Condagene®

Detección de ADN de brotes de soja/soja mediante PCR en tiempo real

INFORME DE VALIDACIÓN

ENSAYO

Detección de ADN de brotes de soja/soja, mediante PCR en tiempo real

EQUIPOS VALIDADOS

Applied Biosystems, modelo 7500; Thermo Scientific, modelo PikoReal; Condalab, modelo CDL-96.

MUESTRAS (N)

Productos alimenticios y muestras procedentes de sistemas externos de evaluación de la calidad.

ENSAYOS DE VALIDACIÓN

Inicio: 11/12/2015
Finalización: 08/02/2016

DEFINICIONES

Analito

ADN de la especie diana detectada por el método de análisis

Método cualitativo

Método de análisis cuya respuesta es la presencia o la ausencia de la especie diana, ya sea directa o indirectamente, en una determinada cantidad de muestra.

Positivo verdadero (TP)

Muestra que presenta un resultado positivo de la prueba y que tiene una cantidad igual o superior de analito diana (ADN de la especie diana) que el límite de detección establecido en las condiciones experimentales especificadas.

Negativo verdadero (TN)

Muestra que presenta un resultado negativo de la prueba y que tiene una cantidad menor de analito diana (ADN de la especie diana) que el límite de detección establecido en las condiciones experimentales especificadas.

Falso positivo (FP)

Muestra que presenta un resultado positivo de la prueba en ausencia del analito diana.

Falso negativo (FN)

Muestra que presenta un resultado negativo de la prueba en presencia de una cantidad igual o mayor de analito diana que el límite de detección.

Límite de detección (LOD)

- Límite de detección de la reacción: concentración más baja de ADN diana, que puede detectarse de forma constante en las condiciones experimentales especificadas.
- Límite de reacción del método: concentración o contenido más bajo de microorganismo diana respecto de la cantidad definida de matriz que puede detectarse de forma constante en las condiciones experimentales especificadas.

Inclusividad

Detección de la especie diana.

Exclusividad

No se han detectado especies no diana.

Selectividad

Medida de la inclusividad y la exclusividad.

Sensibilidad (S)

Medida de la concentración más baja de ADN del analito que puede detectarse en una sola reacción de prueba.

Especificidad (Sp)

Capacidad de exclusividad: identificar la especie diana que se tenga intención de detectar y distinguirla de otros organismos e impurezas similares.

Veracidad (T)

Grado de coincidencia entre la expectativa de resultado de una prueba y el valor verdadero correspondiente.

Valor predictivo positivo (PPV)

Probabilidad de que una prueba positiva indique que la muestra contiene el ADN de la especie diana.

Valor predictivo negativo (NPV)

Probabilidad de que una prueba positiva indique que la muestra contiene el ADN de la especie diana a una concentración que supere el límite de detección.

ÁMBITO DE APLICACIÓN DEL MÉTODO

El presente método se basa en reacciones PCR en tiempo real con nucleasa 5′ y amplifica una secuencia genómica única de la soja, con el objetivo de detectar el ADN de esta especie en muestras de alimentos, tras extraer el ADN. También se puede utilizar con otras muestras.

BASE CIENTÍFICA

El presente método se basa en un ensayo de PCR en tiempo real con nucleasa 5′ en el que se utilizan sondas fluorescentes específicas para detectar el ADN amplificado mediante la hibridación con amplicones. Estas sondas están conectadas a un fluoróforo en un extremo y, en el otro, a un apagador que suprime la fluorescencia. Si la secuencia diana está presente durante la PCR, se producirá la amplificación y la sonda se degradará, lo cual aumentará la fluorescencia. La fluorescencia se mide con un detector, y el software correspondiente dibuja la intensidad de la fluorescencia en función del número de ciclos, por lo que permite determinar la presencia o la ausencia del organismo diana.

El método también incluye un control interno (IC) del ADN. Este control se amplifica al mismo tiempo que la secuencia de ADN de la diana, aunque utilizando un conjunto diferente de cebadores y una sonda etiquetada con un segundo fluoróforo. La inclusión del IC en cada reacción evita que haya falsos negativos, debido a la presencia de sustancias inhibidoras de la PCR, y valida los resultados negativos.

