

DIRECTRICES SOBRE CRITERIOS DE RENDIMIENTO Y VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS DE DETECCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE SECUENCIAS ESPECÍFICAS DE ADN Y DE PROTEÍNAS ESPECÍFICAS EN LOS ALIMENTOS*

CAC/GL 74-2010

SECCIÓN 1 – INTRODUCCIÓN

1. Los métodos de análisis molecular e inmunológico son en la actualidad los instrumentos reconocidos para la determinación de los analitos de ADN y proteínas en los alimentos. Sin embargo, para que los resultados obtenidos por tales métodos en diferentes laboratorios obtengan amplia aceptación y confianza por su fiabilidad, es necesario que los métodos de análisis cumplan determinados criterios de calidad.
2. Estas directrices proporcionan criterios adecuados para validar el rendimiento de métodos elaborados con el fin de detectar secuencias específicas de ADN o proteínas específicas en los alimentos.
3. La información relativa a las consideraciones generales para los métodos de validación destinados al análisis de secuencias específicas de ADN y de proteínas específicas figura en la primera parte de las presentes Directrices. Se ponen a disposición anexos específicos que contienen información sobre validación de métodos de PCR cuantitativos, validación de métodos de PCR cualitativos y validación de métodos basados en proteína.

SECCIÓN 1.1 – FINALIDAD Y OBJETIVOS

4. El objetivo de este documento es apoyar el establecimiento de métodos moleculares e inmunológicos para la detección, la identificación y la cuantificación en los alimentos de secuencias específicas de ADN y de proteínas específicas que generen resultados con reproducibilidad comparable cuando se lleven a cabo en laboratorios diferentes.
5. Las directrices van dirigidas a proporcionar una orientación sobre cómo establecer métodos para detectar e identificar secuencias de ADN y proteínas específicas en los alimentos definiendo criterios de validación adecuados y si un método cumple o no dichos criterios a partir de las características de rendimiento de un método.

En las directrices se concretan los criterios pertinentes y se explica cómo considerar tales criterios, es decir:

- proporcionando la explicación para los criterios más pertinentes y
- mostrando cómo averiguar si un método cumple o no los requisitos de los criterios de que se trate.

SECCIÓN 1.2 – ÁMBITO DE APLICACIÓN

6. Estas directrices proporcionan información sobre criterios para la validación de métodos de análisis de los alimentos que conlleven la detección, la identificación y la cuantificación de secuencias específicas de ADN y de proteínas específicas de interés que puedan encontrarse en alimentos, incluidos aquellos que contengan materiales obtenidos por medios biotecnológicos modernos. Estos métodos moleculares e inmunológicos son aplicables en una amplia serie de usos, como las pruebas de biomarcadores en alimentos, incluidos los obtenidos por medios biotecnológicos modernos y la autenticación de alimentos, y pueden ser utilizados por los laboratorios encargados responsables del análisis de alimentos.

* Para aplicaciones como los alimentos derivados de la biotecnología moderna, la autenticación de alimentos, la especiación de alimentos y otros usos.

SECCIÓN 2 – VALIDACIÓN DE MÉTODOS

7. La Comisión del Codex Alimentarios hace especial hincapié en la aceptación de métodos de análisis que hayan sido validados mediante un ensayo en colaboración que sea conforme a un protocolo aceptado internacionalmente con arreglo a la norma ISO 5725:1994 o al protocolo armonizado AOAC/UIQPA. En esta área, podría surgir la necesidad de adoptar una validación formal por parte de un laboratorio único como medida provisional en caso de no que no existieran datos de ensayos en colaboración. Sin embargo, los métodos utilizados para el análisis de secuencias y proteínas de ADN deben poderse aplicar en muchos laboratorios.

Sección 2.1 – Enfoque por criterios

8. En estas directrices se aplica el “enfoque por criterios”.

Sección 2.2 – Criterios generales de método

9. Los criterios generales para la selección de métodos de análisis se han adoptado en el Manual de procedimiento del Codex. En las presentes directrices se aplican dichos criterios y otros adicionales se detallan en los anexos oportunos.

Sección 2.3 – Proceso de validación

10. La validación del método es un proceso de determinación de las características y las limitaciones del rendimiento de un método analítico. Los resultados de un proceso de validación definen qué analitos pueden determinarse en qué tipo de matrices en presencia de qué interferencia. El ejercicio de validación da como resultado valores precisos y conformes de un método analítico en particular en las condiciones examinadas.

11. La validación formal de un método representa la conclusión de un proceso largo que comprende los siguientes pasos principales:

- **Validación previa del método.** La validación previa debería realizarse caso por caso, en función de las necesidades. La validación previa debe garantizar que un método tiene un rendimiento que permite que se llegue a una conclusión exitosa del estudio de validación, es decir, la validación previa debe proporcionar pruebas de que el método resulta adecuado para la finalidad prevista. La validación previa debe realizarse de preferencia con la participación de 2-4 laboratorios. Deben realizarse análisis estadísticos (por ejemplo, de la “repetibilidad” y la “reproductibilidad”) en función del procedimiento de validación que vaya a utilizarse posteriormente.
- **Validación del método.** La validación mediante un ensayo en colaboración es una tarea cara y, normalmente, solo se realiza una vez que el método ha demostrado tener un rendimiento aceptable en un único laboratorio y en un estudio de validación previa.

SECCIÓN 3 – CONSIDERACIÓN ESPECÍFICA PARA LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE DETECCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE SECUENCIAS DE ADN Y PROTEÍNAS

Sección 3.1 – Desde la elaboración del método a la validación formal

12. Las metodologías comunes para el análisis basado en el ADN son métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizados para detectar una secuencia específica (determinada) de ADN. Los enfoques comunes para la proteína utilizan el método de ensayo con sustancias inmunoabsorbentes unidas a enzimas (ELISA) y mecanismos de flujo laterales. En lo que respecta al análisis basado en el ADN, el enfoque de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es el que se aplica de manera más general actualmente, a pesar de que se podrían emplear otros métodos basados en ADN que alcanzan el mismo objetivo, en caso de que se validaran adecuadamente. En el presente documento se examinan los enfoques basados en ADN y los basados en proteína.

Sección 3.1.1 – Criterios para la aceptación de los métodos (condición exigida para la validación)

13. Para evaluar un método antes de la validación, es necesario disponer de información sobre el método y sobre su comprobación, según se detalla en el Anexo I.

14. La evaluación del método debe verificar el cumplimiento de los requisitos previos de principio para utilizar tal método a efectos del Codex. En esta sección se describen los criterios de aceptación del método

que este debe cumplir para que se pueda llevar a cabo una validación previa y un ensayo completo en colaboración.

Sección 3.1.2 – Aplicabilidad del método

15. La aplicabilidad de los métodos podría determinarse confirmando si los métodos pueden utilizarse en los alimentos deseados con el rendimiento exigido y ello debería hacerse constar con claridad. En particular, en el análisis de las secuencias de ADN y de la proteína, algunos métodos que pueden aplicarse a una sola matriz de materia prima no necesariamente son aplicables a las matrices complejas o a los alimentos elaborados, ya que el ADN y la proteína se desnaturalizarán.

16. En principio, el método debería ser aplicable a la matriz pertinente. En el caso de métodos de “uso general” para identificar y cuantificar secuencias de ADN y proteínas en una serie de matrices de alimentos, debería haber disponible al menos un método de extracción aplicable a una matriz general de alimentos.

Sección 3.1.3 – Condición de principio

17. Los métodos basados en el ADN deberían detectar, identificar y pueden cuantificar los niveles de secuencias específicas de ADN. Los métodos basados en la proteína deberían detectar, identificar y pueden cuantificar los niveles de una proteína específica en el producto.

18. Actualmente, el método de detección basado en ADN suele consistir en la metodología de la PCR e incluye:

- un protocolo que describe un método de extracción que es aplicable a una matriz pertinente;
- un protocolo que describe las condiciones, incluido el aparato empleado, en las que se puede utilizar la PCR para detectar la secuencia de ADN diana;
- una descripción de las secuencias cebadoras del oligonucleótido que amplifican de manera inequívoca la secuencia de ADN diana;
- si procede, una descripción de las secuencias de sonda del oligonucleótido fluorescente que identifican de manera inequívoca la secuencia de ADN diana;
- una descripción de las secuencias cebadoras del oligonucleótido que amplifican una secuencia de ADN específica al taxón la cual debería estar presente en la matriz convencional del alimento independientemente de la presencia del analito específico a fin de diferenciar un resultado negativo de los procesos fallidos de extracción o amplificación y para cuantificar la cantidad del ADN diana en relación con el ADN específico al taxón;
- si procede, una descripción de las secuencias de sonda del oligonucleótido fluorescente que identifican de manera inequívoca la secuencia de ADN específica al taxón;
- una descripción del método utilizado para detectar el ADN;
- muestras y normas de control apropiadas;
- descripciones de las operaciones realizadas para calcular el resultado.

