

INDICE

Página

1. INTRODUCCIÓN	2
2. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN.....	2
3. MÉTODOS DE ENSAYO	3
4. CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO DE LOS MÉTODOS.....	4
4.1. VERIFICACIÓN.....	4
4.2. VALIDACIÓN	5
5. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DE LOS RESULTADOS DE ENSAYO.....	6
5.1. CONTROL INTERNO.....	6
5.2. CONTROL EXTERNO (intercomparaciones).....	6
6. MATERIALES DE REFERENCIA.....	7
7. INFORMES DE ENSAYO	8
8. REFERENCIAS	9
ANEXO INFORMATIVO - CONTROL DE CALIDAD INTERNO.....	1

CAMBIOS RESPECTO A LA REVISIÓN ANTERIOR:

- Se actualizan las referencias en los apdos. 1 y 2
- En el apdo. 3 se revisa la nomenclatura de los tipos de métodos y se introducen mejoras en la descripción de los métodos TIPO I. Se recogen referencias legislativas actuales, en concreto el Reglamento Delegado (UE) 2020/689 (nueva nota a pié de página) para tener en cuenta el Artículo 6 *Métodos de diagnóstico* y el Real Decreto 867/2020 relativo al registro de los kits comerciales de diagnóstico. Además se incluye información respecto a la forma de indicar los métodos en el alcance de acreditación.
- Se revisa el apdo. 4 para alinearlos con la actual versión de la norma UNE-EN ISO/IEC 17025 y teniendo en cuenta la legislación vigente, diferenciando entre Verificación y Validación según el tipo de método.
- Se actualizan las Referencias (apdo. 8)

1. INTRODUCCIÓN

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

Por otro lado, la eliminación de barreras para el comercio internacional requiere una estandarización de las técnicas para una aceptación recíproca de las pruebas realizadas. Por tanto la Sanidad Animal también debe regirse por las indicaciones de organismos internacionales como la OMSA (Organización Mundial de Sanidad Animal, antigua Oficina Internacional de Epizootias, OIE) que, a través de su *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres* y el *Manual de Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos*, marca las directrices a seguir en el diagnóstico analítico de la Sanidad Animal.

En la elaboración de la rev. 1 de este documento participó el Grupo de Trabajo de Calidad – Coordinación General de Laboratorios de Sanidad Animal, el Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (MARM) y la Asociación Empresarial Española de la Industria de Sanidad y Nutrición Animal (VETERINDUSTRIA). La rev. 2 del documento ha sido confirmada con los Laboratorios Nacionales de Referencia de Sanidad Animal, pertenecientes a la División de Laboratorios de Sanidad de la Producción Agraria del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA).

2. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

El objetivo de este documento es establecer los criterios para la acreditación de los laboratorios que realizan ensayos en el ámbito de la Sanidad Animal (ej. inmunológicos, basados en biología molecular, etc.). Por razones legales, ENAC sólo acredita en este ámbito a los laboratorios que cuentan con las autorizaciones para el desarrollo de su actividad por parte de las autoridades competentes correspondientes.

Debe entenderse esta nota como un documento en el que se establecen directrices que faciliten tanto la implantación de los criterios de acreditación en los laboratorios de diagnóstico, como su evaluación por parte de ENAC.

Para análisis microbiológicos basados en técnicas de aislamiento en medios de cultivo se seguirán las directrices recogidas en el documento CEA-ENAC-20.

3. MÉTODOS DE ENSAYO

La norma UNE-EN ISO/IEC 17025 en su apartado 7.2.1.1 establece que *“El laboratorio debe utilizar métodos y procedimientos apropiados para todas las actividades de laboratorio”*. Por tanto, el laboratorio debe tener en cuenta el ámbito de aplicación, la selección¹ de los métodos de ensayo y su validación.

