Detección de *Cronobacter* spp. mediante PCR en tiempo real

INFORME DE VALIDACIÓN

ENSAYO

Detección de *Cronobacter* spp. mediante ensayo de PCR en tiempo real con nucleasa 5'.

EQUIPOS VALIDADOS

Applied Biosystems, modelo 7500; Thermo Scientific, modelo PikoReal

MUESTRAS (N)

Enriquecimientos preparados a partir de muestras de alimentos adecuadas. Durante la revalidación se analizaron muestras procedentes de sistemas externos de evaluación de la calidad de FAPAS, Instand e INSA-PHE.

ENSAYOS DE VALIDACIÓN

Inicio: 27/05/2015
Finalización: 21/08/2015

DEFINICIONES

Analito

ADN del microorganismo detectado por el método de análisis

Método cualitativo

Método de análisis cuya respuesta es la presencia o la ausencia del microorganismo, 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 del microorganismo) 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 menor cantidad de analito diana (ADN del microorganismo) 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 del microorganismo diana.

Exclusividad

No se han detectado microorganismos no diana.

Selectividad

Medida de la inclusividad y la exclusividad.

Sensibilidad (S)

Medida del número más bajo de células de analito que se pueden detectar en una sola reacción de prueba.

Especificidad (Sp)

Capacidad de exclusividad: identificar el microorganismo diana que se tenga intención de detectar y distinguirlo de otros organismos e impurezas similares.

Veracidad (T)

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

Precisión (P)

Grado de coincidencia entre ensayos independientes obtenidos en condiciones definidas. Depende solamente de la distribución de los errores aleatorios y no se relaciona con el verdadero valor de la prueba.

Valor predictivo positivo (PPV)

Probabilidad de obtener un resultado positivo en una muestra con una concentración del analito por encima de cierto nivel.

Valor predictivo negativo (NPV)

Probabilidad de obtener un resultado positivo en una muestra con una concentración del analito por encima de cierto nivel.

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 *Cronobacter* spp., con el objetivo de detectar este ADN patógeno en muestras de alimentos.
La prueba está diseñada para detectar el ADN del microorganismo diana en los productos alimenticios, tras el enriquecimiento en agua de peptona tamponada y la extracción de ADN. También se puede utilizar con piensos para animales y muestras del entorno. No es adecuado para diagnósticos humanos ni clínicos.
Se analizó la eficacia del método conforme a la ISO 22118:2011 y la ISO 16140:2003, y este cumple los requisitos establecidos en estas Normas Internacionales.

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 10 muestras de alimentos enriquecidas según el método descrito en la norma ISO 22964:2006. Estas muestras de alimentos incluían 4 matrices diferentes, elegidas de manera aleatoria en comercios:

· Leche en polvo neonatos
· Polvo de fórmula infantil
· Queso
· Leche

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 genómico de *Cronobacter* spp.

Control negativo (NC): reacción sin ADN diana

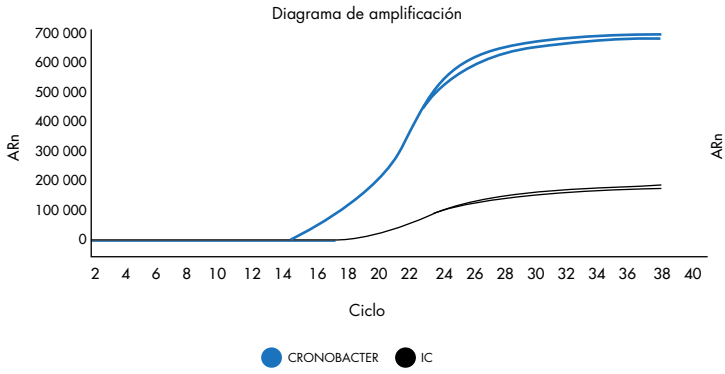
Cada reacción individual incluye:

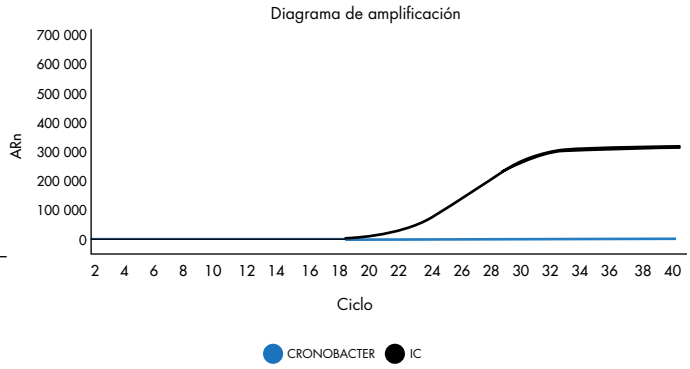
Control interno de la amplificación (IC): todas las reacciones incluyen un IC del ADN y el conjunto correspondiente de cebadores y sonda, etiquetados con un segundo fluoróforo. Este control se amplifica de forma simultánea, aunque independientemente de la secuencia de ADN diana. La inclusión del IC en 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 (*Cronobacter spp.*)	**Detección de la diana Canal 2 (IC)**	**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). Se obtuvieron resultados comparables con CFX96 (BioRad).

3. SELECTIVIDAD

3.1. Prueba de inclusividad

Se analizó un total de 2 cepas de *Cronobacter* spp. (Tabla 3.1). Se analizaron las cepas utilizando 2 ng de ADN genómico.

Código	Identificación de las cepas	Otros datos
MB 450	*Cronobacter sakazakii*	SO670
MB 451	*Cronobacter muytjensii*	ATCC 51329

Tabla 3.1: Lista de cepas de *Cronobacter* spp. utilizadas en la prueba de inclusividad

Resultado:

Todas las cepas se detectaron con el presente método, lo que equivale a una inclusividad del 100 %.

3.2. Prueba de exclusividad

Se seleccionaron las cepas de la prueba de exclusividad siguiendo las recomendaciones de la Norma Internacional ISO 22118:2011. Se analizó un total de 31 microorganismos no diana relacionados con el microorganismo diana o que se encuentran en el mismo hábitat y que podrían interferir en los resultados de las pruebas (Tabla 3.2). Se analizaron las cepas utilizando 10 ng de ADN genómico. Se confirmó la adecuación de los extractos de ADN para la amplificación del gen bacteriano 16S rRNA, utilizando cebadores universales. Se confirmó la identificación de todas las cepas mediante la secuenciación del gen 16S rRNA. Todas las cepas fueron analizadas por triplicado.

Código	Identificación de las cepas	Otros datos
MB 372	*Campylobacter jejuni subsp. jejuni*	NCTC 11351
MB 164	*Salmonella enteritidis*	Aislado local
MB 381	*Listeria innocua*	CECT 910
MB 240	*Escherichia coli O157:H7*	CDC 337
MB 357	*Escherichia coli*	NCTC 9001
MB 399	*Salmonella Typhimurium*	CECT 443
MB 373	*Campylobacter coli*	NCTC 11366
MB 22	*Vibrio cholerae*	Aislado local
MB 356	*Vibrio parahaemolyticus*	NCTC 10885
MB 223	*Bacillus cereus*	IFM1600
MB 115	*Citrobacter freundii*	Aislado local
MB 141	*Lactobacillus plantarum*	CECT 748 T
MB 144	*Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*	CECT 4022T
MB 150	*Staphylococcus aureus*	NCTC 6571
MB 302	*Pseudomonas aeruginosa*	Aislado local
MB 13	*Serratia marcescens*	Aislado local
MB 163	*Proteus vulgaris*	Aislado local
MB 365	*Enterococcus faecalis*	Aislado local
MB 306	*Enterococcus hirae*	Aislado local
MB 147	*Staphylococcus epidermidis*	Aislado local
MB 267	*Shigella flexneri*	Aislado local
MB 249	*Yersinia enterocolitica*	Aislado local
MB 178	*Klebsiella pneumoniae*	Aislado local
MB 449	*Brochothrix thermosphacta*	ATCC 11509
MB 274	*Legionella pneumophila*	Aislado local
MB 278	*Legionella micdadei*	Aislado local
MB 607	*E. coli stx2*	Aislado local
MF 128	*Saccharomyces cerevisae*	CECT
MF 129	*Aspergillus niger*	Aislado local
MB 385	*Listeria monocytogenes*	CECT 4031
MB 388	Listeria monocytogenes	Serotipo 1/2a o 3a

Tabla 3.2: Lista de cepas 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 triplicadas de ADN diana en las condiciones experimentales del presente método. Se analizaron las siguientes cantidades de ADN genómico: 10 ng, 5 g, 1 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg, 500 fg, 50 fg, 25 fg y 5 fg.