19. Los métodos basados en proteína normalmente consisten en un método cuantitativo o cualitativo. Se suele tratar de sistemas de análisis con sustancias inmunoabsorbentes y consisten en lo siguiente:

- un protocolo que describe un método de extracción que es aplicable a una matriz pertinente;
- un protocolo que describe las condiciones, incluido el aparato empleado, en las que se puede utilizar el análisis con sustancias inmunoabsorbentes para detectar la proteína diana;
- un soporte recubierto por un anticuerpo;
- un anticuerpo secundario conjugado con una enzima;
- un sustrato enzimático para el desarrollo del color;
- solución tamponada limpiadora y para la extracción de muestras;
- una descripción del método utilizado para detectar la proteína;

- muestras y normas de control apropiadas;
- descripciones de las operaciones realizadas para calcular el resultado.

20. El método debería cumplir los requisitos siguientes:

- los métodos basados en la proteína deberían permitir la detección, identificación o cuantificación inequívocas de un antígeno o epítipo determinado;
- los métodos de examen basados en el ADN se utilizan para detectar un ADN diana que se encuentra en múltiples organismos. Por ejemplo, los métodos de examen que se utilizan para detectar múltiples incidencias de transformación deberían permitir la detección de una secuencia diana de ADN que sea común a varias incidencias de transformación;
- los métodos específicos basados en el ADN que se utilizan para la detección, la identificación o la cuantificación inequívocas de un organismo específico que pueda combinarse con organismos similares deberían permitir la detección, identificación y cuantificación inequívocas de una secuencia de ADN que sea única o específica para dicho organismo. Por ejemplo, los métodos específicos para la diana que se utilizan para la detección de una sola incidencia de transformación deberían permitir la detección, identificación y/o cuantificación inequívocas de una secuencia diana de ADN que sea única o específica para esa incidencia de transformación. Para la autenticación de alimentos, las secuencias específicas de la diana deberían definir únicamente el taxón según sea necesario;
- los métodos basados en el ADN específicos para un taxón que se utilizan para la detección o la cuantificación relativa de un ADN diana deberían permitir la detección, identificación y cuantificación inequívocas de una secuencia diana de ADN que sea única o específica para dicho taxón;
- en el caso de los métodos específicos para la diana y el taxón utilizados en la cuantificación relativa, se recomienda identificar el fragmento amplificado, por ejemplo mediante hibridación con sonda o cualquier otro método apropiado equivalente.

Sección 3.14 – Unidad de medida y comunicación de resultados

21. Deberían especificarse las unidades adecuadas de medida (por ejemplo: número de copias de la diana o equivalentes molares), los criterios de rendimiento y de comunicación de los datos para cada método antes de su uso. Para los análisis cualitativos, los resultados pueden ofrecerse como presente o no detectado, no habiendo por tal motivo unidad de medida.

22. Las mediciones se pueden expresar explícitamente como peso/peso o por porcentaje relativo. Sin embargo, en ninguno de los métodos actuales (basados en el ADN o en proteína) se pueden hacer estas mediciones directamente.

Sección 3.1.5 – Incertidumbre de la medición

23. Según se menciona en las Directrices del Codex sobre la incertidumbre de la medición (CAC/GL54-2004), se exige que los laboratorios calculen la incertidumbre de sus mediciones cuantitativas. La preparación de la muestra y los métodos analíticos constituyen dos fuentes importantes de error que deberían ser examinadas al evaluar una medición analítica. Los analistas que utilizan métodos que han sido validados con arreglo a estas directrices deberían disponer de suficiente información para poder estimar la incertidumbre de su resultado.

24. Para obtener mayores detalles se puede consultar, en las Directrices del Codex sobre la incertidumbre de la medición (CAC/GL54-2004), la parte titulada Utilización de resultados analíticos: planes de muestreo, relación entre los resultados analíticos, la incertidumbre en la medición, los factores de recuperación y las disposiciones de las normas del Codex en el Manual de procedimiento del Codex.

Sección 3.1.6 – Enfoque modular de la validación del método

25. El término “método” hace referencia a todos los procedimientos experimentales necesarios para estimar el mesurando en una matriz en particular. Para un material determinado, puede comprender los procesos para la extracción del ADN o la proteína y la cuantificación final en un sistema de PCR o de ensayo con sustancias inmunoabsorbentes, o la determinación de la presencia o ausencia del analito a través de un

método cualitativo. En tal caso, toda la cadena comprendida entre la extracción y la etapa de análisis constituye un método. Sin embargo, se puede utilizar el mismo método de preparación de la muestra (por ejemplo: molido) en combinación con el mismo proceso de aislamiento del ADN o la proteína para varios análisis posteriores diferentes con el fin de obtener eficiencias económicas, siempre que se mantengan sin variación los procesos validados del método.

26. Resultaría inadecuado introducir procesos alternativos, como por ejemplo un proceso diferente de aislamiento del ADN o de la proteína, en un método validado sin realizar estudios adicionales para poner de manifiesto que la sustitución no afecta al rendimiento del método.

Sección 3.2 – Requisitos de las pruebas en colaboración

Sección 3.2.1 – Información general

27. La finalidad del ensayo en colaboración es validar los datos resultantes de los ensayos previos mediante un ejercicio de validación previa o de laboratorio único y determinar la precisión metodológica en lo que respecta a la repetibilidad y la reproductibilidad.

28. Se deberían interpretar y comparar cuidadosamente los valores de los parámetros de rendimiento que resulten de los estudios de validación. Los valores exactos y su interpretación pueden depender del rendimiento y del alcance del método.

29. Si ya se ha realizado un ensayo en colaboración con arreglo a la norma ISO 5725:1994 o al Protocolo armonizado AOAC/UIQPA, la información se puede utilizar para evaluar la aceptabilidad del método a los efectos del Codex.

Sección 3.2.2 – Requisitos mínimos de rendimiento

30. En un ensayo en colaboración, el rendimiento del método debe ser conforme a las partes pertinentes de los criterios de aceptación del método y cumplir los requisitos de rendimiento del método que se indican a continuación para el ensayo en colaboración. En particular, se debería evaluar el cumplimiento de los criterios de sensibilidad, repetibilidad o reproducibilidad, las desviaciones típicas y la conformidad.

31. Además de los criterios de aceptación del método, se deberían evaluar al menos los requisitos de rendimiento del método enumerados en el Anexo I a partir de los datos experimentales del ensayo en colaboración.

32. Los métodos y sus datos asociados de validación se revisarán con regularidad a medida que evolucionan los conocimientos científicos y se obtiene más experiencia en materia de validación y ensayos en colaboración. Las directrices se complementan con información práctica sobre las fases operacionales del proceso de validación.

Sección 3.2.3 – Materiales del ensayo en colaboración

33. En principio, el método debería ser aplicable a la matriz pertinente (es decir, la matriz sobre la que se hayan desarrollado especificaciones) y debería ser comprobado en ella.

34. Los efectos de los materiales o de las matrices sobre la fase de extracción de un protocolo son importantes para cualquier análisis. Cuando se comunican los resultados de un estudio de validación es importante que el informe incluya detalles de la matriz analizada e indique si se empleó una proteína o un ADN purificados como diana del análisis.

Sección 3.2.4 – Información específica sobre la validación de los métodos

35. En los Anexos II y III figura información específica sobre la validación de los métodos de PCR cuantitativos y cualitativos, respectivamente.

36. En el Anexo IV se presenta información específica sobre la validación de métodos basados en proteína cuantitativos y cualitativos.

SECCIÓN 4 – REQUISITOS SOBRE EL CONTROL DE CALIDAD

Sección 4.1 – Calidad de los laboratorios

37. En CAC/GL 27 se proporciona orientación para los laboratorios que intervienen en la importación y exportación de alimentos. Esta orientación se basa en el cumplimiento de la norma ISO/IEC 17025, la comprobación de la competencia y el control interno de la calidad, así como en el uso de métodos de análisis validados según los requisitos del Codex.

Sección 4.2 – Material de referencia

38. Normalmente, se exige un material de referencia adecuado para la validación de un método. Se pueden utilizar diferentes matrices para elaborar materiales de referencia o normas de funcionamiento para los métodos de detección de secuencias y proteínas de ADN. Cada una de ellas tiene sus propias ventajas e inconvenientes para cada fin. La forma física del material de referencia determina su adaptabilidad para ser usado en cualquier método. Para los materiales molidos, las diferencias en la distribución del tamaño de las partículas entre los materiales de referencia y las muestras habituales pueden afectar a la eficiencia de extracción de la proteína diana o del ADN y a la reproducibilidad del método, debido a un error de muestreo.

39. El material de referencia para los métodos basados en el ADN puede ser una matriz que contenga el analito, ADN extraído de una matriz que contenga el analito, un plásmido que contenga el ADN específico o, si no están disponibles materiales de referencia, materiales de muestra de control, por ejemplo procedentes de sistemas de ensayo del rendimiento. El empleo de ADN plásmido o amplicón exige la atenta consideración de la opción que va a incorporarse en el plásmido o el amplicón con el fin de asegurar que el ADN plásmido o amplicón corresponda a la finalidad requerida.