Se establece la siguiente clasificación de métodos de ensayo, atendiendo al nivel de confianza que aportan y que, por tanto, marcarán el nivel de actividades adicionales que ENAC requerirá en relación la demostración de su validez:

- **Métodos TIPO I.** Son métodos que gozan de reconocimiento nacional o internacional y son ampliamente aceptados.

Entre los métodos TIPO I se encuentran:

- los publicados en la legislación,
- los métodos de diagnóstico publicados por la Organización Mundial de Sanidad Animal (en adelante, OMSA),
- los métodos publicados por los laboratorios de referencia de la UE o laboratorios nacionales referencia,
- los métodos que utilizan kits comerciales de los que se disponga de evidencias de la aplicación de los procedimientos de autorización y registro establecidos en el Real Decreto 867/2020, siendo una evidencia adecuada que consten en el Registro de productos zoosanitarios (<https://servicio.mapa.gob.es/geszoosan-publico/>). Asimismo, en el caso de kits comerciales para el diagnóstico de enfermedades de los animales sujetas a declaración obligatoria, en los términos establecidos por la legislación vigente, también les será de aplicación lo establecido en el Artículo 8 del Real Decreto 867/2020 en cuanto a la contrastación de los mismos por el laboratorio nacional de referencia o por el laboratorio oficial que se designe a tal efecto.

- **Métodos TIPO II.** Métodos descritos en procedimientos internos del laboratorio, que están claramente basados en métodos TIPO I y que no suponen una modificación técnica respecto del método de referencia que ponga en cuestión su validez técnica. Deben mantenerse actualizados en relación con el método de referencia en que se basan.

Nota. Las modificaciones realizadas no podrán afectar a características relevantes como la sensibilidad y especificidad diagnóstica.

- **Métodos TIPO III**

Son aquellos métodos desarrollados por el propio laboratorio o por cualquier otra parte y que no disponen del reconocimiento de los métodos de referencia. Deben contar con suficientes garantías de validez basadas en la disponibilidad de la información necesaria sobre sus características de funcionamiento, que permitan valorar si son adecuados al uso previsto.

¹ Respecto a la selección de los métodos de ensayo se tendrá en cuenta, cuando sea posible, el Artículo 6 del Reglamento Delegado (UE) 2020/689

Respecto a la identificación de los métodos de ensayo en los alcances de acreditación, para cada ensayo se indicará el TIPO de método a continuación del documento de ensayo. En el caso de los métodos TIPO I publicados en la legislación, por la OMSA, o los laboratorios de referencia, no será necesario añadir la indicación del TIPO de método. Asimismo, en el caso de métodos TIPO III se indicará la revisión del procedimiento interno de acuerdo con lo establecido en el apdo. 4.1 del documento NT-86, por lo que los laboratorios deberán aplicar lo establecido en el apdo. 4.2 del citado documento cuando se proponga llevar a cabo una nueva revisión del procedimiento interno.

4. CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO DE LOS MÉTODOS

4.1. VERIFICACIÓN

Los métodos de ensayo TIPO I y TIPO II presentados para su acreditación deben estar verificados. Para ello, es necesario conocer las características de funcionamiento del método tan extensamente como sea necesario.

La extensión de las actividades de verificación a realizar dependerá del tipo de método seleccionado:

Para los **Métodos TIPO I** el laboratorio debe determinar las características de funcionamiento del método en su propia situación, por lo que deberá llevar a cabo la verificación interna del método, así como disponer de los datos de la validación.

Nota.- Los kits de diagnóstico comerciales autorizados y registrados de acuerdo a los procedimientos descritos en el Real Decreto 867/2020 (artículos 6, 7, y 8) se consideran métodos TIPO I a efectos de las actividades a realizar para su verificación interna siempre que dispongan de una validación adecuada y completa (ej. declaración de método validado requerida para su autorización) y deben contar con el correspondiente nº de registro.

Los **Métodos TIPO II** tampoco precisan de una validación completa. En la mayoría de los casos las modificaciones realizadas en este tipo de métodos sólo requerirán la necesaria comprobación de su funcionamiento mediante la verificación interna, así como disponer de los datos de la validación del método de referencia.

