

PROPUESTA DE SISTEMÁTICA DE VALIDACIÓN INTRALABORATORIO DE LA TÉCNICA DE FIJACIÓN DE COMPLEMENTO PARA EL DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS EN LABORATORIOS DE SANIDAD ANIMAL

C. de la Cruz Remón¹ y J. Laso Sánchez¹

¹ Departamento de Calidad, Gabinete de Servicios para la Calidad S.A.L., C/ Caridad 32, 28007 Madrid; e-mail: gscsal@gscsal.com

RESUMEN. La exigencia de acreditación (ISO 17025) de los laboratorios de sanidad animal que realizan las pruebas diagnósticas de fijación de complemento frente a brucelosis ha supuesto la necesidad de realizar la validación intralaboratorio para verificar su adecuación al fin previsto. En este artículo se presenta una propuesta de sistemática de validación

1.- Introducción

En fechas recientes la técnica de fijación de complemento para la detección de anticuerpos frente a especies de género *Brucella* es una de las técnicas aprobadas en el capítulo 2.3.1. del manual de la OIE.

En fechas recientes la necesidad de acreditación de los laboratorios de ensayo que realizan las pruebas diagnósticas de las enfermedades sometidas a control oficial ha planteado la necesidad de realizar una validación del método de ensayo que permita la comprobación de la adecuación del ensayo al fin previsto y su correcta implantación en el laboratorio. Este método, al estar recogido en los documentos oficiales de la OIE, así como en las diferentes legislaciones europeas y de cada estado miembro, se puede considerar como un método normalizado o más exactamente como reglamentado. No debemos olvidar que la legislación española dispone que estas pruebas diagnósticas se realicen únicamente por laboratorios oficialmente autorizados según RD2611/1996 por las autoridades competentes.

Por tanto y de acuerdo con la norma ISO 17025 un laboratorio no debe afrontar la validación de estos métodos como una validación inicial del mismo que ya ha sido realizada, siendo esta tarea propia de los laboratorios de referencia tanto nacionales, europeos, etc. Sin embargo, el laboratorio debe comprobar la correcta realización del método en sus instalaciones, con su personal, reactivos y equipos y la obtención de resultados satisfactorios que le permitan establecer criterios para el control de calidad del método.

2.- Descripción de la técnica de fijación de complemento

La técnica de fijación de complemento detecta la presencia de anticuerpos frente a *Brucella* presentes en el suero sanguíneo mediante la capacidad del complemento de unirse en la reacción antígeno-anticuerpo.

Para evitar la presencia de complemento libre en el suero problema se somete a un calentamiento $60\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos que destruye dicho complemento.

Se realiza una primera incubación del suero problema adicionado de antígeno (estandarizado) y de complemento (también estandarizado). Si el suero problema presenta anticuerpos frente a *Brucella* se realizará la unión con el antígeno adicionado y con el complemento.

En una segunda fase se adiciona la mezcla hemolítica constituida por una suspensión de eritrocitos de carnero sensibilizados con hemolisina (estandarizada).

La hemolisina son anticuerpos frente a los eritrocitos de carnero obtenidos en cobaya, y que al mezclarse con los eritrocitos, se unen a la membrana eritrocitaria. Cuando dicha mezcla hemolítica se adiciona a la primera fase del método, si el complemento se encuentra fijado en la unión antígeno (*brucella*) anticuerpo (suero), los eritrocitos de la mezcla hemolítica se sedimentan en el fondo de la microplaca donde se realiza el ensayo.

Si por el contrario el suero problema no contiene anticuerpos frente a *Brucella*, el complemento adicionado en la reacción se encuentra libre y se une a los eritrocitos sensibilizados (mezcla hemolítica) y se produce la rotura de la membrana eritrocitaria (hemólisis) que se traduce en la dilución de la hemoglobina en el contenido del pocillo de la microplaca. Ver figura 1.