40. Como materiales de referencia para los métodos basados en proteína se pueden utilizar, por ejemplo, la propia proteína purificada de microbios recombinantes, como *E. coli*, la matriz molida de una planta (normalmente, hoja o grano) o una fracción de alimento elaborado.

SECCIÓN 5 – INFORMACIÓN TÉCNICA Y METODOLÓGICA

Se enumeran como referencias los aspectos técnicos y metodológicos de los métodos basados en el ADN y en proteína:

Allmann M, Candrian U, Hoefelein C y Luethy J (1993). Polymerase Chain Reaction (PCR): a possible alternative to immunochemical methods assuring safety and quality of food. *Lebensm. Unters. Forsch* 196:248-251.

Anklam E, Gadani F, Heinze P, Pijnenburg H y Van den Eede G (2002). Analytical methods for Detection and Determination of Genetically Modified Organisms (GMO's) in Agricultural Crops and Plant-derived Food Products. *European Food Research and Technology* 214:3-26.

Asensio L (2007). Review: PCR-based methods for fish and fishery products authentication. *Trends in Food Science & Technology* 18(11): 558-566.

Asensio L, González I, García T y Martín R (2008). Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control* 19:1-8.

Carnegie, PR (1994). Quality control in the food industries with DNA technologies. *Australas. Biotechnol.* 4(3):146-9.

Chapela MJ, Sotelo CG, Pérez-Martín RI, Pardo MA, Pérez-Villareal B, Gilardi P y Riese J (2007). Comparison of DNA extraction methods from muscle of canned tuna for species identification. *Food Control.* 18(10):1211-1215.

Comisión del Codex Alimentarius, *Manual de Procedimiento*. Utilización de resultados analíticos: muestreo, relación entre los resultados analíticos, la incertidumbre de la medición, los factores de recuperación y las disposiciones de las normas del Codex.

CAC/GL 54-2004. Directrices del Codex sobre la incertidumbre de la medición.

Colgan S, O'Brien LO, Maher M, Shilton N, McDonnell K y Ward S (2001). Development of a DNA-based assay for species identification in meat and bone meal. *Food Research International* 34(5):409-414.

Dahinden I, von Büren M y Lüthy J (2001). A Quantitative competitive PCR system to detect contamination of wheat, barley or rye in gluten-free food for coeliac patients. *European Food Research and Technology* 212(2):228-233.

Dieffenbach CW y Dveksler GS (1993). Setting up a PCR laboratory. *PCR Methods Appl.* 3(2):S2-7.

Norma ISO 5725:1996 "Accuracy (trueness and precision) of a measurement methods and results". Ginebra: Organización Internacional de Normalización.

ISO 21569:2005 Foodstuffs - Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - Qualitative nucleic acid based methods. Ginebra: Organización Internacional de Normalización.

ISO 21570:2005. Foodstuffs - Methods for the detection of genetically modified organisms and derived products - Quantitative nucleic acid based methods. Ginebra: Organización Internacional de Normalización

ISO/DIS 24276:2006. Foodstuffs - Nucleic acid based methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - General requirements and definitions. Ginebra: Organización Internacional de Normalización.

Norma ISO/IEC 17025:2005: General Requirements for the Competence of Testing and Calibration laboratories. Ginebra: Organización Internacional de Normalización.

Grothaus GD, Bandla M, Currier T, Giroux R, Jenkins R, Lipp M, Shan G, Stave J., y V. Pantella (2007). Immunoassay as an Analytical Tool in Agricultural Biotechnology. *Journal of AOAC International*. 85: 3, págs. 780-786.

Holst-Jensen A. y Berdal KG (2004). The modular analytical procedure and validation approach and the units of measurement for genetically modified materials in foods and feeds. *Journal of AOAC International* 87(4):927-36.

Horwitz E. ISO/AOAC/IUPAC Harmonized Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies (1995). *Pure and Applied Chemistry* 67:331-343.

Kwok S e Higuchi R (1989). Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339(6221):237-238.

Lipp M, Shillito R, Giroux R, Spiegelhalter F, Charlton S, Pinero D y Song P (2005) Polymerase Chain Reaction Technology as an analytical tool in Agricultural Biotechnology. *Journal of AOAC International* 88 (1):36-155.

Meyer R, Candrian U (1996). PCR-based DNA Analysis for the Identification and Characterization of Food Components. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. 29(1-2):1-9.

Mifflin TE (2007) Setting Up a PCR Laboratory. *Cold Spring Harbor Protocols* 14 (doi:10.1101/pdb.top14)

Miraglia M, Berdal KG, Brera C, Corbisier P, Holst-Jensen A, Kok EJ, Marvin HJP, Schimmel H, Rentsch J, van Rie JPPF y Zagon J (2004). Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. *Food and Chemical Toxicology* 42:1157-1180.

Newton CR, Herbitter A y Gubler U (1995). PCR: Essential Data. Hoboken (NJ): J. Wiley & Sons.

Olexova L, Dovičovičová L, Švec M, Siekel P, Kuchta T. (2006). Detection of gluten-containing cereals in flours and "gluten-free" bakery products by polymerase chain reaction. *Food Control* 17(3):234-237 .

Poms, RE; Klein CL, Anklam E (2004). Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Addit. Contam.* 21(1):1-31.

Trapmann S, Burns M, Broll H, Macarthur R, Wood RKS, Žel Jana (2009). Guidance document on measurement uncertainty for GMO testing laboratories. *EUR - Scientific and technical research series*. Luxemburgo: Oficina de Publicaciones Oficiales de las Comunidades Europeas.

Turci M, Sardaro MLS, Visioli G, Maestri E, Marmioli, M y Marmioli N (2010). Evaluation of DNA extraction procedures for traceability of various tomato products. *Food Control*. 21(2):143-149.

Williams R. (2005). Gene tests served up to tell fine foods from fakes. *Nature* 434:262.

Woolfe M y Primrose S (2004). Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trends in Biotechnology* 22(5):222-6.

ANEXO I: INFORMACIÓN REQUERIDA CUANDO SE ESTUDIA LA VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1. Se debe proporcionar una descripción completa y detallada de todos los componentes del método. Se debe abordar de manera explícita el uso de placas múltiples para la PCR y los métodos de proteína, como ejemplos. La descripción también debe incluir información acerca del alcance del método y se debe indicar claramente la unidad de medida, así como los datos siguientes:

Propósito y relevancia del método

2. El propósito del método debería indicarse en el mismo. El método debería ser adecuado para la finalidad buscada.

Base científica

3. Se debe proporcionar una visión general de los principios científicos en los que se basa el método (por ejemplo, la biología molecular que sustenta el uso del método de PCR en tiempo real).

Especificación del modelo de predicción/modelo matemático necesario para el método

4. Las técnicas basadas en ADN y proteína empleadas para detectar y cuantificar las secuencias y proteínas de ADN se basan en principios diferentes. En la PCR el ADN diana se amplifica de manera exponencial. Además, la cuantificación mediante la PCR en tiempo real a menudo se basa en dos ensayos de PCR independientes: uno para el ADN diana y otro para la secuencia de ADN específica al taxón. En contraste con la PCR, los ensayos inmunoabsorbentes suponen la vinculación de una o más capas de anticuerpos con cada molécula diana inicial y la amplificación de la señal es proporcional al número de moléculas reporteras y, si procede, al tiempo de reacción enzimática.

5. Si el cálculo de los resultados depende de una relación matemática, se debería indicar y registrar este hecho (por ejemplo, el método $\Delta\Delta Ct$ o una recta de regresión o una curva de calibración obtenida por otros medios). Se deben proporcionar instrucciones que permitan aplicar el modelo correctamente. Entre ellas, en función del método, se podrían proporcionar el número e intervalo de niveles que se deben analizar, el número mínimo de réplicas y/o diluciones que se deben incluir en los análisis habituales o los medios y los intervalos de confianza para evaluar la bondad del ajuste.

INFORMACIÓN ESPECÍFICA EXIGIDA PARA LOS MÉTODOS BASADOS EN EL ADN

6. Se debería proporcionar, en particular, la siguiente información adicional para los procedimientos basados en ADN:

Pares de cebadores

7. En los métodos generales se deben proporcionar los pares de cebadores definidos y la secuencia a la que se dirigen. Se deben especificar claramente recomendaciones sobre la eficiencia o el uso del conjunto de cebadores, en particular si se pueden examinar o cuantificar.

- ***Longitud de amplicón***

8. La elaboración de los alimentos conduce normalmente a la degradación del ADN diana. La longitud del producto amplificado podría influir en el rendimiento de la PCR. Por lo tanto, si se eligen tamaños menores de amplicón (dentro de lo razonable) se aumentará la posibilidad de obtener una señal positiva en el análisis de los alimentos muy elaborados. Por lo general, la longitud del fragmento amplificado para la secuencia de ADN específica al taxón y la secuencia diana deberían tener un tamaño similar.