En los casos necesarios, la modificación técnica realizada por el laboratorio deberá ser comprobada, aportando evidencias de que no se modifican propiedades relevantes como las características diagnósticas del método TIPO I en que se basan.

Los datos para la verificación de los métodos TIPO I y TIPO II podrán obtenerse de diferentes formas, siempre que se garantice una adecuada comprobación del correcto funcionamiento del método en el propio laboratorio:

- mediante pruebas en el laboratorio, planificadas y llevadas a cabo específicamente para el estudio de la verificación interna,
- mediante resultados del plan de aseguramiento de calidad de los ensayos (controles internos y estudios de intercomparación) que permita obtener datos estadísticamente significativos,

- mediante datos de estudios científicos en los que ha participado el propio laboratorio,
- mediante datos combinando las opciones anteriores.

Los parámetros objeto de estudio en la verificación interna dependerán del método de ensayo:

Sensibilidad analítica: se determinará mediante el uso de un material de referencia de trabajo positivo a diluciones al nivel de interés (ej. próximas al punto de corte en método ELISA). Se considera necesaria la realización de un mínimo de $n=10$ ensayos para determinar este parámetro. Si es necesario, el estudio de este parámetro debe llevarse a cabo en matrices representativas.

Repetibilidad y Reproducibilidad intralaboratorio: La realización de este tipo de estudio debe implicar un número de pruebas mínimo de $n=10$ e incluir al menos valores próximos al nivel de interés. Si es necesario, el estudio de estos parámetros debe llevarse a cabo en matrices representativas. Estos parámetros también son de interés para el laboratorio, en función de la naturaleza de los métodos de ensayo, en actividades como el control de calidad interno (ver Anexo).

Los criterios de aceptación de la Verificación interna serán los establecidos en los estudios de validación o en la documentación de referencia disponible o los aceptados por el sector como adecuados para el uso previsto en caso de que no se disponga de la información anterior.

Cuando proceda el laboratorio debe justificar la selección del número y tipo de matrices (tipo de muestra, especie) en función del alcance de acreditación y ésta debería basarse en la información tomada de referencias bibliográficas o estándares internacionales (por ejemplo, indicaciones de la OMSA) o datos del estudio de validación.

4.2. VALIDACIÓN

Para los **Métodos TIPO III** (desarrollados por el laboratorio o por cualquier otra parte), el laboratorio debe disponer de evidencias completas de que dichos métodos han sido adecuadamente validados de acuerdo con estándares reconocidos, así como de toda la información sobre el trabajo experimental realizado para la validación del método. La validación debe ser tan amplia como sea necesario para satisfacer las necesidades del tipo de aplicación o del campo de aplicación dados.

En el estudio de validación deberán tenerse en cuenta parámetros como los siguientes:

- Determinación de especificidad y sensibilidad diagnóstica
- Determinación de especificidad y sensibilidad analítica
- Repetibilidad/Reproducibilidad
- Robustez

NOTA: ENAC considera aceptables las estrategias de validación recogidas en el Manual de la OMSA en vigor.

Cabe la posibilidad de que ENAC tenga que recurrir a actividades de evaluación extraordinarias para asegurarse de la validez de estos métodos.

5. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DE LOS RESULTADOS DE ENSAYO

En UNE-EN ISO/IEC 17025 se establece que el laboratorio debe establecer un control de calidad para realizar el seguimiento de la validez de los resultados de los ensayos.

Todas las actividades de aseguramiento de la validez de los resultados deberán planificarse de forma que, en el tiempo y en función del alcance de cada método, se incluya una adecuada representación de la variedad de matrices con las que trabaja el laboratorio.