MUESTRAS

En la validación de la presente prueba, se utilizaron 23 muestras de alimentos obtenidas en diferentes proveedores comerciales. Estas muestras de alimentos incluían 15 matrices diferentes:

- Galletas
- Arroz cocido
- Filete de soja
- Hamburguesa de soja
- Mezcla de cereales
- Pan de cereales
- Sopa
- Barrita energética
- Aperitivos de chocolate
- Turrón
- Rollito de salchicha
- Caldo deshidratado
- Rollitos crujientes sin gluten
- Zumo
- Hamburguesa de carne

CARACTERÍSTICAS DE LA EFICACIA DEL MÉTODO

1. CONTROLES ANALÍTICOS

Cada conjunto de pruebas realizado simultáneamente con el presente método incluye los siguientes controles:

Control positivo externo (PC): reacción que contiene ADN de soja

Control negativo (NC): reacción sin ADN diana
Cada reacción individual incluye:

Control interno de la amplificación (IC): todas las reacciones incluyen un IC del ADN y el conjunto correspondiente de cebadores y sonda, etiquetados con un segundo fluoróforo. Este control se amplifica de forma simultánea, aunque independientemente de la secuencia de ADN diana. La inclusión del IC en cada reacción evita que haya falsos negativos, debido a la presencia de sustancias inhibidoras de la PCR, y valida los resultados negativos.
Para validar las pruebas, los controles deben mostrar los siguientes resultados:

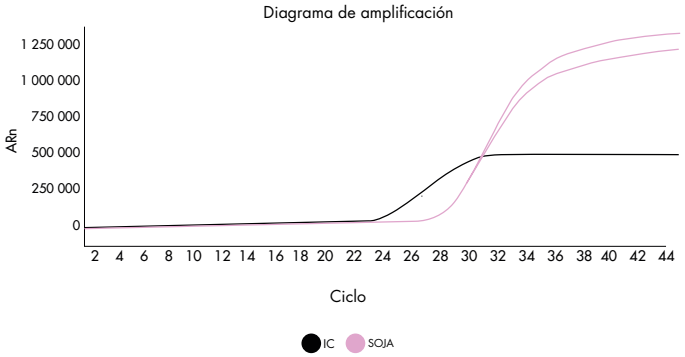
	Detección de la diana Canal 1	**Detección de la diana Canal 2**
Control negativo	Negativo	Positivo
Control positivo	Positivo	No es significativo

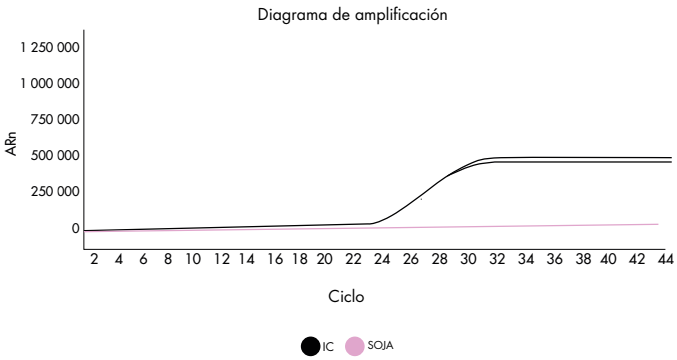
Si los controles no coinciden con estos resultados, el experimento debe repetirse.

Los resultados obtenidos mediante el presente método se interpretarán de la siguiente manera:

Detección de la diana Canal 1	**Detección de la diana Canal 2**	**Interpretación**
Positivo	No es significativo	Positivo
Ct = N/D	Positivo	Negativo
Ct = N/D	Ct = N/D	Inhibición**

Si la detección de la diana y del IC da negativo, esto indica la presencia de un inhibidor de la amplificación, y la muestra debe ser analizada nuevamente después de una dilución 1/10.





2. INSTRUMENTOS

Los instrumentos en tiempo real deben estar equipados con canales de detección FAM y ROX. No se necesitan requisitos especiales para los otros instrumentos necesarios (centrifugadora, bloque térmico y micropipetas).
El método se validó en un instrumento ABI 7500 (Applied Biosystems) y PikoReal (Thermo Scientific).

3. ESPECIFICIDAD

Se analizó un total de 51 especies no diana relacionadas con la diana o que se encuentran en el producto alimenticio y que podrían interferir en los resultados de las pruebas (Tabla 3.1). Se analizaron las especies utilizando 10 ng de ADN genómico. Se confirmó la idoneidad de los extractos de ADN para la amplificación de la región ITS, utilizando cebadores universales. Se confirmó la identificación de todas las especies mediante la secuenciación de los genes mitocondriales. Todos los extractos de ADN se analizaron por triplicado.