- ***Si el método es específico al instrumento o a compuestos químicos***

9. Actualmente, hay disponibles diversos tipos de instrumentos y compuestos químicos en tiempo real. Dichos instrumentos y compuestos químicos podrían tener rendimientos diferentes en lo que respecta a la

estabilidad de los reactivos y las características de calentamiento y enfriamiento, lo que afecta las tasas de desnivel y el tiempo necesario para que se produzca la PCR completa.

10. Además de las diferencias del sistema de calentamiento y enfriamiento, hay otras diferencias en la técnica y los programas informáticos utilizados para inducir y registrar posteriormente la fluorescencia. La detección y la cuantificación de la fluorescencia podrían variar en función de los instrumentos y los programas informáticos utilizados para el registro. Los métodos cualitativos tienden a ser menos específicos al instrumento que los métodos cuantitativos.

11. Los métodos dependen generalmente de los instrumentos y los compuestos químicos y no pueden transferirse a otros equipos o a otros compuestos químicos sin ser evaluados y/o modificados.

- ***Si se realizan amplificaciones simples o de tipo múltiplex de la PCR***

12. La utilización de más de un conjunto cebador en una reacción única se denomina PCR múltiplex.

13. La información facilitada debería demostrar la solidez del método para la posibilidad de transferencia entre laboratorios. Con esto se quiere decir que el método debería haber sido objeto de comprobación por otro laboratorio, como mínimo, además del que lo ha desarrollado. Éste es un requisito importante para el éxito de la validación del método.

INFORMACIÓN ESPECÍFICA EXIGIDA PARA LOS MÉTODOS BASADOS EN PROTEÍNA

14. Se debería proporcionar la siguiente información adicional para los procedimientos basados en proteína:

Aplicabilidad del ensayo

15. La elaboración de alimentos llevará generalmente al deterioro o desnaturalización de la proteína diana, lo que puede dar lugar a un cambio sustancial en la inmunorreactividad. Los inmunoensayos deberían ser objeto de evaluación en cuanto a su aplicabilidad a la diana en los productos elaborados. Se deberían proporcionar resultados prácticos de la prueba de aplicabilidad del método para la diana en los alimentos elaborados.

Efecto de gancho

16. En un dispositivo de flujo lateral y en un ensayo sobre placa basado en anticuerpos, un efecto de gancho (de saturación) podría dar lugar a un falso resultado negativo. Es necesaria una demostración exhaustiva de que la gama de concentración de la prueba cubre cómodamente la necesidad práctica de muestras diana del análisis. Por tanto, se deberían facilitar resultados prácticos de ensayos del efecto gancho en matrices diana.

Método de confirmación

17. En el caso de los inmunoanálisis, los anticuerpos pueden presentar una reacción cruzada con otras proteínas presentes en la matriz; por tanto, es necesario demostrar la selectividad de los ensayos. Puede emplearse otro método de confirmación. Pueden facilitarse resultados experimentales de ambos métodos con alícuotas de las mismas muestras analíticas de concentración conocida.

INFORMACIÓN ACERCA DEL RENDIMIENTO DEL MÉTODO

Comprobación de la selectividad

18. El método debe ser claro sobre el uso de controles negativos adecuados, como el material de origen animal y vegetal, las cepas diferentes o la secuencia diana de ADN que debería emplearse con este fin, si se han definido.

19. Se deberían proporcionar los resultados prácticos de la comprobación del método con material de ADN procedente de especies o variedades no diana y ADN de especies o variedades de referencia. Este ensayo debería incluir los materiales relacionados estrechamente y casos en que los límites de la sensibilidad se comprueben realmente. Además, podría ser adecuado, especialmente para la secuencia de ADN específico al taxón, comprobar otras fuentes de alimentos similares para reducir la posibilidad de obtener un falso resultado positivo.

20. Asimismo, para los métodos de proteína, se deberían facilitar resultados prácticos de la comprobación del método con proteínas de especies/variedades/rasgos no diana y estrictamente pertinentes, así como de proteína diana purificada o de materiales positivos de control.

Comprobación de la estabilidad

21. Se pueden proporcionar los resultados empíricos de la comprobación de los métodos (para detectar las secuencias de ADN diana y de referencia o proteínas) con diversas especies, subespecies, variedades, cultivares, líneas animales o cepas bacterianas, según proceda, para demostrar, por ejemplo, la estabilidad del número de copias y la conservación de la secuencia del gen de referencia específico al taxón o la estabilidad de expresión de la proteína.

22. Para los métodos de proteína se deberían proporcionar resultados prácticos de la comprobación de los métodos con material diana y sus productos derivados o elaborados, según corresponda, para demostrar la estabilidad de la forma inmunorreactiva de la proteína.

Comprobación de la sensibilidad

23. Se deben proporcionar los resultados empíricos de la comprobación del método con distintas concentraciones para comprobar la sensibilidad del método. Se pueden definir límites de detección (LD) utilizando muestras que solo comprendan ingredientes únicos. Para los productos alimentarios compuestos de varios ingredientes, la sensibilidad real se verá reducida, ya que el ADN total extraído se derivará de más de un ingrediente, de manera que la cantidad inicial del mesurando real se reducirá.

24. Los LD deberían determinarse para cada método y matriz, de ser necesario.

Comprobación de la solidez

25. Se deben proporcionar los resultados empíricos de la comprobación del método frente a los resultados obtenidos con variaciones pequeñas y deliberadas de los parámetros del método.

Eficiencia de extracción

26. Se deberían proporcionar los resultados prácticos de las pruebas de la eficiencia de extracción sobre el método para demostrar que la extracción es suficiente y reproducible. En el caso de la detección cuantitativa, tal vez sea necesario proporcionar el método de calibración para la extracción incompleta.

APLICACIÓN PRÁCTICA DEL MÉTODO

Aplicabilidad

27. Se debe proporcionar la indicación de la matriz (por ejemplo, alimento elaborado, materia prima, etc.), el tipo de muestra y el intervalo en el que se puede aplicar el método. Las limitaciones relevantes del método también se deben abordar (por ejemplo, la interferencia de otros analitos o la inaplicabilidad en ciertas situaciones). Entre las limitaciones también cabe incluir, en la medida de lo posible, las restricciones debidas al costo, los equipos u otros riesgos no específicos para el operador y/o el medio ambiente.

Características operacionales y practicabilidad del método

28. El equipo necesario para aplicar el método se debe indicar claramente, en relación con el propio análisis y la preparación de las muestras. También debería proporcionarse información sobre los costos, las dificultades prácticas y cualquier otro factor que pueda ser de importancia para los operadores.

Diseño de los experimentos

29. Se deben incluir el diseño del experimento y detalles sobre el número de muestras, réplicas, diluciones, etc.

Habilidades que deben poseer los operadores

30. También se debe proporcionar la descripción de las habilidades prácticas necesarias para aplicar adecuadamente el método propuesto.

CONTROLES ANALÍTICOS

31. Se debe indicar la realización adecuada de controles en la aplicación del método, siempre que esté disponible esta información. Se deben especificar claramente los controles y se debe registrar su

interpretación. Podría tratarse de controles negativos y positivos, sus contenidos detallados, el grado en que deben utilizarse y la interpretación de los valores obtenidos.

32. Deberían declararse los elementos siguientes:

- Clases de controles analíticos utilizados:
 - i) controles positivos y negativos;
 - ii) el control interno utilizado, si procede (competitivo o no competitivo);
 - iii) otras clases de controles, como el de matriz (para confirmar que se añadió una muestra a la PCR) o la elaboración de la extracción.
- Muestras de control.
- Materiales de referencia utilizados.

RENDIMIENTO DEL MÉTODO

33. Se deberán proporcionar datos sobre los criterios mencionados en la Sección 2.2 (Criterios generales de método), así como una evaluación general que indique que el método es adecuado para la finalidad pretendida.