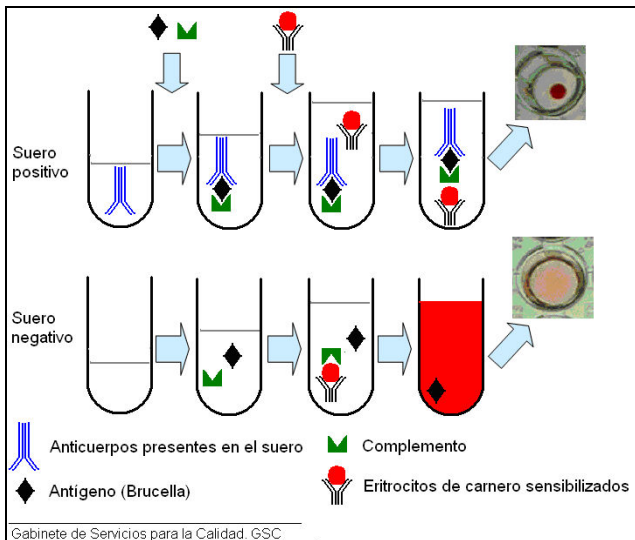


Fig. 1. Técnica de fijación de complemento

La estandarización de la técnica de fijación de complemento se realiza mediante el empleo de sueros titulados frente al estándar internacional de 1000 UI FC (OIEISS). Las diluciones empleadas en esta técnica se realizan en base dos, titulándose desde la dilución $\frac{1}{2}$ a $\frac{1}{128}$ en la mayoría de los laboratorios de sanidad animal españoles. El manual de la OIE calcula el título en UI de la muestra frente al título del suero estándar de 1000 UI FC, siendo en la práctica este último el equivalente a la dilución $\frac{1}{200}$. Los diferentes laboratorios de sanidad animal no disponen de dicho suero para su práctica diaria, empleando en su lugar, sueros titulados frente a los proporcionados por el laboratorio nacional de referencia, estableciéndose así una cadena de trazabilidad.

La transformación de la dilución de un suero problema a su correspondiente título expresado en UI FC se realiza con la tabla 1.

Tabla 1. Transformación de dilución de suero problema

Dilución	Título
$\frac{1}{2}$	10 UI
$\frac{1}{4}$	20 UI
$\frac{1}{8}$	40 UI
$\frac{1}{16}$	80 UI
$\frac{1}{32}$	160 UI
$\frac{1}{64}$	320 UI
$\frac{1}{128}$	640 UI

Algunos laboratorios realizan una lectura intermedia dentro de una misma dilución en función del grado de hemólisis presente en el pocillo de la microplaca (+, ++, +++ y ++++) correspondiendo la titulación en la tabla 1 a la columna de ++.

Generalmente se admite entre los laboratorios una desviación de un título (± 1 dilución) frente al proporcionado por el laboratorio nacional de referencia, y de igual manera, cuando un mismo suero se titula en días diferentes se le admite la misma tolerancia. Este planteamiento avala la idea de que la utilización de una escala de ++++ puede presentar dificultades de repetibilidad.

Este método, debido a sus características, se debe considerar como un método semicuantitativo, ya que no proporciona resultados de forma continua sino discreta, en intervalos.

3.- Validación de la técnica

Los laboratorios pueden enfocar la validación de este método desde dos puntos de vista, como un método cualitativo o con un planteamiento de un método cuantitativo, siendo necesario en ambos casos presentar una sistemática y unos criterios de aceptación y rechazo.

Para ambos enfoques, el laboratorio debe disponer de muestras con un valor de referencia proporcionado por el distribuidor de dicho material (laboratorios nacionales de referencia LNR), a través de las muestras de los ensayos de aptitud organizados por el LNR, o mediante la confirmación del título de muestras de rutina enviadas al LNR. Una cuarta posibilidad es la dilución de un suero patrón suministrado por el LNR con un suero confirmado negativo (blanco). No obstante en el ámbito de la Sanidad Animal la labor de los LNR, promoviendo ensayos de aptitud anuales en los que se intercambia un gran número de sueros en cada ensayo ha dotado a los laboratorios de un gran número de datos que deberían poder ser utilizados para la validación.

El enfoque cualitativo se basa en comprobar el número de aciertos (máximo un título de variación frente al de referencia) que el laboratorio obtiene frente al número de ensayos realizados. En esta propuesta se fija que el porcentaje de aciertos debería ser $\geq 95\%$, por tanto el número de muestras que debe manejar el laboratorio debe ser de al menos de 20.

El tratamiento de los datos con un enfoque cuantitativo necesita la transformación de los resultados en logaritmo decimal (UI FC) para su posterior tratamiento bajo estadística de tipo Gaussiano. Esto es debido a que los intervalos se obtienen por dilución 2 y los títulos varían proporcionalmente como $2x$ y no de manera sumativa.