Código	Nombre de la especie	Código	Nombre de la especie
CR1	*Ovis aries*	VR12	*Sinapis alba*
CR4	*Sus domesticus*	VR2	*Prunus dulcis*
CR7	*Gallus gallus*	VR3	*Arachis hypogaea L.*
CR8	*Bos taurus*	VR4	*Avena sativa*
CR9	*Meleagris gallopavo*	VR5	*Corylus avellana, L.*
CR13	Equus equus	VR6	*Lycium barbarum*
PR1	*Auxis rochei*	VR7	*Anacardium occidentale*
PR3	*Sarda sarda/chiliensis*	VR8	*Bertholletia excelsa*
PR7	*Hymenopenaeus muelleri*	VR9	*Secale cereale*
PR8	*Litopenaeus vannamei*	VR10	*Hordeum vulgare*
PR9	*Salmo salar*	VR11	*Macadamia ternifolia*
PR10	*Gadus morhua*	VR13	*Brassica nigra*
PR12	*Sepiella japonica*	VR14	*Juglans regia L.*
PR13	*Merluccius senegalensis*	VR15	*Carya illinoensis K.*
PR14	*Illex argentinus*	VR16	*Curcubita pepo L.*
PR15	*Sepia aculeata*	VR17	*Pinus pinea*
PR16	*Merluccius paradoxus*	VR18	*Pistacia vera*
PR17	*Meretrix lyrata*	VR19	*Sesamum indicum*
PR19	*Ensis directus*	VR1	*Apium graveolens*
PR21	*Metapenaeus* sp. *(affinis/ensis)*	VR21	*Lupinus albus*
PR22	*Fenneropenaeus indicus*	VR22	*Triticum aestivum*
PR24	*Penaeus japonicus*	VR23	*Allium sativum*
PR37	*Uroteuthis duvauceli*	VR24	*Oryza sativa*
PR32	*Cerastoderma edule*	VR25	*Solanum tuberosum*
PR49	*Argopecten furfuratus*	VR29	*Pisum sativum*
		VR30	*Vigna unguiculata*

Tabla 3.1: Lista de especies utilizadas en la prueba de exclusividad

Resultado:

El método presentó una especificidad del 100 %, ya que ninguna de las especies arrojó un resultado positivo.

4. SENSIBILIDAD

4.1. Sensibilidad de la reacción PCR en tiempo real

Se determinó la sensibilidad de la reacción mediante pruebas en cantidades decrecientes y duplicadas de ADN diana en las condiciones experimentales del presente método. Se analizaron las siguientes cantidades de ADN genómico: 1 ng, 500 pg, 100 pg, 50 pg, 10 pg, 5 pg.

Resultado:

Se observó amplificación de la diana con cantidades de ADN de 50 pg o superiores. Por lo tanto, el límite de detección de la reacción se estableció en 50 pg de ADN genómico diana.

4.2. Sensibilidad de la prueba en mezclas de ADN

Se determinó la sensibilidad de la prueba según la proporción de ADN de la diana en una cantidad determinada de ADN total. Se analizaron las siguientes proporciones de ADN diana en 100 ng de ADN total: 10 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,01 %, 0,005 % y 0,001 %. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

Resultado:
Se observó amplificación de la diana en muestras que contenían el 0,05 % de ADN diana. Por lo tanto, el método puede detectar el 0,05 % del ADN de soja en 100 ng de ADN total.

5. ROBUSTEZ

Se determinó la robustez del presente método introduciendo variaciones experimentales y técnicas en los parámetros descritos en la Tabla 5.1, utilizando dos muestras positivas y dos negativas y realizadas por triplicado.

Parámetro	N.º de variaciones	Descripción
Temperatura de recocido	2	+2 °C; -2 °C.
Concentración de MgCl2	2	+0,5 mm; -0,5 mm
Ejecutor independiente		No aplicable
Diferentes equipos en tiempo real	2	ABI 7500 PikoReal, Thermo Scientific
Laboratorios independientes	1	Laboratorio de I+D Biopremier

Tabla 5.1: Parámetros del método sometidos a variaciones

Resultado:
Se obtuvieron resultados congruentes en todas las muestras y en todas las variantes de los parámetros analizados. Todas las muestras también presentaron los resultados esperados de las pruebas.

6. VERACIDAD

Se evaluó la veracidad del método utilizando 6 muestras de alimentos positivas y 17 negativas. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

Resultado:
Todas las muestras presentaron los resultados esperados de la prueba en todas las réplicas, lo que equivale a una veracidad del 100 %.

