de orientación para determinar las especificaciones de un patrón adecuado:

- Definir un programa de cualificación bien diseñado que incluya una estrategia de caracterización correcta;
- Reducir el número de patrones de referencia en circulación;
- Garantizar su disponibilidad permanente;
- Potenciar su implantación facilitando su acceso a todos los grupos que los necesitan;
- Recolectar y comparar datos científicos para garantizar su coherencia, conformidad y exactitud;
- Compilar y recabar datos históricos sobre el periodo de vigencia, conservación y expiración de los patrones;
- Considerar los casos en que se tendrá que cualificar y asignar un nuevo patrón de referencia estándar.

2. Selección del material que se utilizará como patrón

2.1. Criterios para la selección del material estándar

Seleccionar el tipo de material que se utilizará como patrón tal vez sea el paso más crítico durante la preparación. Algunos ensayos de PCR nucleico utilizan material de diagnóstico obtenido directamente de un caso sospechoso; mientras que el mismo u otros ensayos se pueden aplicar después del cultivo/multiplicación preliminar *in vivo* o *in vitro* del agente infeccioso.

Sin embargo, han de tenerse en cuenta varios aspectos en la preparación de los patrones de referencia primaria.

2.1.1. Idoneidad del material

Según la finalidad de la prueba, la fuente original para la preparación del patrón requiere una evaluación rigurosa del valor “real” del material o al menos una determinación y justificación estadística de su valor exacto.

2.1.2. Especificidad del material

El patrón debe ser representativo de los posibles blancos de la prueba, incluidas todas las variaciones conocidas y combinaciones de situaciones hipotéticas previstas para el proceso.

2.1.3. Elementos constitutivos del material

La muestra original y la muestra elegida para el ensayo deben ser similares. El requisito de poseer los mismos atributos, incluidas las impurezas, que el material clínico que se va a analizar es de suma importancia para la preparación de los patrones de referencia primarios.

2.1.4. Abundancia de material

La sustitución de los patrones de referencia primarios se llevará a cabo el número mínimo de veces estrictamente necesario, ya que elegir un patrón sustituto exige considerables esfuerzos de análisis y una copiosa cantidad de datos. Así que se recomienda encarecidamente considerar la posibilidad de usar una fuente capaz de suministrar los patrones a todos los posibles usuarios durante un periodo de tiempo prolongado.

2.2. Tipos de material

Dependiendo del ensayo de PCR, se necesitarán controles de ADN o de ARN. Dada su fragilidad, para la distribución de los patrones de ARN “desnudo”, se requieren condiciones de transporte más complejas (por ejemplo, hielo seco, etc.) que para el ADN.

La preparación de controles mediante extracción de ácidos nucleicos directamente a partir de un agente infeccioso ofrece una mayor similitud con la mayor parte de muestras clínicas. Sin embargo, no se recomienda este procedimiento debido a los riesgos de infectividad residual y a la falta de enumeración normalizada de dianas basada en las copias.

A efectos de la distribución, se considera estable el ADN del plásmido recombinante solubilizado en una matriz de patrón de referencia negativo, o la solución tampón más apropiada.

Los controles para los ensayos moleculares que implican la RT-PCR deben estar basados en el ARN, ya que también permite controlar la etapa de transcripción inversa. Aunque no se use con la misma frecuencia que el ADN recombinante, también es posible obtener ARN para el control del ensayo RT-PCR mediante la transcripción *in vitro* de plásmidos de ADN que contienen secuencias específicas del promotor.

Empaquetar el ADN o ARN de control estándar en un envoltorio rígido (llamado blindaje) aumenta significativamente la estabilidad, especialmente en el caso del ARN. En comparación con los controles de ADN/ARN “desnudos”, los controles de ácido nucleico blindado tienen la ventaja adicional de permitir analizar la eficacia de la parte de extracción del ácido nucleico del SOP. No obstante, el uso de dichos controles blindados (por ejemplo, bacteriófagos recombinantes) tal vez sea limitado debido a su eventual condición de OMG.

2.3. Constitución de los patrones

El primer paso en la preparación de los patrones de referencia internacional es seleccionar el stock negativo a partir de una sola fuente o de un grupo de muestras de animales que nunca han estado expuestos al organismo en cuestión ni han sido vacunados. Este material debe ser examinado cuidadosamente para asegurarse de que no haya indicios de reacción cruzada u otros factores no específicos que puedan interferir con la prueba, pese a que muestre un intervalo admisible de actividad de fondo representativa de la mayoría de las muestras negativas. Para los patrones de referencia internacional, sería conveniente utilizar un grupo de muestras negativas a fin de minimizar las particularidades de una sola muestra.

