

“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

COMENTARIOS

Con fundamento en el numeral 6.3.3.1 de la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SSA1-2020, se publica el presente proyecto a efecto de que los interesados, a partir del 1º de agosto y hasta el 30 de septiembre de 2024, lo analicen, evalúen y envíen sus observaciones o comentarios en idioma español y con el sustento técnico suficiente ante la CPFEUM, sito en Río Rhin número 57, colonia Cuauhtémoc, código postal 06500, Ciudad de México.

Correo electrónico: consultas@farmacopea.org.mx.

DATOS DEL PROMOVENTE

Nombre: _____
Institución o empresa: _____
Teléfono: _____

Cargo: _____
Dirección: _____
Correo electrónico: _____

NUEVA MONOGRAFÍA

Dice	Debe decir	Justificación*
MPB 0050. AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS		
INTRODUCCIÓN		
La amplificación de ácidos nucleicos se basa en dos enfoques diferentes:		
1. La amplificación de una secuencia de ácido nucleico específica empleando, por ejemplo, la reacción en cadena de polimerasa (PCR), reacción en cadena de Ligasa (LCR), o la amplificación isotérmica de ácido ribonucleico (RNA).		
2. La amplificación de una señal de hibridación empleando, por ejemplo, para ácido desoxirribonucleico (ADN), el método de ADN ramificado (bADN); en este caso la amplificación de la señal se logra sin someter al ácido nucleico a repetidos ciclos de amplificación. En este apartado general el método por PCR es descrito como la técnica de referencia. Pueden emplearse métodos alternativos siempre que		

“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
cumplan con los requisitos de calidad descritos a continuación.		
ALCANCE		
<p>Este apartado establece los requisitos para la preparación de la muestra, amplificación <i>in vitro</i> de las secuencias de ADN y la detección del producto de PCR específico.</p> <p>Con la prueba PCR es posible detectar secuencias de ADN definidas. Las secuencias de RNA también pueden ser detectadas mediante la transcripción reversa del RNA al ADN complementario (cADN) y su posterior amplificación.</p>		
1. FUNDAMENTO DEL MÉTODO		
<p>La PCR es un procedimiento que permite la amplificación específica <i>in vitro</i> de segmentos de ADN y/o ARN después de su transcripción reversa a cADN.</p> <p>Después de la desnaturalización del ADN bicatenario a ADN monocatenario, 2 cebadores de oligonucleótidos sintéticos de polaridad opuesta se hibridan con sus respectivas secuencias complementarias en el ADN que será amplificado. Las regiones bicatenarias cortas formadas como resultado de la hibridación específica de bases entre los cebadores y la secuencia de ADN complementaria flanquean el segmento de ADN a amplificar y funcionan como posiciones de partida para la síntesis de ADN <i>in vitro</i> por medio de una ADN polimerasa termoestable</p>		
La amplificación del ADN ocurre en ciclos que consisten de:		

“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
<ul style="list-style-type: none"> - Desnaturalización por calor del ácido nucleico (secuencia diana) en 2 cadenas individuales; - Hibridación específica de los cebadores con la secuencia diana bajo las condiciones de reacción adecuadas. - Extensión de los cebadores, los cuales están unidos a ambas cadenas individuales mediante una ADN polimerasa a una temperatura óptima (síntesis de ADN). 		
<p>Repetidos ciclos de desnaturalización por calor, hibridación de cebadores y síntesis de ADN resultarán en la amplificación exponencial del segmento de ADN delimitado por los cebadores.</p>		
<p>El producto de PCR específico conocido como amplicón puede detectarse mediante una variedad de métodos de especificidad y sensibilidad apropiadas. Los ensayos de PCR Multiplex emplean diversos pares de cebadores diseñados para la ampliación simultánea de diferentes objetivos en una reacción.</p>		
<p>MATERIAL</p>		
<p>Debido a la alta sensibilidad de la PCR, las muestras deben protegerse de la contaminación externa con secuencias blanco. El muestreo, almacenamiento y transporte del material de ensayo debe realizarse bajo condiciones que minimicen la degradación de la secuencia blanco. En el caso de secuencias diana de ARN, se requieren precauciones especiales ya que el ARN es altamente sensible a la degradación por ribonucleasas. Se debe tener cuidado ya que</p>		