CARACTERÍSTICAS DE LA EJECUCIÓN DE LA VALIDACIÓN

Para determinar la tasa de falsos positivos y falsos negativos, el método se aplicó a 23 muestras de alimentos (6 muestras positivas y 17 negativas).
Se determinó el límite de detección del método en una mezcla que contenía una proporción de ADN diana en una cantidad dada de ADN total. Se analizaron las siguientes proporciones de ADN diana en 100 ng de ADN total: 10 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,01 %, 0,005 % y 0,001 %. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

1. TASA DE FALSOS POSITIVOS

Esto corresponde a la probabilidad de que una muestra negativa conocida haya sido clasificada por el método como positiva. La tasa de falsos positivos (que se puede expresar en porcentaje) se calcula mediante la expresión:

$P_{fpos}=n_{fpos}/n_{rneg}+n_{fpos} \times 100\ \%$

Donde:
P_{fpos}: Tasa de falsos positivos
n_{rneg}: Número de resultados negativos reales de la prueba
n_{fpos}: Número de muestras negativas conocidas y mal clasificadas

Resultado:
Para el presente método, se calculó la tasa de falsos positivos a partir de 23 muestras. El resultado final fue del 0 %

2. TASA DE FALSOS NEGATIVOS

Esto corresponde a la probabilidad de que una muestra positiva conocida haya sido clasificada por el método como negativa. La tasa de falsos negativos (que se puede expresar en porcentaje) se calcula mediante la expresión:

$P_{fneg}=n_{fneg}/n_{rpos}+n_{fneg} \times 100\ \%$

Donde:
P_{fneg}: Tasa de falsos negativos
n_{rpos}: Número de resultados positivos reales de la prueba
n_{fneg}: Número de muestras positivas conocidas y mal clasificadas

Resultado:
Para el presente método, se calculó la tasa de falsos negativos a partir de 23 muestras. El resultado final fue del 0 %

3. LÍMITE DE DETECCIÓN

3.1. Límite de detección de la reacción PCR en tiempo real

Se determinó el límite de detección de la reacción mediante pruebas en cantidades decrecientes triplicadas de ADN diana en las condiciones experimentales del presente método. Se analizaron las siguientes cantidades de ADN genómico: 1 ng, 500 pg, 100 pg, 50 pg, 10 pg, 5 pg.

Resultado:
El límite de detección determinado con una probabilidad del 0,95 % (tasa de falsos positivos <0,05) fue 50 pg de ADN genómico diana.

3.2. Límite de detección del método

Se determinó el límite de detección del método en una mezcla que contenía una proporción de ADN diana en una cantidad dada de ADN total. Se analizaron las siguientes proporciones de ADN diana en 100 ng de ADN total: 10 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,01 %, 0,005 % y 0,001 %. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

Resultado:
El límite de detección determinado con una probabilidad del 0,95 % (tasa de falsos positivos <0,05) fue del 0,05 % de ADN de soja en 100 ng de ADN total.

Valor predictivo positivo (PPV)

El PPV se calcula mediante la expresión:
$PPV=n_{rpos}/n_{rpos}+n_{fpos} \times 100\ \%$

Donde:
n_{rpos}: Número de resultados positivos reales de la prueba
n_{fneg}: Número de muestras positivas conocidas y mal clasificadas

Resultado:
El valor predictivo positivo determinado fue del 100 %.

Valor predictivo negativo (NPV)

El PPV se calcula mediante la expresión:

$NPV=n_{rneg}/n_{rneg}+n_{fneg} \times 100\ \%$

Donde:
n_{rneg}: Número de resultados negativos reales de la prueba
n_{fneg}: Número de muestras negativas conocidas y mal clasificadas

Resultado:
El valor predictivo negativo determinado fue del 100 %.

Criterios de aceptación

Inclusividad: 95 %
Exclusividad: 95 %
Selectividad: 95 %
Veracidad: 95 %
Tasa de falsos positivos: 5 %
Tasa de falsos negativos: 5 %

Declaración de ejecución

De acuerdo con las pruebas realizadas y los resultados indicativos obtenidos, se considera que la presente prueba permite lograr resultados adecuados conforme a los requisitos de Condalab y que la prueba queda validada.

La presente prueba permite la "Detección de soja mediante PCR en tiempo real".

Condalab

Laboratorios Conda S.A.
C/ Forja, 9. Torrejón de Ardoz 28850 Madrid, España
T. +34 91 761 02 00