ANEXO II: VALIDACIÓN DE UN MÉTODO CUANTITATIVO DE PCR

INTRODUCCIÓN

1. El análisis basado en el ADN se realiza normalmente utilizando la PCR. Esta técnica amplifica un segmento específico de ADN en un grado tal que su cantidad se puede medir con ayuda de instrumentos (por ejemplo, por medios fluorométricos). Las operaciones de elaboración de alimentos (por ejemplo: por el calor, las enzimas y el corte mecánico) pueden dar como resultado el deterioro o la reducción en la cantidad total de ADN. Los métodos deberían concebirse preferiblemente para amplificar secuencias de ADN diana o específicas al taxón relativamente cortas.
2. Las determinaciones cuantitativas se expresan frecuentemente en forma de porcentaje de una secuencia de ADN específica de la diana en relación con una secuencia de ADN específica del taxón. En este tipo de ensayo cuantitativo, esta medición atañe en realidad a dos determinaciones basadas en la PCR: la de la secuencia de ADN específica de la diana y la del endógeno, o secuencia específica del taxón. Las dos determinaciones tienen sus propias incertidumbres y las dos podrían tener características de medición diferentes. En la mayor parte de aplicaciones, la secuencia de ADN de la diana estará presente en concentraciones bajas y la secuencia de ADN específica del taxón estará presente en concentraciones entre 10 y 1 000 veces mayores. Por lo tanto, es importante que se validen adecuadamente ambas mediciones. En los casos en que la medición se expresa directamente como porcentaje, se deberían tomar en consideración estos factores para validar el método. Los resultados se pueden comunicar en otras unidades de medida, como los números de copias.
3. La consecuencia es que el análisis de ADN, especialmente en los alimentos elaborados, tiene por objeto detectar una cantidad muy pequeña de ADN específico de la diana, a menudo del orden de nanogramos/gramo o inferior. El resultado de un análisis cuantitativo de PCR se expresa a menudo en porcentaje como cantidad relativa del ADN diana con respecto a la cantidad total de ADN del taxón o especie de comparación en una determinada matriz de alimentos. La matriz de alimentos puede también contener cantidades importantes de ADN de otras muchas especies o taxones.
4. La validación de los métodos tiene dos etapas. La primera es una validación interna de todos los parámetros mencionados anteriormente excepto la reproductibilidad. La segunda es un ensayo en colaboración, cuyo principal resultado es la medición de la repetibilidad y la reproductibilidad junto con información detallada acerca de la transferibilidad de los métodos entre laboratorios. Se recomienda encarecidamente que se realice un ensayo en colaboración de pequeña escala para comprobar la solidez general de un método antes de efectuar el gasto que representa la organización de un ensayo a gran escala. En caso de que sea necesario mejorar el método o su descripción, solo se efectúan gastos menores en el ensayo previo, mientras que el fallo de la validación de un método en la que participen varios laboratorios debido a la ambigüedad de la descripción del método representaría un fallo muy costoso. Además, cabe señalar que la aplicación de un método validado en el laboratorio debe incluir experimentos para confirmar que el método aplicado funciona tan bien en las condiciones particulares como lo hizo en las condiciones de la validación entre laboratorios. Es importante indicar que el método debe ser validado en las mismas condiciones en las que se empleará en el futuro.

VALIDACIÓN

5. Un ensayo cuantitativo de PCR debe ser validado para el fin o aplicación previstos. Existe la norma ISO 5725:1996 y el protocolo armonizado AOAC/UIQPA para lo relacionado con los métodos de análisis químico. En ellos se definen los procedimientos que se deben realizar para validar un método. Cabe señalar que todos los principios y normas del protocolo armonizado son aplicables a los métodos cuantitativos de PCR.
6. A continuación se explican en detalle ciertos parámetros de la validación del rendimiento de un ensayo cuantitativo de PCR. Se trata del ámbito, el límite de detección, el límite de cuantificación, la conformidad, la precisión, la sensibilidad y la solidez. Otros factores importantes son los criterios de aceptación e interpretación de los resultados y la cuestión de las unidades en las que estos se expresan.
7. Existe un debate científico general acerca de la interpretación de los valores porcentuales. Se reconoce que, hasta la fecha, no hay ninguna relación numérica fiable entre el peso y el número de copias debido a la

incertidumbre acerca de la correlación entre el peso del ingrediente y el número de moléculas de ADN. Son aceptables los cálculos en peso y número de copias siempre que esto se exprese claramente al comunicar los resultados.

8. Todos los parámetros que se enumeran más adelante, incluidos la selectividad y la sensibilidad, deben ser evaluados individualmente para cada uno de los ensayos, con inclusión de los ensayos de PCR específicos de la referencia y de la diana. Se enumeran por orden alfabético, no necesariamente en orden de importancia.

Aplicabilidad

9. Se deberían indicar los analitos, matrices y concentraciones para los cuales puede utilizarse un método de análisis.

10. Se exige de un método de extracción, independientemente de la matriz a la que vaya a ser aplicado, que genere un ADN de suficiente integridad estructural y pureza en suficiente cantidad para permitir que se realice una evaluación apropiada del rendimiento de las fases posteriores del método que se vayan a realizar (por ejemplo, la amplificación adecuada del ADN durante la fase de PCR).

11. En el análisis en tiempo real de la PCR, los valores Ct se pueden usar para estimar la eficiencia de la PCR. La eficiencia se puede comprobar, por ejemplo, estableciendo una serie de diluciones del ADN molde y determinando el valor Ct (el umbral de número de ciclos en el que la señal de fluorescencia que se mide cruza un valor umbral entre diluciones establecido por el usuario) para cada dilución. En la situación ideal, cuando la eficiencia de la amplificación es 100 %, una reducción doble en cantidad del ADN molde agregado a la PCR dará como resultado un incremento del valor Ct en uno. Por tanto, si el ADN se diluye 10X, la diferencia teórica en valores Ct entre ADN diluido y sin diluir debería aproximarse a 3,32. Los datos teóricos tal vez no se alcancen en situaciones reales. Las desviaciones significativas con respecto a esta relación podrían indicar que el ADN extraído contiene inhibidores de la PCR, que la solución de ADN no es homogénea o que la cantidad de ADN es tan baja que la variación estocástica de la cantidad de ADN en las reacciones da como resultado estimaciones cuantitativas imprecisas. Así sucede igualmente para las reacciones finales de la PCR realizadas utilizando cebadores fluorescentes.

Rango dinámico - rango de cuantificación

12. El alcance los métodos define el intervalo de concentración en el que se podrá determinar el analito con fiabilidad. La cantidad relativa de ADN específico del taxón con respecto al total en el extracto de ADN variará en función de si el ADN se extrajo de un solo ingrediente o de una matriz compleja de alimentos. Se debería utilizar un número suficiente de estándares, cuando sea de aplicación, como ocurre con las curvas de calibración, para definir adecuadamente la relación entre la concentración y la respuesta. Se debería demostrar que la relación entre la respuesta y la concentración es continua, reproducible y lineal, después de la transformación apropiada.

13. El rango de un método cuantitativo específico de la diana puede variar desde un valor próximo a cero hasta el 100 % en relación con el ADN específico del taxón (p/p). Sin embargo, es común validar un método para un intervalo de concentraciones que sea pertinente para el alcance de la aplicación. Si se valida un método para un intervalo determinado de valores, no se puede ampliar dicho intervalo sin validarlo de nuevo. Para ciertas aplicaciones (por ejemplo, el análisis de alimentos o grano), se podría estudiar el uso de ADN genómico para la preparación de la curva típica (véase el debate sobre el uso de ADN plásmido más adelante). Aunque resulte fácil establecer una norma nominal de 100 %, es difícil general con fiabilidad soluciones normalizadas inferiores a 0,1 %. Además, el número de sitios diana (secuencia de ADN que se debe amplificar) se reduce tanto que pueden empezar a producirse errores estocásticos dominantes, lo que hará que el análisis pueda resultar menos fiable.

14. El ADN empleado como calibrador debería remontarse (en el sentido metrológico) a una referencia del orden metrológico más elevado, como un material de referencia certificado. El rango se determinará confirmando que el procedimiento de PCR proporciona un grado aceptable de linealidad y conformidad cuando se aplica a muestras que contienen cantidades de analito comprendidas dentro del rango especificado del procedimiento o en sus límites.

15. Las características únicas de la PCR cuantitativa imponen restricciones particulares en el límite inferior del rango dinámico de una PCR cuantitativa. Esto se debe a la dificultad de determinar los valores de los límites de detección y cuantificación debido a la distribución anormal de los valores en este intervalo.

Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)

16. Si la validación del ensayo cuantitativo de PCR muestra que el ensayo es capaz de medir el ADN a, por ejemplo, el 0,1 % con conformidad y precisión aceptables, entonces a menudo no es necesario determinar los límites de detección y cuantificación, ya que el método sólo se aplica por encima del rango en el que estos parámetros son relevantes. Sin embargo, si el método se emplea en concentraciones cercanas a los límites de detección y cuantificación (típicamente, 0,01-0,05 %), la evaluación de ambos límites formará parte del procedimiento de validación.

17. En la PCR cuantitativa, la distribución de los valores de medición para las muestras testigo no es gaussiana y suele ajustarse a una distribución de Poisson. Si es necesario el LD, se deberá determinar experimentalmente. Para los métodos cuantitativos, el LD se define como la cantidad de analito con la que el método analítico detecta la presencia del analito al menos en el 95 % de las ocasiones (<5 % de falsos resultados negativos).

18. Para los métodos cuantitativos es importante conocer si el LC de una matriz en particular es cercano a los valores que se deben medir. Es necesario determinar el LC experimentalmente, ya que la medición de la distribución para la PCR cuantitativa no suele distribuirse.