“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
algunos reactivos, como los anticoagulantes o los conservantes, pueden interferir con la prueba.		
5. METODOLOGÍA		
5.1 Prevención de la contaminación		
El riesgo de contaminación requiere de una estricta separación de las áreas de acuerdo al material utilizado y la tecnología empleada. Los puntos a considerar incluyen el movimiento del personal, la indumentaria, el flujo de materiales y el suministro de aire y los procedimientos para la descontaminación.		
El sistema debe subdividirse en secciones tales como:		
<ul style="list-style-type: none"> • Área de mezcla maestra o master-mix (área donde se maneja exclusivamente material sin secuencia blanco, por ejemplo, cebadores, tampones, etc.); • Área pre-PCR (área donde se manipulan reactivos, muestras y controles); • Área de amplificación por PCR (el material amplificado se maneja en un sistema cerrado); • Área de detección post-PCR (única área donde el material amplificado se maneja en un sistema abierto). 		
Si se utilizan sistemas cerrados, no es necesaria la separación estricta de las áreas.		
5.2. Preparación de la muestra		
Al preparar las muestras, la secuencia diana que se va a amplificar debe extraerse o liberarse del material de ensayo de forma eficaz y reproducible,		

“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>de tal modo que sea posible la amplificación bajo las condiciones de reacción seleccionadas. Pueden emplearse diversos procedimientos físico-químicos de extracción y/o procedimientos de enriquecimiento de ácidos nucleicos.</p>		
<p>Los aditivos presentes en el material del ensayo pueden interferir con la PCR. Los procedimientos descritos en el apartado 7.3.2. deben usarse como control de la presencia de inhibidores provenientes del material del ensayo.</p>		
<p>En el caso de las secuencias blanco de ARN, se debe tener cuidado para evitar la actividad de las ribonucleasas.</p>		
<p>5.3. Amplificación</p>		
<p>La amplificación por PCR de la secuencia diana se realiza en condiciones cíclicas definidas (el perfil de temperatura para la desnaturalización del ADN bicatenario, la hibridación y extensión de los cebadores; los tiempos de incubación a las temperaturas seleccionadas; las velocidades de calentamiento y/o enfriamiento). Estos dependen de varios parámetros tales como:</p>		
<ul style="list-style-type: none"> • La longitud y la composición de bases de los cebadores y las secuencias diana; • El tipo de ADN polimerasa, la composición de la solución amortiguadora y el volumen de reacción empleados para la amplificación; • El tipo de termociclador utilizado y la tasa de conductividad térmica entre el aparato, el tubo de reacción y el fluido de reacción. 		

“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>5.4. Detección</p>		
<p>El amplicón generado por PCR puede identificarse a través de su tamaño, secuencia, modificación química o la combinación de estos parámetros. La detección y caracterización por tamaño puede lograrse mediante electroforesis en gel (utilizando geles de agarosa o poliacrilamida o por electroforesis capilar) o por cromatografía en columna (por ejemplo, cromatografía líquida). La detección y caracterización de la secuencia, puede lograrse mediante la hibridación específica de los productos de PCR con sondas que cuentan con una secuencia complementaria a la secuencia diana o mediante la escisión del material amplificado utilizando enzimas de restricción específicas. La detección y caracterización por modificación química puede lograrse, por ejemplo, mediante la incorporación de un fluoróforo en los amplicones y la posterior detección de fluorescencia</p>		
<p>La detección de amplicones también se puede lograr mediante el uso de sondas marcadas para permitir la detección quimioluminiscente, radioisotópica o inmunoenzimática acoplada.</p>		
<p>6. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS</p>		
<p>El resultado de la prueba de PCR es válido sólo si los controles positivos son inequívocamente positivos y los controles negativos son inequívocamente negativos. Debido a la alta sensibilidad del método PCR y al riesgo inherente</p>		

