



COMISIÓN DE CONTROL ANALÍTICO Y AMPLIACIÓN DE COBERTURA		CLAVE: CCAYAC-CR-08/0
CRITERIOS PARA LA CONFIRMACIÓN DEL METODO DE PRUEBA PARA LA DETECCIÓN DE <i>Brucella spp</i> POR PCR		Hoja: 1 de 6
VIGENTE A PARTIR DE: 2014-11-21	FECHA DE PROXIMA REVISIÓN 2017-11-21	SUBSTITUYE A: DOCUMENTO NUEVO FECHA: Nuevo

1. OBJETIVO

Establecer los requisitos técnicos mínimos para la confirmación de la metodología de detección del género *Brucella spp* por PCR

2. ALCANCE

Los presentes criterios están dirigidos a los laboratorios de ensayo aspirantes a terceros autorizados ante la COFEPRIS que incorporen dentro de su marco analítico autorizado al método PCR para la detección de *Brucella spp* en leche, sus productos y derivados.

3. DEFINICIONES

- 3.1 **CONFIRMACIÓN DEL MÉTODO:** Evidencia objetiva para demostrar que al aplicar un método normalizado (compendiado), se cumple con las especificaciones del mismo y se cuenta con la competencia técnica para realizarlo adecuadamente tomando en consideración sus propias instalaciones, equipo y personal. Tiene como objetivo, el comprobar que el laboratorio domina el método normalizado y lo utiliza correctamente.
- 3.2 **EXCLUSIVIDAD:** Diferentes cepas no pertenecientes al género *Brucella* no deben ser detectadas por el método.
- 3.3 **INCLUSIVIDAD:** Diferentes cepas pertenecientes al género *Brucella* deben ser detectadas por el método.
- 3.4 **LIMITE DE DETECCIÓN:** Concentración en la que una muestra positiva arroja resultados positivos en al menos un 95 % de las ocasiones. Por lo tanto, el porcentaje de resultados falsos negativos debe ser del 5 % o menos.

CONTROL DE EMISION			
	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre	Luis Edgardo Viguera Rueda	Rosa María Soberanes Duran Guillermo Vega Rodríguez	Armida Zuñiga Estrada
Fecha y Firma	 2014-11-06	 2014/11/06 2014/11/06	 2014-11-20

COMISIÓN DE CONTROL ANALÍTICO Y AMPLIACIÓN DE COBERTURA		CLAVE: CCAYAC-CR-08/0
CRITERIOS PARA LA CONFIRMACIÓN DEL METODO DE PRUEBA PARA LA DETECCIÓN DE <i>Brucella spp</i> POR PCR		Hoja: 2 de 6
VIGENTE A PARTIR DE: 2014-11-21	FECHA DE PROXIMA REVISIÓN 2017-11-21	SUBSTITUYE A: DOCUMENTO NUEVO FECHA: Nuevo

- 3.5 **REACCIÓN EN CADENA POLIMERASA (PCR):** Técnica analítica que se basa en la síntesis enzimática, a partir de pequeñas cantidades de ADN, de un gran número de copias de un segmento de ADN, mediante una serie repetitiva de tres pasos: alineación de iniciadores o primers, desnaturalización de ADN y replicación del material genético.

4. DOCUMENTOS APLICABLES

- 4.1 NMX-EC-17025-IMNC-2006. Evaluación de la conformidad.-Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.
- 4.2 Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. Organización Mundial de la Salud. Tercera edición. 2005

5. RESPONSABILIDADES

Este documento debe ser aplicado por el personal de los laboratorios de ensayo aspirantes a terceros autorizados ante la COFEPRIS, y por los miembros del padrón de evaluadores que revisen esta prueba.

6. CRITERIOS DE LA ACTIVIDAD

6.1 Criterio No. 1.- Disposiciones generales

- a) Los laboratorios que implementen la metodología de PCR en punto final deben seguir lo establecido en el documento CCAYAC-M-201 "Método de prueba para la detección de *Brucella spp* en leche y sus productos por PCR".
- b) Los laboratorios que implementen su propia metodología de PCR en tiempo real, o adopten una comercial, deben seguir lo descrito en estos criterios.
- c) Para manipular el género *Brucella*, se deben adoptar las directrices en materia de bioseguridad consideradas para un laboratorio de nivel 3, conforme a lo establecido en el Manual de Bioseguridad en el Laboratorio publicado por la OMS.