Resultado:
Se observó amplificación de la diana con cantidades de ADN de 25 fg o superiores. Por lo tanto, el límite de detección de la reacción se estableció en 500 fg de ADN genómico diana.

4.2. Sensibilidad de la prueba

Se determinó la sensibilidad de la prueba en muestras de alimentos contaminadas artificialmente con un número decreciente de células bacterianas, cumpliendo los requisitos de la norma ISO 22118. Se analizó la sensibilidad en cinco matrices alimentarias diferentes: Carne de pollo, ensalada, yogur, queso y requesón. El enriquecimiento se realizó según ISO 22964:2006, con 25 g de cada muestra, después de inocular 0, 1-10 y 10-10^2 ufc de *Cronobacter*. Todos los procedimientos, comenzando por la extracción de ADN, se realizaron por triplicado.

Resultado:
Se observó amplificación de la diana en muestras contaminadas con 1-10 ufc/25 g o superiores. No se obtuvo amplificación en las muestras no contaminadas (inoculadas con 0 ufc). Por lo tanto, el método puede detectar 1-10 ufc en 25 g de muestras de alimentos (LOD).

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.° de variaciones	Descripción
Temperatura de recocido	2	+2 °C; -2 °C.
Concentración de MgCl2	2	+0,5 mm; -0,5 mm
Ejecutor independiente	2	No aplicable
Diferentes equipos en tiempo real	3	ABI 7500 PikoReal, Thermo Scientific BioRad CFX96
Laboratorios independientes	2	Laboratorio de I+D Biopremier Laboratorio de la Autoridad Portuguesa de Seguridad Alimentaria

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 5 muestras de alimentos positivas y 5 negativas en la diana, respectivamente, correspondientes a las siguientes matrices de alimentos:

· Leche en polvo neonatos
· Polvo de fórmula infantil
· Hortalizas
· Queso
· Leche

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 17 muestras (8 muestras positivas y 9 negativas), correspondientes a 4 matrices de alimentos.

Para determinar el límite de detección del método, se inocularon 5 de las muestras positivas considerando 3 niveles de contaminación: 0, de 1 a 10 y de 10 a 100 ufc en 25 g de muestra. Todos los procedimientos se realizaron según lo definido para el presente método. Todos los experimentos, comenzando por la extracción de ADN, se realizaron por triplicado.

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:
$P_{fpos}=n_{fpos}/n_{rneg}+n_{fpos}$ x 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 17 muestras reales. 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:
$P_{fneg}=nfneg/n_{rneg}+n_{fneg}$ x 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 positivos a partir de 17 muestras reales. 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, 50 pg, 5 pg, 500 fg, 50 fg, 25 fg y 5 fg.

Resultado:
El límite de detección determinado con una probabilidad del 0,95 % (tasa de falsos positivos < 0,05) fue 25 fg de ADN genómico de Cronobacter spp.

3.2. Límite de detección del método
El límite de detección de la prueba se determinó en muestras de alimentos contaminados artificialmente con un número decreciente de células bacterianas, siguiendo los requisitos de la norma ISO 22118:2011, utilizando cinco muestras de alimentos para bebés. El enriquecimiento se realizó según la norma ISO 22964:2006, con 25 g de cada muestra, después de inocular 0, 1-10, 10-10^2 y 102-103 ufc de *Cronobacter* spp. Todos los procedimientos, comenzando por la extracción de ADN, se realizaron por triplicado.

Resultado:
El límite de detección determinado con una probabilidad del 0,95 % (tasa de falsos positivos <0,05) fue 1-10 ufc de *Cronobacter* spp.

Valor predictivo positivo (PPV)

El PPV se calcula mediante la expresión:

$PPV=n_{rpos}/n_{rpos}+n_{fpos}$ x 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:

$NPV=n_{rneg}/n_{rneg}+n_{fneg}$ x 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 *Cronobacter* spp. mediante PCR en tiempo real" en muestras de alimentos, tras el enriquecimiento.

Condalab

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