“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>de contaminación, es necesario confirmar los resultados positivos repitiendo el procedimiento de prueba completo por duplicado, cuando sea posible en una nueva alícuota de la muestra. La muestra se considera positiva si al menos una de las réplicas arroja un resultado positivo. Tan pronto como se defina un umbral medible, se requerirá de un sistema de prueba cuantitativo</p>		
<p>7. CONTROL DE CALIDAD</p>		
<p>7.1. Validación del ensayo por PCR</p>		
<p>El programa de validación debe incluir la validación de la instrumentación y del método PCR empleado. Debe hacer referencia a la guía ICH Q2(R1) Validación de procedimientos analíticos: texto y metodología ó a la guía de validación de métodos de la USP.</p>		
<p>Si existiese disponibilidad, se recomienda utilizar las preparaciones de estándares de referencia oficiales o las preparaciones de estándares de referencia internos calibrados con estándares internacionales para las secuencias blanco.</p>		
<p>7.1.1. Determinación del punto de corte positivo</p>		
<p>Durante la validación de las pruebas cualitativas, se debe determinar el punto de corte positivo. El punto de corte positivo se define como el número mínimo de secuencias objetivo por volumen de muestra que pueden ser detectadas en el 95 % de las pruebas. El punto de corte positivo depende de factores interrelacionados como el volumen de la muestra extraída y la eficacia de la metodología de extracción, la transcripción del ARN diana en</p>		

“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
cADN, el proceso de amplificación y el método de detección.		
Para definir el límite de detección, debe hacerse la referencia al punto de corte positivo para cada secuencia diana y el rendimiento de la prueba por encima y por debajo del punto de corte positivo.		
7.1.2. Sistemas de ensayo cuantitativo		
Para un ensayo cuantitativo, los siguientes parámetros son determinados durante la validación: exactitud, precisión, especificidad, límite de cuantificación, linealidad, rango y robustez.		
7.2. Control de calidad de los reactivos		
Todos los reactivos indispensables para la metodología deben estar controlados. Su utilización o retiro se basa en los criterios de calidad predefinidos.		
Los cebadores son un componente indispensable del ensayo por PCR, así como su diseño, pureza, por lo que la validación de su uso en un ensayo por PCR requiere de una cuidadosa atención. Los cebadores pueden ser modificados (por ejemplo, por la conjugación con un fluoróforo o un antígeno) con el objetivo de obtener un método específico para la detección del amplicón, siempre que tales modificaciones no inhiban la amplificación precisa y eficiente de la secuencia objetivo.		
7.3. EJECUCIÓN DE CONTROLES		
7.3.1. Controles externos		
Para minimizar el riesgo de contaminación y asegurar una sensibilidad adecuada, se incluyen		

“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>los siguientes controles externos en cada ensayo PCR:</p>		
<ul style="list-style-type: none"> CONTROL POSITIVO: Contiene un número de copias definido de la secuencia diana, el número se encuentra cerca del valor de corte positivo, se determina de forma individual para cada sistema de ensayo y se indica como un múltiplo del valor de corte positivo del sistema de ensayo; CONTROL NEGATIVO: Una muestra de una matriz adecuada que ya se ha demostrado que está libre de las secuencias diana. 		
<p>7.3.2. Control interno.</p>		
<p>Los controles internos son secuencias de ácido nucleico definidas que contienen, a menos que se indique lo contrario, los sitios de unión del cebador. Los controles internos deben ser amplificados con una eficacia definida y los amplicones deben ser claramente identificables. Los controles internos deben ser del mismo tipo de ácido nucleico que el material a analizar (ADN/ARN). El control interno se agrega preferiblemente al material de prueba antes de aislar el ácido nucleico y, por lo tanto, actúa como un control general (extracción, transcripción reversa, amplificación, detección).</p>		
<p>7.3.3. Control de umbral.</p>		
<p>El control de umbral para los ensayos cuantitativos es una prueba de muestra con el analito en una concentración que se define como el umbral que</p>		

“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
no debe superarse. Contiene el analito adecuadamente calibrado en Unidades Internacionales (UI) y se analiza de forma paralela a cada corrida de ensayo cuantitativo.		
7.4. EVALUACIÓN EXTERNA DE LA CALIDAD		
La participación en programas externos de evaluación de la calidad es un proceso importante del aseguramiento de la calidad para PCR para cada laboratorio y cada operador.		
Las siguientes secciones se publican sólo con fines informativos.		
VALIDACIÓN DE TÉCNICAS DE AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS PARA LA DETECCIÓN DE ARN DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC) EN MEZCLAS DE PLASMA		
LINEAMIENTOS		
1. ALCANCE		
La mayoría de los procedimientos analíticos de amplificación de ácidos nucleicos son pruebas cualitativas para determinar la presencia de ácido nucleico, sin embargo existe disponibilidad de algunas pruebas cuantitativas (tanto internas como comerciales) Para la detección de la contaminación por ARN del VHC en las mezclas de plasma, las pruebas cualitativas son adecuadas y se pueden considerar como una prueba límite para el control de impurezas tal como se describe en la Guía técnica para la elaboración de monografías de Pharmeuropa, diciembre de 1999, Capítulo III 'Validación de procedimientos analíticos'.		