19. En la práctica, se han utilizado dos procedimientos para determinar el LC. El primer método consiste en practicar ensayos en diversas muestras convencionales complementadas con cantidades conocidas de analito. En tal caso, el LC es el nivel en el que la variabilidad del resultado cumple ciertos criterios preestablecidos (como ± 2 SD desde el dato de calibración más bajo, etc.). Sin embargo, la extracción del ADN podría ser complicada en algunas matrices, como féculas o el ketchup, y se debe aceptar que puede haber eficiencias de extracción más bajas. Cuando la eficiencia de extracción es baja, se debería indicar este hecho en los datos de validación y en el informe del análisis. Un enfoque más completo consiste en comprobar el método utilizando diversas muestras que contengan cantidades conocidas del analito. Este método es más complicado, ya que exige que se pueda acceder a cantidades significativas de materiales de referencia que contengan un rango conocido de concentraciones de las secuencias de ADN de interés.

Practicabilidad

20. La practicabilidad del método debería evaluarse considerando parámetros como: la cantidad de muestras que puede procesarse en un tiempo dado, los costos fijos estimados de aplicación del método y el costo aproximado de la muestra, las dificultades prácticas del uso diario o en condiciones específicas, así como otros factores que podrían tener importancia para los operadores.

Desviación típica de la repetibilidad

21. La desviación típica de la repetibilidad relativa para la etapa de la PCR debería ser ≤ 25 % por encima de todo el rango dinámico del método.

Desviación típica de la reproducibilidad

22. La desviación típica de la reproducibilidad relativa para la etapa de la PCR debería ser inferior al 35 % por encima de la mayoría del rango dinámico, excepto en el límite de la cuantificación, donde tal desviación típica podría ser mayor.

Solidez

23. La solidez es una medida de la capacidad de un procedimiento analítico de no ser afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas de los parámetros del método; proporciona una indicación de la fiabilidad del procedimiento en un uso normal. Ejemplos de tales variaciones son los siguientes: los volúmenes de reacción (por ejemplo, 29 frente a 30 μ l), la temperatura de recocido (por ejemplo, $\pm 1^\circ$ C) y/u otras variaciones pertinentes. Los experimentos deben ser realizados al menos por triplicado. La respuesta de un ensayo respecto a estos pequeños cambios no debe desviarse más de ± 35 % en los experimentos de reproducibilidad de la respuesta obtenida en las condiciones originales.

24. La adecuación de la comprobación de la solidez debe ser demostrada método por método. Por ejemplo, para un método de PCR en tiempo real, se deben tomar en consideración los siguientes factores y su origen o fuente: diferentes modelos de termociclador, polimerasa del ADN, uracil-n-glicosilasa, concentración de cloruro de magnesio, concentración cebadora directa e inversa, concentración de sonda, perfil de temperatura, perfil temporal, dNTP (incluidas las concentraciones dUTP, si procede).

Sensibilidad

25. Para un método cuantitativo de PCR, se debe obtener una relación lineal del valor Ct como una función del logaritmo de la concentración del molde en todo el rango del método. Se debe informar del coeficiente de correlación, la intersección con el eje y y la pendiente de la línea de regresión. El porcentaje residual de cada uno de los calibradores debería ser idealmente $\leq 30\%$.

26. Además de informar sobre los parámetros de la curva, se propone definir qué rango de pendiente resulta aceptable a fin de realizar la cuantificación, ya que también es importante calcular la eficiencia de la reacción. (Por ejemplo, -2,9 a -3,3 para la detección de ADN o los valores óptimos correspondientes, que indican una eficiencia de la amplificación cercana a 100 %).

27. En los casos en los que un laboratorio emplee el método Δ CT en vez de un método cuantitativo basado en la calibración, el analista será responsable de garantizar que la cantidad general de ADN esté comprendida en el intervalo para el que se validó el ensayo.

Selectividad

28. La selectividad del método debería demostrarse aportando pruebas experimentales. Dicha demostración debería incluir el análisis de muestras que contengan una mezcla de ADN diana de un ADN que no lo sea en las que se comprueben realmente los límites de la detección (en caso de ser adecuados para el rango dinámico). Puesto que el método debería ser selectivo para el ADN diana, solo debería dar un resultado positivo con una matriz de alimentos que contenga el ADN diana.

29. Los cebadores y las sondas deberían haber sido objeto de comprobación con respecto a datos pertinentes de la secuencia en busca de posibles homólogos con otras secuencias que podrían encontrarse en las matrices previstas según el uso buscado. Después de tal evaluación, la selectividad debería demostrarse experimentalmente.

30. Para los ensayos selectivos del ADN diana. Las pruebas experimentales de la selectividad del ADN diana deberían comprender los siguientes elementos:

- Ensayos de al menos diez muestras de diferentes lotes de alimentos o ingredientes que carezcan de secuencias del ADN diana, aunque las muestras deberían contener ADN específico del taxón. Todos estos ensayos deberían tener un resultado negativo. Por ejemplo, si el ADN diana corresponde a una transformación específica de una planta de ADN recombinante, podrían tomarse muestras de otras incidencias de transformación (no correspondientes a la diana), así como de plantas de ADN no recombinante que pertenezcan a la misma especie vegetal.
- Debería someterse a ensayo un número apropiado de muestras de ADN de cada fuente.
- Deberían analizarse dos réplicas para cada muestra de ADN, que darán resultados dentro de un valor Ct de 0,5.

31. Los resultados de los ensayos deberían mostrar claramente que no se observan efectos significativos sobre la lectura de los instrumentos o de tipo químico.

32. Para los ensayos sobre secuencias específicas del taxón de ADN. Entre las pruebas experimentales de la selectividad del taxón deberían encontrarse las siguientes:

- Ensayos de un mínimo de diez muestras de diferentes lotes de alimentos o ingredientes procedentes de organismos pertenecientes al taxón de interés, pero clasificados en distintos subtaxones. Todos estos ensayos deberían tener un resultado positivo. Por ejemplo, si la especificidad del taxón se corresponde presuntamente con una especie vegetal como el maíz, las muestras podrían corresponder a variedades de maíz con diferentes orígenes genéticos.
- Ensayos de un mínimo de diez muestras de diferentes lotes de alimentos o ingredientes similares procedentes de organismos no pertenecientes al taxón de interés, que pueden estar presentes en las matrices de alimentos pertinentes. Todos estos ensayos deberían tener un resultado negativo. Por ejemplo (y continuando con el ejemplo anterior), si los diez ensayos primeros se aplicaron a distintas harinas de maíz, en el segundo grupo de ensayos podría resultar adecuado someter a prueba harinas de trigo, soja o arroz.
- Debería someterse a ensayo un número apropiado de muestras de ADN de cada fuente.

- Deberían analizarse dos réplicas para cada muestra de ADN, que darán resultados dentro de un valor Ct de 0,5.

33. Los resultados de los ensayos mostrarán claramente que no se observan efectos significativos sobre la lectura de los instrumentos o de tipo químico.

Conformidad

34. Al igual que para cualquier método, la conformidad de un método debería determinarse comparando resultados de análisis de un material de referencia con el valor conocido o asignado para dicho material de referencia. Debería tenerse en cuenta la repercusión de los efectos de la matriz de muestra, particularmente cuando esta difiere de la del material de referencia.

35. Un valor de conformidad de $\pm 25\%$ con respecto a la fase de la PCT debería resultar aceptable en todo el rango dinámico.

REFERENCIAS DEL ANEXO II

AOAC (2002). International Methods Committee: Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis.

Cankar K, Štebih D, Dreo T, Žel J, Gruden K (2006). Critical points of DNA quantification by real-time PCR-effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnol.* 6(37).

Chapela MJ, Sotelo CG, Pérez-Martín RI, Pardo MA, Pérez-Villareal B, Gilardi P y Riese J (2007). Comparison of DNA extraction methods from muscle of canned tuna for species identification. *Food Control.* 18(10):1211-1215.

Horwitz E. ISO/AOAC/IUPAC Harmonized Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies (1995). *Pure and Applied Chemistry* 67:331-343.

Huebner P, Waiblinger HU, Pietsch K and Brodmann P (2001). Validation of PCR methods for quantitation of genetically modified plants in food. *Journal of AOAC International* 84(6):1855-1864.

Kay S y Van den Eede G (2001). The limits of GMO detection. *Nature Biotechnology* 19(5):504.

Turci M, Sardaro MLS, Visioli G, Maestri E, Marmiroli, M y Marmiroli N (2010). Evaluation of DNA extraction procedures for traceability of various tomato products. *Food Control.* 21(2):143-149.

ANEXO III: VALIDACIÓN DE UN MÉTODO CUALITATIVO DE PCR

Introducción

1. Un método cualitativo de PCR debería ser validado en la medida de lo posible en la misma manera en que se pretende usar para los análisis habituales, lo que implica que se debe demostrar que la sensibilidad del método es tal que se puede confiar en que detectará una muestra positiva y no dará muchos falsos resultados positivos.
2. Debido a su naturaleza, los ensayos cualitativos están orientados a la identificación por encima/por debajo de un límite de detección. Al igual que el límite de detección en los métodos cuantitativos, el límite de detección de un método cualitativo se puede definir como la concentración en la que una muestra positiva arroja resultados positivos en al menos el 95 % de las ocasiones. Por lo tanto, el porcentaje de falsos resultados negativos debe ser de 5 % o menos. También se expresa como ratio o porcentaje.