El segundo paso consiste en seleccionar el material positivo para preparar tanto los patrones de referencia fuerte como aquellos de referencia débil. Al igual que en el caso anterior, dado que hay una serie de factores que pueden influir en las consecuencias de una infección, o tan solo en la respuesta al fenómeno en estudio, sería conveniente utilizar un grupo de muestras suficientemente representativo de la diversidad de los casos positivos. Si el material positivo se obtiene en condiciones experimentales, se debe confirmar que sean lo más similares posibles al curso natural de los eventos para evitar desviaciones en la calibración de la prueba y en la interpretación de los resultados positivos.

2.3.1. Patrones de referencia negativos

El patrón de referencia negativo debe derivar de una muestra o conjunto de muestras similar con una actividad de fondo normal o, al menos incluir ácido nucleico preparado del mismo modo que para el patrón positivo pero derivado de una secuencia diana irrelevante. Debe estar libre de sustancias potencialmente inhibitorias que puedan inducir a error en la interpretación del resultado negativo, presentar una reacción cruzada artificial o interferir con el ensayo estándar de modo distinto al material del patrón positivo.

2.3.2. Patrones de referencia positivos

Los patrones de referencia positivos deben basarse en un aislado de referencia del agente infeccioso seleccionado que será detectado por el ensayo molecular, ya sea derivado de una muestra o conjunto de muestras similar, o un producto recombinante que caracterice la secuencia diana. Los aislados seleccionados deben ser representativos del grupo de agentes diana del ensayo. De preferencia debe conocerse la secuencia completa de nucleótidos del aislado seleccionado, pero se requiere al menos la secuencia de la región objetivo.

La mayor parte de los patrones de referencia deben ser preparados a partir de una sola dilución de la matriz estándar negativa para generar una actividad comparable a la del material de terreno evaluado, la reacción resultante nunca debe ser ambigua. Sin embargo, para algunas aplicaciones específicas de la PCR, es conveniente que el patrón de referencia positivo esté libre de otros ácidos nucleicos que puedan inducir una reacción cruzada o interferir de algún otro modo con el ensayo estándar.

La actividad de los patrones de referencia positivos debe definirse por medio de puntos específicos en la porción lineal de la curva de respuesta a la dosis del blanco.

2.3.2.1. Patrón de referencia débilmente positivo

La positividad fuerte debe representar la actividad a medio camino entre los puntos superior y central de la porción lineal de la curva de respuesta a la dosis

2.3.2.2. Patrón de referencia débilmente positivo

La positividad débil debe representar la actividad a medio camino entre los puntos central e inferior de la porción lineal de la curva de respuesta a la dosis. El patrón de referencia débilmente positivo debe arrojar resultados positivos justo por encima del umbral positivo/negativo en el protocolo de ensayo normalizado.

2.4. Seguridad

Los patrones de referencia se deben preparar de modo que estén libres de material infeccioso. Para facilitar su transporte internacional, es conveniente tratar los patrones en estado húmedo con un método validado para inactivar la infectividad residual al tiempo que conservar la reactividad en el ensayo. Por ejemplo, el método validado de extracción de ácido nucleico usando fenol/cloroformo u otros métodos a base de sales caotrópicas y calentamiento. Después del tratamiento, las muestras se deben someter a pruebas de inocuidad apropiadas, según se describe en el Capítulo 1.1.9 *Pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario* del *Manual Terrestre*, para asegurarse de que estén libres de agentes vivos detectables.

3. Uso de los patrones de referencia internacional

3.1. Preparación

Un patrón de referencia internacional no debe requerir ninguna manipulación especial (por ejemplo, predilución) por parte del laboratorio receptor antes de su utilizarse en el ensayo en cuestión. Por consiguiente, los patrones de referencia positivos deben prepararse en lo posible a partir de materiales que muestren el nivel de reactividad deseado sin necesidad de nueva dilución.

Sin embargo, para preparar los patrones de referencia secundarios y de trabajo, será necesario que el laboratorio efectúe diluciones a partir del material del patrón de referencia internacional con objeto de obtener el nivel de reactividad deseado, según se especifica en los puntos 2.3.1 y 2.3.2, para los patrones de referencia negativo y positivo (fuerte y débil), respectivamente. Sería conveniente suministrar el diluyente estéril para la reconstitución del material, junto con el patrón liofilizado.