Para la obtención de los criterios de aceptación podemos suponer que si consideramos una variación de ± 1 título aceptable, estamos aceptando un intervalo $(\frac{T}{2} \leftarrow T \rightarrow 2T)$, que transformando en logaritmo es $(\text{Log}(T) - \text{Log}(2) \leftarrow \text{Log}(T) \rightarrow \text{Log}(T) + \text{Log}(2))$.

Si consideramos que esto sigue una distribución Gaussiana y que situamos los límites al 95% a $2S_R$; $\text{Log}(2) = 2 * S_R$, por tanto $S_R = 0,150$ expresado en $\text{Log}(UI FC)$. Si consideramos que el intervalo es la máxima variación permisible, la distribución de los resultados dentro del intervalo sigue una distribución de tipo rectangular, el límite de S_R se podría estimar en:

$$S_R = \frac{\text{Log}(2)}{\sqrt{3}} = 0,173 \quad (1)$$

El valor experimental que obtendremos de la desviación estándar de reproducibilidad se comparará con el obtenido teóricamente para comprobar la adecuación del método.

El criterio del sesgo proviene de la suposición de la máxima variabilidad S_R , y nuestro número de repeticiones n , en general 10. Según:

$$Sesgo = \frac{2S_R}{\sqrt{10}} = 0,095 \quad (2)$$

Por lo tanto la propuesta de criterios es:

$$S_R \leq 0,15 \text{ ó } 0,17 \quad (3)$$

$$Sesgo \leq 0,1 \text{ (recomendado)}$$

El laboratorio deberá obtener sus valores según un modelo de validación de pares de valores ya empleado en microbiología (J. Laso, 2005) o de otras sistemáticas.

Los datos anteriores calculados teóricamente se confirman experimentalmente a través de los resultados de un ensayo de aptitud organizado por el LNR (Laboratorio de Sanidad y Producción Animal, Santa Fé). De dicho ensayo se extrajeron los datos de los 20 primeros laboratorios y se calculó el sesgo de cada una de las tres repeticiones que cada laboratorio hace de cada muestra. En esta distribución de 20 muestras, el número de muestras positivas en este ensayo de aptitud fue de 14, por lo tanto, el número de datos empleados para el cálculo de la \bar{d} y de la S_d fue de 840. Los valores obtenidos han sido $\bar{d} = -0,010$ y $S_d = 0,159$. Por tanto el sesgo medio de todos los laboratorios es muy próximo a cero y la dispersión de los resultados es próxima a la calculada como una distribución normal e inferior a la estimada como una distribución rectangular.

Para confirmar que el valor proporcionado por el LNR para cada muestra se pueda considerar como valor de referencia en futuras comprobaciones, se calculó la mediana de los resultados para cada muestra y se confirmó que ambos valores coincidían en las 14 muestras.

En este artículo no se han tenido en cuenta otras pruebas complementarias previas necesarias para demostrar la especificidad de un método que requerirían el empleo de muestras positivas y , sobre todo negativas, ya que entrarían dentro del tratamiento cualitativo de la medida, y la sistemática planteada trata de desarrollar un sistema de tratamiento cuantitativo de los datos.

4.- Obtención de valores del laboratorio por pares de valores

El laboratorio dispone de un conjunto de pares de valores (VR_i, VL_i), correspondientes a diferentes muestras i , donde VR es el valor de referencia y VL el valor obtenido por el laboratorio. Dado que cada pareja es distinta, el indicador de la corrección de nuestro resultado es la cercanía del valor VL_i a cada VR_i . Llamaremos d_i a $d_i = VR_i - VL_i$ (los valores de VL_i y VR_i están expresados como logaritmo decimal del título en UI FC). Si obtenemos la media de las d_i (\bar{d}) obtendremos el sesgo medio de nuestro laboratorio.

Si obtenemos la desviación estándar de las d (S_d), habremos visto como varía nuestro sesgo en condiciones de reproducibilidad (distintos momentos, muestras, analistas, etc.), lo que nos dará la reproducibilidad de nuestro laboratorio (tabla 2).

Tabla 2. Reproducibilidad

V ref	V lab	d
VR ₁	VL ₁	D ₁ =VR ₁ -VL ₁
VR ₂	VL ₂	d ₂ =VR ₂ -VL ₂
⋮	⋮	⋮
VR _n	VL _n	d _n =VR _n -VL _n
$\bar{d} = \frac{\sum d_i}{n} \quad S_d = \sqrt{\frac{\sum (d_i - \bar{d})^2}{n-1}}$		

Estos valores se comparan con los criterios establecidos a priori. NOTA: En el caso de fijación de complemento, al igual que microbiología, es necesario realizar la conversión logarítmica previa de los resultados.