El aseguramiento de la calidad debe ser tanto interno como externo y puede aplicarse de diferentes formas:

5.1. CONTROL INTERNO

Las actividades de control interno que se recomiendan para asegurar la calidad de los resultados son las siguientes:

- Control de las condiciones de trabajo: proporciona información sobre la buena práctica en la realización de los ensayos (ej. control de equipos, control de reactivos etc.) y sobre la posible contaminación en algún punto del procedimiento (ej. muestras blanco, control de arrastre en métodos automatizados, etc.).
- Análisis de muestra/s por duplicado: evaluando la eventual discrepancia de resultados.
- Uso regular de muestras de control de calidad interno de valor conocido: se utilizarán muestras control positivas y negativas y en las mismas condiciones que las muestras problema.

Es necesario disponer de criterios adecuados para evaluar los resultados de los controles indicados y deben ser coherentes con la información recogida en la validación disponible de los métodos.

Debe asegurarse la utilización de muestras débilmente positivas en los controles y cuando sea necesario representativas de todas las especies o matrices objeto de la acreditación.

Para los métodos de ensayo más habituales se indican en el ANEXO (informativo) actividades de control de calidad interno, así como indicaciones sobre la periodicidad de su realización.

5.2. CONTROL EXTERNO (intercomparaciones)

La participación en intercomparaciones permite que el laboratorio pueda demostrar que se mantiene dentro de los criterios de aceptación definidos por normas, reglamentos o por laboratorios nacionales/internacionales de referencia.

Es necesario participar en intercomparaciones con una periodicidad de al menos 2 años para cada enfermedad. En caso de que se disponga de más de una técnica por enfermedad, debe garantizarse que se cubre la participación en todas las técnicas en el periodo entre re-evaluaciones, esto es, con una periodicidad de al menos 4 años en el primer ciclo de acreditación y de 5 años en los ciclos posteriores.

Si para alguna técnica acreditada no existen intercomparaciones organizadas a nivel nacional ni internacional, se deberán ampliar los controles internos y/o trabajar con muestras ciegas recibidas de otro laboratorio.

6. MATERIALES DE REFERENCIA

Las siguientes definiciones proceden del documento “Norma de calidad y directrices de la OIE para los laboratorios veterinarios: enfermedades infecciosas”.

MATERIAL DE REFERENCIA PRIMARIO (MRP) o Estándar de referencia internacional: Representa el estándar de referencia respecto al cual se comparan y se calibran todos los demás.

MATERIAL DE REFERENCIA SECUNDARIO (MRS) o Estándares secundarios: los estándares secundarios se preparan comparándolos directamente con MRP o estándar de referencia internacional. Están preparados por el Laboratorio Nacional de Referencia y se designa como “**estándar nacional**”.

MATERIAL DE REFERENCIA DE TRABAJO (MRT): estos pueden ser “**MR terciarios**” si se comparan respecto al secundario y “**MR cuaternarios**” si se comparan respecto al terciario. Los estándares de trabajo deben estar disponibles en cantidad suficiente en los laboratorios de diagnóstico con el fin de usarlos como **controles internos**.

A la recepción del Material de Referencia, se comprobará la idoneidad del mismo en base a la documentación que lo acompaña.

Se documentarán las condiciones de almacenamiento de los materiales de referencia, y las instrucciones para su manejo, así como la sistemática de estandarización del material de referencia de trabajo.

Los Materiales de Referencia deben estar acompañados de una *Ficha de datos* que, según proceda, recoja datos de interés como pueden ser:

- Remitente (no aplica a material de referencia de trabajo)
- Producto/Identificación
- Procedencia
- Descripción /valor
- Presentación
- Conservación
- Fecha de preparación
- Fecha de caducidad/uso recomendado
- Uso previsto
- Identificación de las instrucciones de uso

7. INFORMES DE ENSAYO

EXPRESIÓN DE RESULTADOS EN INFORMES DE ENSAYO

Dentro de los Informes de Ensayo emitidos, la expresión de resultados en los diagnósticos de Sanidad Animal puede ser:

- **POSITIVO** (incluyendo valor, si aplica). Si se acuerda con el cliente previamente, puede utilizarse otra definición para estos casos, por ejemplo: no apto, presencia, detectado, se observa, aislamiento de. Asimismo, pueden incluirse como parte del resultado otros datos, inherentes al ensayo, como por ejemplo el valor del título de anticuerpos, ciclo de corte (Ct) en las PCR en tiempo real. Se indicará la posibilidad de que queda sujeto a confirmación por parte del Laboratorio Nacional de Referencia si reglamentariamente se ha establecido.
- **NEGATIVO**. Si se acuerda con el cliente previamente, puede utilizarse otra definición para estos casos, por ejemplo: apto, ausencia, no detectado, no se observa.
- **NO CONCLUYENTE**. En estos casos se pueden utilizar diferentes expresiones, por ejemplo:
 - en función del método de referencia empleado o de instrucciones específicas de un kit de diagnóstico comercial,
 - presencia de poder anticomplementario de un suero (Fijación de Complemento),
 - efecto citotóxico de un suero (Seroneutralización),
 - ciclo de corte (Ct) o rango de ciclo de corte (Ct) en PCR a tiempo real.

En los casos en los que exista un Plan Nacional de Vigilancia, Control y/o Erradicación de Enfermedad puede venir indicado en el texto de la misma el término a utilizar.

En determinados casos puede ser necesaria la emisión de informes de resultados no completos debido a diferentes causas:

- Muestras que requieren análisis por diferentes técnicas de ensayo y cuyos resultados se emiten a medida que se van realizando.
- Dentro de una misma solicitud de ensayo emisión de resultados de parte de las muestras a medida que se van analizando.
- Emisión de resultados con técnicas pendientes de confirmación por el LNR.

En todos estos casos se emitirá un Informe final definitivo que hará referencia a los Informes previos e incluirá todos los resultados de los mismos.

Normalmente los informes de ensayo emitidos incluyen los resultados de un conjunto de muestras. En esos casos, se incluirá la identificación individual de cada una de las muestras con resultado positivo mientras que las muestras con resultado negativo no necesariamente se identificarán de forma individual siempre que en el informe se incluya la información necesaria que garantice la trazabilidad completa de cada muestra analizada con los registros aportados por el cliente.

8. REFERENCIAS

- UNE-EN ISO/IEC 17025:2017 “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración”
- ISO Guide 33:2015 Reference materials – Good practice in using reference materials
- Nota Técnica NT-03 Política de ENAC sobre Intercomparaciones
- Reglamento (UE) 2016/429
- Reglamento Delegado (UE) 2020/689
- Ley 8/2003, de 24 de abril, de sanidad animal
- Real Decreto 867/2020, que regula los productos zoonosarios
- Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres (<https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-manual-terrestre>)
- Manual de Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos (<https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-manual-acuatico>)
- Norma de calidad y Directrices de la OIE para los laboratorios veterinarios: Enfermedades infecciosas. Edición 2002 (<https://doc.woah.org/dyn/portal>)

La edición en vigor de este documento está disponible en www.enac.es. Las organizaciones acreditadas deben asegurarse de que disponen de la edición actualizada.

Puede enviar a ENAC sus puntos de vista y comentarios en relación con este documento, así como sus propuestas de cambio o de mejora para futuras ediciones, en la siguiente dirección (calidad@enac.es) indicando en el asunto el código del documento.

ANEXO INFORMATIVO - CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Este anexo ha sido elaborado por el Grupo de Trabajo de Calidad – Coordinación General de Laboratorios de Sanidad Animal (MARM) y no forma parte del documento de ENAC. Se incluye a título informativo como una guía para los laboratorios.