Tasa de falsos resultados positivos

3. Es la probabilidad de que una muestra de ensayo que se sabe que es negativa sea clasificada como positiva por el método. Para mayor facilidad, esta tasa se puede expresar porcentualmente:

$$\% \text{ falsos resultados positivos} = 100 \times \frac{\text{número de muestras negativas conocidas mal clasificadas}}{\text{número total de muestras negativas conocidas}}$$

Tasa de falsos resultados negativos

4. Es la probabilidad de que una muestra de ensayo que se sabe que es positiva sea clasificada como negativa por el método. Para mayor facilidad, esta tasa se puede expresar porcentualmente:

$$\% \text{ falsos resultados negativos} = 100 \times \frac{\text{número de muestras positivas conocidas mal clasificadas}}{\text{número total de muestras positivas conocidas}}$$

Nota: Dado que existen diferentes definiciones en uso para las tasas de falsos resultados positivos y falsos resultados negativos, en el informe de validación se deberá explicitar cuál se ha utilizado.

5. Para demostrar la tasa de falsos resultados negativos de un ensayo cualitativo, se debe analizar una serie de muestras con una concentración constante y conocida de material positivo en un conjunto de material negativo y se deben evaluar los resultados. Cabe señalar que los conceptos de intervalos de confianza e incertidumbre estadística también deben ser aplicados al riesgo de falsos resultados positivos y/o negativos. El nivel deseado de confianza determina el número y el tamaño de los conjuntos en los que se deben realizar ensayos.

Solidez

6. Como ocurre con todos los métodos validados, se deberían realizar esfuerzos razonables para demostrar la solidez del ensayo. Para ello, es necesario optimizar e investigar cuidadosamente la repercusión que tiene la introducción de pequeñas modificaciones en el método por razones técnicas, según se describe en el anexo correspondiente a la PCR cuantitativa.

ANEXO IV: VALIDACIÓN DE UN MÉTODO BASADO EN PROTEÍNA

ENSAYO CUANTITATIVO

1. La siguiente descripción del procedimiento es solo una de las varias posibles para realizar un ensayo inmunológico de detección de las proteínas de interés.
2. Por ejemplo, en el ELISA común para las proteínas, se mide la cantidad de la sustancia reportera procedente de una reacción enzimática. Se genera la curva típica trazando la densidad óptica (DO) en el eje y y la concentración de los estándares en el eje x, lo que da como resultado una curva de la respuesta a la dosis que utiliza una ecuación cuadrática u otro modelo de curva adecuado del método. Para obtener un valor cuantitativo preciso, la DO de las soluciones de muestra debe corresponder a la porción lineal de la curva de calibración. Si la DO es demasiado alta, la solución de muestra debe ser diluida hasta que la densidad óptica esté dentro del rango de cuantificación del ensayo. La concentración del analito proteínico en la muestra original se calcula corrigiendo todo factor de dilución que se introdujo para preparar la muestra a efectos de su aplicación a la microplaca. El peso inicial de la muestra, el volumen de líquido de extracción y las diluciones posteriores se usan para calcular el factor de dilución.
3. Se pueden utilizar diferentes controles para demostrar el rendimiento del ensayo. Puede introducirse en paralelo una muestra testigo, como un pozo vacío o una solución tamponada, para determinar las respuestas iniciales que se obtendrán de la muestra y las respuestas de calibración, si se desea. Se usará una muestra de control negativa (es decir, una solución de extracción de la matriz de la que se sabe que no contiene el analito) para demostrar todas las respuestas no específicas o los efectos de interferencia de la matriz que se producen en el ensayo. Se puede realizar un control positivo o una extracción de la matriz incrementada con una cantidad conocida del analito para demostrar la exactitud del ensayo. Se pueden aplicar estándares y muestras en un número adecuado de réplicas para evaluar la precisión del ensayo. Pueden realizarse muestras testigo, controles negativos, controles positivos, materiales de referencia, extracciones del material de referencia y réplicas en cada microplaca para controlar las variaciones de una placa a otra.

MATERIALES DE REFERENCIA

4. Cuando procede, el material de referencia es la misma matriz que la muestra de análisis que va a ser objeto de ensayo. Suele incluir materiales de control negativo y de referencia positiva. Por ejemplo, si la matriz que va a ser objeto de ensayo es semilla de soja, el material de referencia normalizado positivo sería la harina de soja que contenga una proporción conocida de proteína de interés. También se puede utilizar una muestra pura o una extracción de la proteína de interés, siempre que el uso de dichos materiales proteínicos de referencia haya sido validado para la matriz de que se trate. En algunos casos, la matriz de referencia podría no estar disponible. El acceso a los materiales de referencia es importante en el desarrollo, la validación y el empleo de ensayos inmunológicos para analizar las proteínas que se encuentran en la matriz de alimentos. Se debe utilizar material de referencia de la mejor calidad disponible para cumplir los reglamentos y los requisitos de los ensayos.
5. En los casos en que los alimentos o los ingredientes de los alimentos están disponibles con y sin el analito, es bastante sencillo preparar una muestra de control con una proporción conocida del material diana. En otros casos, la generación de muestras de control para ciertas matrices y analitos puede ser una tarea difícil. La estabilidad y la uniformidad son cuestiones importantes. Por ejemplo, si la matriz que debe ser objeto de ensayo se compone de una mezcla de materiales, el operador necesitará combinar materiales de tal manera que se pueda lograr una muestra homogénea de control que contenga una proporción conocida de la proteína. La estabilidad de estos materiales debería ser evaluada en condiciones de almacenamiento y de ensayo.

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO CUANTITATIVO BASADO EN PROTEÍNA

6. Los principios de validación del método definidos en la norma armonizada ISO/UIQPA/AOAC son de aplicación a los métodos de proteína.
7. Los parámetros de validación de métodos cuantitativos comprenden la exactitud/conformidad, la selectividad, la eficiencia de la extracción, la sensibilidad, el rango de cuantificación, la precisión, la solidez, la aplicabilidad y la practicabilidad.

8. La exactitud se pone de manifiesto midiendo la recuperación del analito procedente de muestras complementadas y se expresa como la recuperación media en varios niveles del rango cuantitativo.

9. La recuperación de proteínas debería determinarse comparando resultados de análisis de un material de referencia con el valor conocido o asignado para dicho material de referencia. Debería tenerse en cuenta la repercusión de los efectos de la matriz de muestra, particularmente cuando esta difiere de la del material de referencia. La recuperación debería situarse entre 70 y 120 %.

10. La eficiencia de extracción es una medición de la eficiencia de un método determinado de extracción en la separación del analito proteínico de la matriz. Se expresa como porcentaje de analito recuperado de la muestra. Puede resultar difícil demostrar verdaderamente la eficiencia del procedimiento de extracción. Podría no haber un método alternativo de detección con el que comparar los resultados del ensayo inmunológico. Un método para abordar la eficiencia de extracción consiste en poner de manifiesto la recuperación del analito de la proteína diana a partir de cada tipo de fracción de alimento mediante extracción exhaustiva, es decir, la extracción repetida de la muestra hasta que no se detecta más proteína.

11. La precisión interna del ensayo describe el grado de variación que se produce en el mismo. Se puede evaluar determinando la variación (% del coeficiente de variación) entre las réplicas que han sido objeto de ensayo en varias concentraciones de la curva típica y en la variación reunida (RSDr) derivada de los valores de absorción en estándares de ensayos independientes realizados en fechas diferentes. La precisión entre ensayos describe la variación que tiene lugar entre ensayos diferentes y que se puede medir analizando las muestras de control de calidad de cada microplaca. Las muestras de control de calidad necesarias se componen de dos conjuntos de extracciones, una extracción de muestras que contienen el analito diana y una de las muestras de control. Si la proteína es estable en el extracto, puede almacenarse congelada. Posteriormente, se descongelaría una porción y se sometería a ensayo en cada microplaca. La precisión del ensayo se puede evaluar a lo largo del tiempo y se expresa como porcentaje del coeficiente de variación.

12. La desviación típica de la repetibilidad relativa (RSDr) debería ser ≤ 25 % por encima de todo el rango dinámico del método.

13. La desviación típica de la reproductibilidad relativa (RSDR) debería ser inferior al 35% en la concentración diana y superior a la mayoría del rango dinámico, excepto en el límite de la cuantificación, donde tal desviación típica podría ser mayor.