5.- Ejemplo

Los cálculos se deben realizar incluyendo resultados de varios ensayos de aptitud, de varios técnicos, sueros titulados por el LNR, etc. para incorporar el mayor número de variables (reproducibilidad) en esta estimación “caja negra”.

Para el presente ejemplo se han tomado los datos del ensayo de aptitud mencionado anteriormente. Se han extraído los datos de uno de los participantes para mostrar la sistemática que los laboratorios pueden seguir para valorar el método en su laboratorio.

Los datos del laboratorio expresados en UI FC (tabla 3) se transforman en logaritmo (tabla 4).

Tabla 3. Datos del laboratorio expresados en UIFC

Muestra	LNR	E1	E2	E3
1	N	N	N	N
2	80	40	80	40
3	40	40	40	40
4	640	640	640	640
5	40	40	40	40
6	N	N	N	N
7	80	80	80	80
8	160	160	160	160
9	N	N	N	N
10	320	320	320	320
11	320	320	320	320
12	N	N	N	N
13	160	160	320	160
14	80	80	80	80
15	N	N	N	N
16	40	20	40	20
17	640	640	640	640
18	40	40	40	40
19	80	40	80	40
20	N	N	N	N

Tabla 4. Transformación a logaritmo

Muestra	Log LNR	Log E1	Log E2	Log E3
2	1,903	1,602	1,903	1,602
3	1,602	1,602	1,602	1,602
4	2,806	2,806	2,806	2,806
5	1,602	1,602	1,602	1,602
7	1,903	1,903	1,903	1,903
8	2,204	2,204	2,204	2,204
10	2,505	2,505	2,505	2,505
11	2,505	2,505	2,505	2,505
13	2,204	2,204	2,505	2,204
14	1,903	1,903	1,903	1,903
16	1,602	1,301	1,602	1,301
17	2,806	2,806	2,806	2,806
18	1,602	1,602	1,602	1,602
19	1,903	1,602	1,903	1,602

Para cada valor se calcula el sesgo frente al valor de referencia $d = \text{Log}(V_{\text{referencia}}) - \text{Log}(V_{\text{muestra}})$ (Tabla 5).

Tabla 5. Cálculo del sesgo

Muestra	Log(LNR)-Log(E1)	Log(LNR)-Log(E2)	Log(LNR)-Log(E3)
2	0,301	0,000	0,301
3	0,000	0,000	0,000
4	0,000	0,000	0,000
5	0,000	0,000	0,000
7	0,000	0,000	0,000
8	0,000	0,000	0,000
10	0,000	0,000	0,000
11	0,000	0,000	0,000
13	0,000	-0,301	0,000
14	0,000	0,000	0,000
16	0,301	0,000	0,301
17	0,000	0,000	0,000
18	0,000	0,000	0,000
19	0,301	0,000	0,301

De los 42 resultados obtenidos del laboratorio “x” se calcula el sesgo medio ($\bar{d}=0,035$) y su desviación estándar ($S_d=0,119$). Podemos valorar la exactitud relativa del método mediante un test t de student:

$$t_{\text{calc}} = \frac{|\bar{d}|}{S_d / \sqrt{n}} = \frac{0,035}{0,119 / \sqrt{42}} = 1,95 \tag{4}$$

En este laboratorio no existen diferencias significativas ($t_{\text{calculada}}$ es inferior a la $t_{\text{tabulada}}=2,02$). Como además, tanto la \bar{d} como la S_d son inferiores a las calculadas teóricamente para el método, el laboratorio “x” puede considerar que realiza el método de acorde a los criterios de aceptación del método.

Agradecimientos. Agradecemos a los laboratorios de sanidad animal de la Junta de Extremadura y al laboratorio regional de sanidad animal de la Comunidad de Madrid por los datos facilitados para confirmar el planteamiento inicial de la validación. De igual manera al Laboratorio de Sanidad y Producción Animal (Santa Fé, Granada) por los datos de los ensayos de aptitud empleados en el presente artículo.

Bibliografía

J. Laso Sánchez. *Situación de la validación de los ensayos microbiológicos en los laboratorios.* Tercer Congreso Virtual Iberoamericano sobre Gestión de Calidad en Laboratorios. (INTERNET 2005)
 Gabinete de Servicios para la Calidad (GSC). Curso validación de métodos de diagnóstico asociados a laboratorios de sanidad animal. Febrero 2009.