Se citan en la tabla adjunta algunas de las técnicas más comunes utilizadas en el diagnóstico de la Sanidad Animal, así como las actividades que pueden llevarse a cabo en el control de calidad interno:

TIPO DE MÉTODO	ACTIVIDADES DE CONTROL
<u>Métodos ELISA</u>	Control de suero positivo del kit por duplicado Control de suero negativo del kit por duplicado Control límite de detección Control de duplicados Control de aceptación de lote de reactivos
<u>FIJACIÓN COMPLEMENTO</u>	Control positivo Control negativo Control poder anticomplementario Control de complemento, Ag y sistema hemolítico Control de duplicados
<u>PCR (convencional/tiempo real)</u>	Control positivo extracción Control negativo extracción Control positivo PCR Control negativo PCR
<u>HEMAGLUTINACIÓN</u>	Control positivo Control negativo Control de glóbulos rojos
<u>ROSA DE BENGALA</u>	Control positivo Control negativo
<u>INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN</u>	Control positivo Control negativo Control de glóbulos rojos Control de antígeno Control de suero
<u>INMUNOFLUORESCENCIA</u>	Control positivo Control negativo
<u>INMUNOHISTOQUÍMICA</u>	Control positivo Control negativo
<u>SERONEUTRALIZACIÓN</u>	Control de suero positivo (límite de detección) Control de suero negativo Control de células Control de infectividad del virus
<u>INMUNOBLOTTING</u>	Control de suero positivo (límite de detección) Control de suero negativo
<u>INMUNODIFUSIÓN</u>	Control positivo Control negativo

Anexo I

TIPO DE MÉTODO	ACTIVIDADES DE CONTROL
<u>TÉCNICAS HISTOLÓGICAS</u>	Comparación visual con catálogo de muestras positivas y negativas Control de reactivos
<u> AISLAMIENTO EN CULTIVO CELULAR </u>	Control positivo (límite de detección) Control de células/negativo
<u>OBSERVACION MICROSCOPICA</u>	Comparación visual con catálogo de muestras positivas y negativas Control de reactivos
<u> AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS </u>	Cultivo de matrices contaminadas con concentraciones conocidas de las cepas de referencia en los diferentes medios de cultivo Control de medios de cultivo

Adicionalmente a las actividades de control de calidad rutinarias establecidas por cada Laboratorio, es necesario realizar un control de calidad interno periódico, cuya base es el análisis de muestras de valor conocido con la finalidad de evaluar el sesgo y la precisión del método, y su conformidad con los parámetros definidos en la verificación del método.

En todos los casos la periodicidad de las actividades de control de calidad, deberá establecerse considerando diversos factores como pueden ser:

- La robustez del método utilizado (en función de los controles específicos incluidos en el mismo, método de referencia, pruebas de confirmación, datos de validación, vigencia del método, etc.).
- La frecuencia con la que el laboratorio ejecuta dichos análisis (dado que se debe asegurar que el laboratorio mantiene la destreza en la ejecución del mismo en cuanto a los materiales, equipos y cualificación del personal). A modo orientativo podría establecerse en este sentido una periodicidad de:
 - Menos de 10 muestras anuales: 1 control con MRT en cada ensayo
 - De 10 a 1.000 muestras anuales: 1 control con MRT cada 6 meses
 - De 1.000 a 20.000 muestras anuales: 1 control con MRT cada 3 meses
 - Más de 20.000 muestras anuales: 1 control con MRT mensual
- Los resultados históricos de aseguramiento de calidad, así como la correcta evaluación de los mismos (en este caso pueden utilizarse gráficos de control para realizar un análisis de tendencias).
- Los resultados obtenidos en el conjunto de acciones de evaluación de la calidad tanto internas como externas.

Para estas actividades y las frecuencias que se establezcan se tendrá en cuenta que, dependiendo de diferentes factores como el método utilizado para el diagnóstico, la enfermedad a diagnosticar, la situación epidemiológica de la enfermedad y/o la disponibilidad de MR primario/secundario, el material utilizado para llevar a cabo las actividades de control será: MR, MRT, controles del propio kit o muestras de valor conocido.