“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>Estas directrices describen los métodos para validar únicamente los procedimientos analíticos de amplificación cualitativa de ácidos nucleicos para evaluar la contaminación por ARN del VHC de las mezclas de plasma. Por tanto, los dos parámetros con mayor importancia para la validación del procedimiento analítico son la especificidad y el límite de detección. Además, debe evaluarse la robustez del procedimiento analítico.</p>		
<p>Sin embargo, este documento también puede utilizarse como base para la validación de la amplificación de ácidos nucleicos en general.</p>		
<p>A los efectos de este documento, un procedimiento analítico se define como el procedimiento completo desde la extracción del ácido nucleico hasta la detección de los productos amplificados.</p>		
<p>Cuando se empleen kits comerciales para realizar una fracción o la totalidad del procedimiento analítico, los puntos de validación documentados ya cubiertos por el fabricante del kit pueden sustituir la validación por parte del usuario.</p>		
<p>No obstante, el rendimiento del kit con respecto al uso previsto debe ser demostrado por el usuario (por ejemplo, límite de detección, robustez, contaminación cruzada).</p>		
<p>2. ESPECIFICIDAD</p>		
<p>La especificidad es la capacidad de evaluar inequívocamente el ácido nucleico en presencia de los componentes que se espera puedan estar presentes.</p>		

“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>La especificidad de los procedimientos analíticos de amplificación de ácidos nucleicos depende de la elección de los cebadores, la elección de la sonda (para el análisis del producto final) y la rigurosidad de las condiciones de la prueba (para los pasos de amplificación y detección).</p> <p>Al diseñar cebadores y sondas, se debe investigar la especificidad de los cebadores y las sondas para detectar solo el ARN del VHC comparando las secuencias elegidas con las secuencias publicadas en las bases de datos. Para el VHC, los cebadores (y las sondas) normalmente se eligen a partir de las áreas de la región 5´ no codificante del genoma del VHC, las cuales están altamente conservadas para todos los genotipos.</p>		
<p>El producto amplificado debe identificarse inequívocamente mediante el uso de uno de los varios métodos disponibles, como la amplificación con cebadores anidados, el análisis de enzimas de restricción, la secuenciación o la hibridación con una sonda específica.</p> <p>Para validar la especificidad del procedimiento analítico, se deben analizar al menos 100 grupos de plasma negativos para ARN del VHC y demostrar que no son reactivos. Las muestras adecuadas de los grupos no reactivos están disponibles en la Dirección Europea para la Calidad de los Medicamentos y la Atención Sanitaria (EDQM).</p>		
<p>La capacidad del procedimiento analítico para detectar todos los genotipos del VHC dependerá nuevamente de la elección de los cebadores, las</p>		

“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>sondas y los parámetros del método. Esta capacidad debe ser demostrada utilizando paneles de referencia caracterizados. Sin embargo, dada la dificultad para obtener muestras de algunos genotipos (p. ej., el genotipo 6), los genotipos más prevalentes (p. ej., los genotipos 1 y 3 en Europa) deben detectarse a un nivel adecuado.</p>		
<p>3. LÍMITE DE DETECCIÓN</p>		
<p>El límite de detección de un procedimiento analítico individual es la cantidad más baja de ácido nucleico en una muestra que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse como un valor exacto.</p>		
<p>El procedimiento analítico de amplificación de ácidos nucleicos utilizado para la detección de ARN del VHC en mezclas de plasma suele arrojar resultados cualitativos. El número de posibles resultados se limita a 2: ya sea positivo o negativo. Si bien se recomienda la determinación del límite de detección, a efectos prácticos se debe determinar un punto de corte positivo para el procedimiento analítico de amplificación de ácidos nucleicos. El punto de corte positivo (como se define en el apartado 2.6.21) es el número mínimo de secuencias objetivo por volumen de muestra que se pueden detectar en el 95 % de las pruebas. Este punto de corte positivo está influenciado por la distribución de los genomas virales en las muestras individuales que se analizan y por factores como la eficiencia de la enzima, de modo que puede dar como resultado diferentes valores</p>		