Antes de utilizarlos como controles reales de las pruebas de rutina, los patrones deben ponerse a prueba, como se haría con cualquier muestra de terreno o cultivo, en condiciones de diagnóstico de rutina (incluyendo los pasos de extracción y dilución que forman parte normal del procedimiento de ensayo). De este modo se confirmará que la cantidad de ácido nucleico diana en los patrones de referencia son específicos y sensibles dentro de los límites de detección exacta de la prueba de diagnóstico.

3.2. Control de calidad de los patrones

Lo ideal sería empezar con un solo stock del material de referencia original en cantidad suficiente para un periodo de 5 años. Este stock se puede mantener congelado (de preferencia a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ o a una temperatura inferior) en alícuotas, de manera que cada lote pueda utilizarse como suministro para un mínimo de 500 pruebas.

Después de la producción, varias unidades del patrón se deberán reconstituir y reevaluar a lo largo del tiempo. Para el control de calidad de los patrones a efectos de los ensayos cuantitativos, es necesario recalcular el número de dianas sobre la base de las copias. Si existiese una posibilidad de deterioro de actividad con el tiempo, se deberá indicar esta información.

Para cada lote, ya sea congelado o liofilizado, se deben establecer las referencias para demostrar su idoneidad y valor "real".

3.2.1. Referencias del lote

- Una descripción completa de la fuente, la fecha de preparación, el proceso de fabricación y análisis para la caracterización (sensibilidad/especificidad).
- Una proyección de la curva para cuantificar la resistencia de la actividad.

3.2.2. Estabilidad del lote

- Deben realizarse pruebas periódicas de cada alícuota descongelada del material durante la vida útil prevista del lote.
- Una demostración de los eventuales efectos de la liofilización, o de cualquier otro proceso realizado para la conservación del lote, sobre la calidad biológica del patrón.
- Se recopilarán los datos de las diferentes condiciones usadas para el proceso estándar o, si se utiliza un nuevo proceso estándar con estos patrones.
- Se recopilarán los datos del deterioro natural de la actividad o de otros factores que puedan inducir una degradación del material.

3.2.3. Fichas técnicas

Cada lote de patrones de referencia debe acompañarse de una hoja de información con datos sobre la potencia, las características de rendimiento y los aspectos operativos:

- i) La ficha técnica debe recoger la información de identificación completa especificada en la etiqueta, además del número del lote y la fecha de producción;
- ii) La descripción del agente infeccioso del donante utilizado para la preparación del patrón, incluyendo la fuente, la cepa, el origen y el número de registro de su secuencia genómica en una base de datos pública;
- iii) Una advertencia que indique que una manipulación inadecuada del patrón marcadamente positivo podría causar una contaminación cruzada de las muestras;
- iv) Los detalles del protocolo de producción del patrón, es decir, la designación y origen del plásmido, el hospedador de la bacteria, los métodos de purificación, la transcripción del ARN (si procede), etc.;
- v) La descripción del envoltorio proteico si el ADN/ARN está blindado;

- vi) Las pruebas de referencia usadas en la selección de los candidatos a patrón de referencia negativa, por ejemplo, PCR convencional o en tiempo real (RT);
- vii) Una muestra de los perfiles de valoración del ácido nucleico diana en un esquema basado en las copias y los criterios de selección de las diluciones apropiadas de actividad definida para diferentes tipos de ensayo (por ejemplo, PCR convencional frente a PCR en tiempo real);
- viii) La presencia de ácidos nucleicos heterólogos si se conoce y las pruebas de detección utilizadas;
- ix) Pormenores de los análisis de inocuidad llevados a cabo en los materiales;
- x) Una declaración de que el patrón está destinado para su uso *in vitro* exclusivamente;
- xi) La descripción de los métodos de esterilización, incluyendo el tipo de irradiación y dosis y la condición de la muestra en el momento de la esterilización (por ejemplo, líquida, congelada, liofilizada, etc.);
- xii) El número del lote y la fecha de producción;
- xiii) La reconstitución recomendada (tipo de fluido reconstituyente y volumen), las condiciones de manipulación y almacenamiento;
- xiv) La dirección de contacto completa, fax, correo electrónico del Laboratorio de referencia como fuente de más información.

3.3. Almacenamiento

Todos los materiales deben almacenarse congelados o refrigerados. Los stocks liofilizados deben almacenarse a 4 °C, aunque unos breves periodos a temperatura ambiente (por ejemplo, durante el transporte) no deben ser perjudiciales. La solución alternativa recomendada es almacenar los patrones en criotubos a -78 °C. Para el almacenamiento a largo plazo, se utilizarán de preferencia ampollas de vidrio selladas, en vez de tapones de caucho.