14. La concordancia de la disolución o linealidad se utiliza para evaluar que el ensayo pueda dar resultados equivalentes independientemente del punto en el que la densidad óptica de la muestra se interpola en el rango cuantitativo de la curva típica. A fin de realizar estos experimentos, en condiciones ideales las muestras que dan positivo para la proteína diana se diluyen de tal manera que en por lo menos tres disoluciones se obtengan valores que cubran el rango cuantitativo de la curva. El coeficiente de variación de los resultados ajustados de varias disoluciones de un solo extracto de la muestra debería ser de ≤ 20 % en condiciones ideales.

Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)

15. Merece la pena observar que si se fijan un límite de detección (LD) o un límite cuantitativo (LC) muy inferiores al rango en el que se pretende utilizar el método, no es necesaria una determinación exacta. Así sucedería, por ejemplo, cuando el LD se encontrase en el rango de 1 ng/kg, en tanto que el rango de la validación del método abarcase solo las concentraciones en $\mu\text{g}/\text{kg}$.

16. Para estimar el LD, es práctica habitual asumir que es la fuerza de la señal de una muestra testigo aumentada en tres veces la desviación típica de la muestra testigo. Este método da como resultado, como mucho, una estimación, y se basa en una distribución gaussiana típica de las mediciones de la muestra testigo alrededor de cero. De manera general, esto se puede asumir para métodos como ELISA, aunque la mejor manera de determinar el LD es mediante experimentos. El LD también se define normalmente como una concentración igual al estándar inferior utilizado en el ensayo, en el caso de que se obtenga un valor positivo consistente con dicho estándar.

17. Para los métodos cuantitativos es importante conocer si el LC de una matriz en particular es cercano a los valores que se deben medir.

Reactividad cruzada

18. La reactividad cruzada es el grado en que los análogos u otras moléculas pueden unirse a los anticuerpos de la detección. Este concepto debería clasificarse y describirse en el método. La falta de reactividad cruzada debería evaluarse mediante resultados experimentales extraídos de la comprobación del método con proteínas o moléculas de especies/variedades no diana y estrechamente relacionadas, así como de proteína diana purificada o de materiales de referencia positivos de control. La posibilidad de que se produzcan interferencias causadas por reactivos y material de laboratorio se puede evaluar sometiendo a ensayo extracciones de material libre de analito.

Efectos de la matriz

19. Si la respuesta del método se ve afectada por una sustancia en la extracción final, aparte del analito proteínico concreto, la respuesta no específica recibe la denominación de efecto de la matriz. Una manera de gestionar los efectos de la matriz consiste en demostrar que el método analítico arroja resultados similares con o sin la matriz de muestra presente en la extracción. Con este enfoque, se debe demostrar la ausencia de efectos de la matriz en todas las matrices en las que se vaya a aplicar el ensayo. Otro enfoque (aunque menos deseable) para gestionar los efectos de la matriz consistiría en preparar las soluciones estándar en extracciones de matrices libres de analito. Así se garantiza que los efectos de la matriz que pudieran producirse son coherentes con los estándares y las muestras.

Solidez

20. La solidez es una medida de la capacidad de un procedimiento analítico para no ser afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas de los parámetros del método; proporciona una indicación de la fiabilidad del procedimiento en un uso normal. Ejemplos de tales variaciones son los siguientes: los volúmenes de reacción, la temperatura de incubación (por ejemplo, 1°C positivo y negativo para las incubaciones en horno y 4°C positivos y negativos para las incubaciones a temperatura ambiente) y/o otras variaciones pertinentes. Los experimentos deben ser realizados al menos por triplicado y se debe calcular la recuperación. La respuesta de un ensayo respecto a estos pequeños cambios no debe desviarse más de $\pm 30\%$ respecto a la respuesta obtenida en las condiciones originales.

ENSAYO CUALITATIVO

21. Los dispositivos de flujo lateral son herramientas útiles para la comprobación in situ o sobre el terreno, si bien otros ensayos inmunoabsorbentes como los métodos ELISA tradicionales también pueden utilizarse para los ensayos cualitativos. Con el fin de garantizar unos resultados fiables, deberían validarse los ensayos y una descripción de las características del rendimiento debería comprender la sensibilidad, la selectividad, la aplicabilidad, el límite de detección, la solidez, los efectos de la matriz y, si procede, el efecto de gancho.

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO CUALITATIVO BASADO EN PROTEÍNA

22. Los mismos principios son de aplicación para los ensayos cualitativos basados en proteína que para los ensayos cualitativos de PCR. Estos enfoques, incluido el cálculo de las tasas de falsos resultados positivos y negativos, se pueden aplicar por lo tanto a los métodos basados en proteína. Por regla general, debido al carácter fiable de los métodos de flujo lateral basados en proteína, no se realizan por duplicado en cada muestra. Sin embargo, en el ensayo ELISA (debido a su naturaleza cuantitativa) suelen emplearse pozos duplicados.

Aplicabilidad

23. Se deberían indicar los analitos, matrices y concentraciones para los cuales puede utilizarse un método de análisis.

24. La extracción de proteína puede suponer un factor esencial en el rendimiento de un método de proteína y los tampones también pueden afectar al rendimiento de la etapa de detección. Por tanto, es necesaria una optimización cuidadosa para asegurar la fiabilidad de los métodos de detección basados en proteína. Se deberían establecer para el método los criterios para la determinación del LD. Para confirmar el LD de los ensayos cualitativos pueden utilizarse niveles de fortificación cercanos a dicho límite siempre que uno de los niveles utilizados cumpla el criterio de ser superior al LD aun estando cerca del mismo. Si bien estos procedimientos pueden dar una indicación del rendimiento del método, las muestras añadidas con características bien conocidas (de estar disponibles) son la mejor matriz a partir de la cual se puede determinar la aplicabilidad de un método.

Practicabilidad

25. La practicabilidad del método debería evaluarse considerando parámetros como: la cantidad de muestras que puede procesarse en un tiempo dado, los costos fijos estimados de aplicación del método y el costo aproximado de la muestra, las dificultades prácticas del uso diario o en condiciones específicas, así como otros factores que podrían tener importancia para los operadores.

REFERENCIAS DEL ANEXO IV

Grothaus GD, Bandla M, Currier T, Giroux R, Jenkins GR, Lipp M, Shan G, Stave JW y Pantella V. (2006). Immunoassay as an Analytical Tool in Agricultural Biotechnology. *AOAC International* 89:913-928.

Guidelines for the Validation and Use of Immunoassays for Determination of Introduced Proteins in Biotechnology Enhanced Crops and Derived Food Ingredients. Lipton et al., *Food and Agricultural Immunology*, 2000, 12, 153-164.

Horwitz E. ISO/AOAC/IUPAC Harmonized Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies (1995). *Pure and Applied Chemistry* 67:331-343.

ISO 21572:2004. Foodstuffs-Methods for the detection of genetically modified organisms and derived products-protein based methods. Ginebra: Organización Internacional de Normalización.

Mihaliak CA y Berberich SA (1995). Guidelines to the Validation and Use of Immunochemical Methods for Generating Data in Support of Pesticide Registration, in: Nelson JO, Karu AE and Wong RB (eds.) *Immunoanalysis of Agrochemicals: Emerging Technologies. ACS Symposium Series 586:288-300.*

Stave JW (1999). Detection of the new or modified proteins in novel foods derived from GMO: future needs. *Food Control* 10:367-374.

Rogan GJ, Dudin YA, Lee TC, Magin KM, Astwood JD, Bhakta NS, Leach JN, Sanders PR y Fuchs RL (1999). Immunodiagnostic methods for detection of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in Roundup Ready(R) soybeans. *Food Control* 10(6):407-414.

USDA (2004). U.S. Department of Agriculture/Grain Inspection, Packers and Stockyards Administration Directive 9181.2. [En línea] <http://archive.gipsa.usda.gov/reference-library/directives/9181-2.pdf>.

ANEXO V – CRITERIOS ANALÍTICOS DE ACEPTACIÓN DE LOS CONTROLES E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS PARA LOS MÉTODOS CUANTITATIVOS DE PCR

1. Como mínimo, los criterios de aceptación siguientes son comunes a todos los métodos cuantitativos de PCR y son aplicables a cada proceso de PCR:

- La media de las réplicas del control diana positivo del ADN en una concentración pertinente se desvía menos de 3 desviaciones típicas del valor asignado. Cuando sea de aplicación, un control del ADN diana se define como ADN de referencia o ADN extraído de un material de referencia certificado o del que se sabe que es una muestra representativa positiva de la secuencia u organismo objeto de estudio. El control tiene la finalidad de demostrar cuál debería ser el resultado de los análisis de las muestras que contienen la secuencia diana.
- El control del reactivo de amplificación no supondrá una señal de amplificación por encima del ruido de fondo. El control del reactivo de amplificación se define como el control que contiene todos los reactivos, excepto el ADN molde extraído de la muestra. En lugar del ADN molde, se añade a la reacción un volumen correspondiente de reactivo sin ácido nucleico (como agua o tampón).

2. Para aceptar el resultado de una muestra desconocida, la desviación típica relativa de las réplicas de la muestra debería ser $\leq 35\%$.