“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
de corte del 95 por ciento para las pruebas analíticas individuales.		
Para determinar el punto de corte positivo, se debe analizar una serie de diluciones del virus de la hepatitis C, que se haya calibrado con el estándar internacional de VHC de la OMS, en días diferentes para examinar la variación entre las pruebas. Se deben probar al menos 3 series de diluciones independientes con un número suficiente de réplicas en cada dilución para dar un número total de 24 resultados para cada dilución, para permitir un análisis estadístico de los resultados.		
Por ejemplo, un laboratorio podría probar 3 diluciones en serie en días diferentes con 8 repeticiones para cada dilución, 4 diluciones seriadas en días diferentes con 6 repeticiones para cada dilución o 6 diluciones seriadas en días diferentes con 4 repeticiones para cada dilución. Para mantener el número de diluciones a un nivel manejable, se debe realizar una prueba preliminar (utilizando, por ejemplo, diluciones log ₁₀ de la muestra de plasma) para obtener un valor preliminar para el punto de corte positivo (es decir, la dilución más alta que da una señal positiva). El rango de diluciones se puede establecer alrededor del punto de corte preliminar predeterminado (utilizando, por ejemplo, un factor de dilución de 0,5 log ₁₀ o menos y un pool de plasma negativo para la matriz de dilución). La concentración de RNA del VHC que se puede detectar en el 95 % de		

“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>las pruebas se puede calcular mediante una evaluación estadística adecuada.</p>		
<p>Estos resultados también pueden servir para demostrar la variación intraensayo y la variación día a día del procedimiento analítico.</p>		
<p>4. ROBUSTEZ</p>		
<p>La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad para no verse afectado por las variaciones pequeñas pero deliberadas en los parámetros del método y proporciona un indicador de su confiabilidad durante el uso normal.</p>		
<p>La evaluación de la robustez debe considerarse durante la fase de desarrollo. Debe demostrar la confiabilidad del procedimiento analítico con respecto a variaciones deliberadas en los parámetros del método. Para la amplificación de ácidos nucleicos, las pequeñas variaciones en los parámetros del método pueden ser cruciales. Sin embargo, la robustez del método se puede demostrar durante su desarrollo cuando se evalúan pequeñas variaciones en las concentraciones de los reactivos (p. ej., $MgCl_2$, cebadores o dNTP). Para demostrar la solidez, al menos 20 grupos de plasma negativos para ARN del VHC (seleccionados al azar) enriquecidos con ARN del VHC hasta una concentración final de 3 veces el valor de corte del 95 % previamente determinado deben analizarse y resultar positivos.</p>		
<p>También pueden surgir problemas de robustez con los métodos que utilizan un paso de ultracentrifugación inicial antes de la extracción del</p>		

“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>ARN viral. Por lo tanto, para probar la robustez de dichos métodos, se deben analizar y obtener resultados positivos en al menos 20 grupos de plasma que contengan niveles variables de RNA del VHC, pero que carezcan de anticuerpos específicos contra el VHC.</p>		
<p>La prevención de la contaminación cruzada debe demostrarse mediante la detección precisa de un panel de al menos 20 muestras que consisten en muestras alternas de mezclas de plasma negativas y mezclas de plasma negativas enriquecidas con altas concentraciones de VHC (al menos 10² veces el valor de corte del 95 por ciento). o al menos 10⁴ UI/mL).</p>		
<p>5. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD</p>		
<p>Para pruebas biológicas como la amplificación de ácidos nucleicos, pueden surgir problemas específicos que influyan tanto en la validación como en la interpretación de los resultados. Los procedimientos de prueba deben describirse con precisión en forma de procedimientos normalizados de operación (PNO). Estos deben cubrir:</p>		
<ul style="list-style-type: none"> • El modo de muestreo (tipo de recipiente, etc.); • La preparación de minipiscinas (en caso de ser necesario); • Las condiciones de almacenamiento antes del análisis; • La descripción exacta de las condiciones de la prueba, incluidas las precauciones 		