Deben evitarse ciclos repetidos de congelación-descongelación, esta advertencia es particularmente pertinente para los patrones de ARN “desnudos”, de manera que los patrones de referencia siempre deben conservarse en alícuotas y almacenarse para preservar su homogeneidad y estabilidad a lo largo del tiempo. Se recomienda firmemente utilizar un patrón de trabajo para las pruebas de rutina a fin de limitar el uso del patrón primario. Es conveniente, en lo posible, que las alícuotas de un solo uso se utilicen de inmediato y después se descarten.

3.4. Etiquetado y notificación

Los Laboratorios de referencia de la OIE que produzcan patrones de referencia internacional para ensayos de PCR deben asegurarse de que todas las alícuotas estén convenientemente identificadas y que se acompañen de una ficha técnica apropiada. Debe explicarse claramente a los laboratorios solicitantes que los patrones de referencia internacional están destinados a utilizarse en la calibración de su propio ensayo y para el fomento de la armonización internacional.

La etiqueta debe contener al menos la siguiente información: el logotipo de la OIE; patrón de referencia internacional de la OIE para (prueba) (enfermedad), indicación de si es fuertemente positivo, débilmente positivo o negativo, el nombre del Laboratorio de referencia, el método de reconstitución y las condiciones de almacenamiento. En el caso de los patrones para ensayos cuantitativos: números/volumen de copias diana. El espacio libre en la etiqueta no siempre será suficiente para incluir todos estos datos, se podrán usar abreviaturas, y tal vez sea necesario que algunos de los datos figuren en la ficha técnica en vez de en la etiqueta.

A fin de que un laboratorio de diagnóstico prepare un patrón de referencia secundario para uso propio, será necesario que el Laboratorio de referencia de la OIE suministre datos específicos sobre la selección y la preparación de los patrones de referencia primarios.

4. Aprobación de los patrones de referencia de la OIE

No se podrá emitir un patrón de referencia internacional con el nombre de la OIE a menos que haya sido validado por la Comisión de Normas Biológicas de la OIE actuando bajo la autoridad de la Asamblea Mundial de Delegados.

Se deben presentar a la OIE los datos técnicos y estadísticos completos sobre la evaluación de los patrones de referencia candidatos, junto con la información completa de la ficha técnica según se indica más arriba. La Comisión de Normas Biológicas revisará la información. Si la Comisión de Normas Biológicas lo aprueba, el patrón de referencia se añadirá a la lista de patrones de referencia internacional disponibles. Esta lista se proporcionará a todos los Países Miembros de la OIE que la soliciten, además se podrá consultar en el sitio web de la OIE (<http://www.oie.int>).

5. Bibliografía

FRYER J.F., BAYLIS S.A., GOTTLIEB A.L., FERGUSON M., VINCINI G.A., BEVAN V.M., CARMAN W.F. & MINOR P.D. (2008). Development of working reference materials for clinical virology. *J. Clin. Virol.*, **43**, 367–371.

GADKAR VY & FILION M. (2014). New Developments in Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction Technology. *Curr. Issues Mol. Biol.*, **16**, 1–6. Epub 2013 Apr 8. Review. PubMed PMID: 23562919.

LIN G., ZHANG K., ZHANG D., HAN Y., XIE J. & LI J. (2017). Fast preparation of a long chimeric armored RNA as controls for external quality assessment for molecular detection of Zika virus. *Clin. Chim. Acta*, **466**, 138–144. doi: 10.1016/j.cca.2017.01.023. Epub 2017 Jan 19. PubMed PMID: 28111270.

PASLOSKE B.L., WALKERPEACH C.R., OBERMOELLER R.D., WINKLER M. & DUBOIS D.B. (1998). Armored RNA technology for production of ribonuclease-resistant viral RNA controls and standards. *J. Clin. Virol.*, **36**, 3590-3594.

STEVENSON J., HYMAS W. & HILLYARD D. (2008). The use of Armored RNA as a multi-purpose internal control for RT-PCR. *J. Clin. Virol.*, **150**, 73-76.

VILLANOVA G.V., GARDIOL D., TABORDA M.A., REGGIARDO V., TANNO H., RIVADENEIRA E.D., PEREZ G.R. & GIRI A.A. (2007). Strategic approach to produce low-cost, efficient, and stable competitive internal controls for detection of RNA viruses by use of reverse transcription-PCR. *J. Clin. Virol.*, **45**, 3555-3563.