“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>tomadas para evitar la contaminación cruzada o la destrucción del RNA viral, los reactivos y las preparaciones de referencia utilizadas;</p> <ul style="list-style-type: none"> • La descripción exacta del aparato empleado; • Las fórmulas detalladas para el cálculo de los resultados, incluida la evaluación estadística. 		
<p>El uso de un control de serie adecuado (por ejemplo, una dilución adecuada de BRP del virus de la hepatitis C o plasma enriquecido con una muestra de VHC calibrada con el estándar internacional de VHC de la OMS) puede considerarse una comprobación satisfactoria de la idoneidad del sistema y garantiza que la fiabilidad del procedimiento analítico se mantiene cada vez que se utiliza.</p>		
<p>Cualificación técnica. Se debe implementar un programa apropiado de calificación de instalación y operación para cada pieza crítica del equipo utilizado. Para confirmar el rendimiento del procedimiento analítico después de un cambio de equipo crítico (por ejemplo, termocicladores), el cambio debe documentarse realizando una prueba paralela en 8 muestras de un grupo de plasma al que se le ha añadido ARN del VHC hasta una concentración final de 3 veces la determinada previamente y el 95 por ciento del valor de corte. Todos los resultados deben ser positivos</p>		

“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
Calificación del operador. Se debe implementar un programa de calificación apropiado para cada operador involucrado en la prueba.		
VALIDACIÓN DE TÉCNICAS DE AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS (NAT) PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL ADN DEL VIRUS B19 (B19V) EN MEZCLAS DE PLASMA.		
LINEAMIENTOS		
1. ALCANCE		
La Farmacopea Europea exige que las mezclas de plasma utilizadas para la fabricación de determinados productos sean analizadas para detectar la presencia de ADN del virus B19 (B19V) con un valor de concentración límite que no debe superarse. Para cumplir con estos requisitos, se prefieren las pruebas cuantitativas de amplificación de ácidos nucleicos. Las características más importantes para la validación del procedimiento cuantitativo de amplificación de ácidos nucleicos son la exactitud, precisión, especificidad, límite de cuantificación, linealidad y rango. Además, debe evaluarse la robustez del procedimiento analítico.		
Esta guía describe los métodos para validar los procedimientos analíticos de amplificación de ácidos nucleicos para evaluar la contaminación por ADN de B19V de las mezclas de plasma según los lineamientos establecidos por la ICH. Sin embargo, este documento también puede utilizarse como base para la validación de la amplificación de ácidos nucleicos cuantitativa en general.		

“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>A los efectos de este documento, un procedimiento analítico se define como el procedimiento completo desde la extracción del ácido nucleico hasta la detección de los productos amplificados.</p>		
<p>Quando se utilicen kits comerciales para una fracción o la totalidad del procedimiento analítico, los puntos de validación documentados ya cubiertos por el fabricante del kit pueden sustituir la validación por parte del usuario. No obstante, el rendimiento del kit con respecto al uso previsto debe ser demostrado por el usuario (precisión, exactitud, alcance, robustez).</p>		
<p>2. EXACTITUD</p>		
<p>La precisión expresa el grado de concordancia entre el valor que se acepta como valor verdadero convencional o valor de referencia aceptado y el valor encontrado. La precisión de un ensayo depende de la calibración del mismo y de la variación de sus distintas etapas. Aunque se recomienda establecer la precisión en el rango especificado del procedimiento analítico, la evaluación más importante de la precisión se encuentra en el rango del umbral de concentración. En el caso de los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos B19V para la investigación de mezclas de plasma, se recomienda evaluar la precisión del ensayo calibrado analizando al menos 5 concentraciones (factor de dilución de 0,5 log₁₀) de ADN del virus B19 para pruebas NAT BRP u otro material, adecuadamente calibrado en unidades internacionales frente al estándar internacional de ADN B19 de la OMS, que cubre el</p>		

“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>rango de la concentración umbral actualmente recomendada de 10,0 UI/μL de ADN B19V (p. 10³ UI/mL, 10^{4.5} IU/mL, 10⁴ IU/mL, 10^{3.5} IU/mL and 10³ IU/mL), con al menos 3 repeticiones para cada dilución.</p> <p>La precisión debe reportarse para las diferentes concentraciones en términos de porcentaje determinado en comparación con la cantidad conocida de ADN de B19V. Debe reflejar el nivel de tecnología de los respectivos ensayos, el cual también debe definirse, por ejemplo, en los estudios colaborativos.</p>		
<p>3. PRECISIÓN</p>		
<p>La precisión expresa la proximidad de la concordancia entre una serie de medidas obtenidas a partir de múltiples muestreos de la misma muestra homogénea. La precisión se define en 3 niveles:</p>		
<ul style="list-style-type: none"> • La repetibilidad expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación durante un corto intervalo de tiempo (precisión intraensayo); se evalúa utilizando 1 ensayo y analizando 3 réplicas de diluciones apropiadas de una muestra positiva de ADN B19V debidamente calibrada en Unidades Internacionales y que cubre todo el rango cuantitativo del ensayo; se calcula el coeficiente de variación para las muestras individuales (variabilidad intraensayo); 		

“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
<ul style="list-style-type: none"> La precisión intermedia expresa las variaciones intralaboratorio (precisión interensayo); se establece ensayando réplicas (tal como se usa habitualmente para el ensayo) de diluciones apropiadas de una muestra positiva de ADN de B19V debidamente calibrada en Unidades Internacionales que cubre todo el rango cuantitativo del ensayo en diferentes circunstancias (por ejemplo, diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos). , diferentes reactivos); se calcula el coeficiente de variación para las muestras individuales; 		
<p>La reproducibilidad expresa la precisión entre diferentes laboratorios (precisión interlaboratorios); se evalúa mediante la participación en estudios colaborativos cuantitativos sobre ensayos de ADN-NAT B19V, por ejemplo, bajo el Esquema de Pruebas de Aptitud (EPA), incluyendo el análisis comparativo de los resultados cuantitativos obtenidos, de ser necesario.</p>		
<p>4. ESPECIFICIDAD</p>		
<p>La especificidad expresa la capacidad de evaluar inequívocamente el ácido nucleico en presencia de los componentes que podrían estar presentes. La especificidad de los procedimientos analíticos NAT depende de la elección de los cebadores, la elección de la sonda (para el análisis del producto final) y la rigurosidad de las condiciones de la</p>		

“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>prueba (para los pasos de amplificación y detección).</p> <p>Al diseñar cebadores y sondas, se debe investigar la especificidad de los cebadores y las sondas para detectar únicamente el ADN del B19V humano comparando las secuencias elegidas con las secuencias de los bancos de datos publicados. No debería encontrarse una homología importante con secuencias no relacionadas con B19V.</p> <p>El producto amplificado debe identificarse inequívocamente mediante el uso de uno de varios métodos, como la amplificación con cebadores anidados, el análisis de enzimas de restricción, la secuenciación o la hibridación con una sonda específica.</p> <p>Para examinar la especificidad del procedimiento analítico, se deben analizar al menos 20 grupos de plasma negativos para ADN B19V y demostrar que no son reactivos.</p>		
<p>Genotipos de parvovirus B19. El Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) ha clasificado representantes de los 3 genotipos como cepas de parvovirus humano B19. El genotipo 1 representa el prototipo B19V, el genotipo 2 representa secuencias virales como A6 y el genotipo 3 representa secuencias similares a V9.</p> <p>Al realizar el alineamiento de secuencias con las respectivas secuencias del genotipo B19V disponibles en las bases de datos de secuencias de ácidos nucleicos, se deben diseñar cebadores y sondas para detectar y cuantificar de forma consistente los diferentes genotipos del parvovirus</p>		

“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>B19 humano. Se deben utilizar materiales de referencia para comprobar el enfoque elegido. Dado que las preparaciones biológicas de referencia que reflejan algunos genotipos pueden ser difíciles de obtener, las respectivas preparaciones de plásmidos o ácidos nucleicos sintéticos también pueden servir como una fuente de secuencia diana caracterizada. Sin embargo, no se pueden utilizar para validar el procedimiento de extracción.</p>		
<p>5. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN</p>		
<p>El límite de cuantificación es la cantidad más baja de ácido nucleico en una muestra que se puede determinar cuantitativamente con precisión y exactitud adecuadas. El límite de cuantificación del ensayo B19V NAT se evalúa durante los estudios de repetibilidad y precisión intermedia mediante análisis de dilución limitante. Se define la concentración más baja de ácidos nucleicos diana que se cuantifica con precisión y exactitud adecuadas.</p>		
<p>6. LINEALIDAD</p>		
<p>La linealidad de un ensayo es su capacidad para obtener resultados de prueba que son directamente proporcionales a la concentración del ácido nucleico. La linealidad del ensayo NAT B19V se evalúa durante los estudios de repetibilidad y precisión intermedia analizando réplicas de muestras diluidas con concentraciones que cubren todo el rango cuantitativo. Se define el intervalo entre la concentración superior e inferior del ácido</p>		

“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>nucleico objetivo donde los resultados de la prueba son directamente proporcionales a las concentraciones.</p>		
<p>7. ALCANCE</p>		
<p>El rango de un ensayo es el intervalo entre la concentración superior e inferior de ácido nucleico en la muestra para la cual se ha demostrado que el procedimiento tiene un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad. El rango del ensayo NAT B19V se evalúa durante los estudios de repetibilidad y precisión intermedia analizando réplicas de muestras diluidas. Se define el intervalo entre la concentración superior e inferior que se puede expresar con un grado aceptable de exactitud y precisión.</p>		
<p>8. ROBUSTEZ</p>		
<p>La solidez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad para no verse afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas en los parámetros del método y proporciona una indicación de su confiabilidad durante el uso normal. La evaluación de la robustez debe considerarse durante la fase de desarrollo. Debe mostrar la confiabilidad del procedimiento analítico con respecto a variaciones deliberadas en los parámetros del método. Para NAT, las pequeñas variaciones en los parámetros del método pueden ser cruciales. No obstante, la robustez de NAT se puede demostrar durante el desarrollo del método cuando se prueban pequeñas variaciones en las concentraciones de los reactivos, por ejemplo,</p>		

“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>MgCl₂, cebadores o dNTP. Para demostrar la solidez, se deben analizar al menos 20 muestras de pool de plasma negativas para ADN B19V enriquecidas con ADN B19V en la concentración umbral y se debe determinar que tienen valores cuantitativos aceptables.</p>		
<p>La prevención de la contaminación cruzada debe demostrarse mediante la detección precisa de un panel de al menos 20 muestras que consisten en muestras alternas de grupos de plasma sin ADN de B19V o con niveles por debajo del umbral de concentración (10 muestras) y grupos de plasma enriquecidos con altas concentraciones de ADN de B19V. (al menos 10² veces el nivel de umbral, 10 muestras).</p>		
<p>9. GARANTÍA DE CALIDAD</p>		
<p>Para pruebas biológicas como NAT, pueden surgir problemas específicos que pueden influir tanto en la validación como en la interpretación de los resultados. Los procedimientos de prueba deben describirse con precisión en forma de procedimientos normalizados de operación (PNO). Estos deben cubrir:</p>		
<ul style="list-style-type: none"> • El modo de muestreo (tipo de recipiente, etc.); • La preparación de minipiscinas por parte de los fabricantes (en su caso); • Las condiciones de almacenamiento antes del análisis; • La descripción exacta de las condiciones de la prueba, incluidas las precauciones 		

“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>tomadas para evitar la contaminación cruzada o la destrucción de los ácidos nucleicos virales, los reactivos y las preparaciones de referencia utilizados;</p> <ul style="list-style-type: none"> • La descripción exacta del aparato utilizado; • Las fórmulas detalladas para el cálculo de los resultados, incluida la evaluación estadística. 		
<p>La inclusión de un control de umbral apropiado (por ejemplo, plasma enriquecido con una muestra de ADN B19V debidamente calibrada en unidades internacionales, como el ADN del virus B19 para pruebas NAT BRP) se considera una verificación satisfactoria de la idoneidad del sistema y garantiza que la confiabilidad del procedimiento analítico se mantiene cada vez que se utiliza.</p>		
<p><i>Calificación técnica.</i> Se debe implementar un programa apropiado de calificación de instalación y operación para cada pieza crítica del equipo utilizado. Para confirmar el rendimiento del procedimiento analítico después de un cambio de equipo crítico (p. ej., termocicladores), el cambio debe documentarse mediante la realización de una prueba paralela en 8 muestras de un grupo de plasma al que se le ha añadido una concentración de ADN de B19V cercana a la concentración umbral. Todos los resultados deben ser aceptables y reflejar las características del ensayo determinadas durante la fase de validación.</p>		

“2024, Año de Felipe Carrillo Puerto, benemérito del proletariado, revolucionario y defensor del Mayab”

Dice	Debe decir	Justificación*
<i>Calificación del operador. Se debe implementar un programa de calificación apropiado para cada operador involucrado en la prueba</i>		

*Para una mejor comprensión de su solicitud adjunte bibliografía u otros documentos que sustenten sus comentarios.

CONSULTA