COMISIÓN DE CONTROL ANALÍTICO Y AMPLIACIÓN DE COBERTURA		CLAVE: CCAYAC-CR-08/0
CRITERIOS PARA LA CONFIRMACIÓN DEL METODO DE PRUEBA PARA LA DETECCIÓN DE <i>Brucella spp</i> POR PCR		Hoja: 3 de 6
VIGENTE A PARTIR DE: 2014-11-21	FECHA DE PROXIMA REVISIÓN 2017-11-21	SUBSTITUYE A: DOCUMENTO NUEVO FECHA: Nuevo

- d) Las áreas para extracción del ADN genómico, preparación de la mezcla maestra de PCR y adición de templados deben ser independientes, para evitar la contaminación cruzada de muestras con el material genético extraído o los productos de amplificación de PCR obtenidos previamente.
- e) La metodología de PCR en tiempo real debe ser capaz de detectar el género *Brucella*, en un único evento de amplificación, mediante el uso de sondas específicas para el género.

6.2 Criterio No. 2.- Método analítico

Establecer un método en donde se detalle cada uno de los siguientes rubros:

- a) El alcance del método
- b) Proceso de homogeneización y/o pre-enriquecimiento de la porción analítica para cada tipo de muestra
- c) Proceso de extracción de ADN genómico
- d) Composición de la mezcla maestra de amplificación. Indicar el blanco genético de amplificación por ejemplo secuencias de inserción IS 711, IS 650, secciones del gen 16S-23S de rARN o genes *Omp-2a*, etc., secuencias de los iniciadores y sondas, tamaño del fragmento obtenido.
- e) Proceso de amplificación y plataforma analítica (equipo) utilizada. Intercambiabilidad con otros equipos utilizados
- f) Medidas de control de calidad implementadas.
- g) Interpretación de resultados
- h) Medidas de bioseguridad

COMISIÓN DE CONTROL ANALÍTICO Y AMPLIACIÓN DE COBERTURA		CLAVE: CCAYAC-CR-08/0
CRITERIOS PARA LA CONFIRMACIÓN DEL METODO DE PRUEBA PARA LA DETECCION DE <i>Brucella</i> spp POR PCR		Hoja: 4 de 6
VIGENTE A PARTIR DE: 2014-11-21	FECHA DE PROXIMA REVISIÓN 2017-11-21	SUBSTITUYE A: DOCUMENTO NUEVO FECHA: Nuevo

6.3 Criterio No. 3.- Parámetros de desempeño

Parámetro	Muestras	Calcular/determinar
Inclusividad	ADN genómico de mínimo 10 cepas de <i>Brucella</i>	Determinar resultado de detección por PCR
Exclusividad	ADN genómico de cepas de lactobacilos, enterobacterias u otras especies relevantes de la biota normal del alimento	Determinar resultado de detección por PCR
Límite de detección	Muestras inoculadas con diferentes niveles inferiores a 50 UFC/porción analítica	Determinar resultado de detección por PCR y calcular el porcentaje de resultados detectados entre el total de resultados obtenidos

6.4 Criterio No. 4.- Criterios de aceptación

Parámetro	Resultado esperado
Inclusividad	100 % de cepas detectada para el género <i>Brucella</i>
Exclusividad	100 % de cepas no detectadas para el género <i>Brucella</i>
Límite de detección	El nivel menor donde se obtiene un porcentaje de 95% de resultados detectados para el género <i>Brucella</i>

6.5 Criterio No. 5.- Expresión de resultados

Reportar el resultado de detección de *Brucella* spp. en leche y sus productos y derivados por PCR como detectada o no detectada en base al límite de detección determinado.

COMISIÓN DE CONTROL ANALÍTICO Y AMPLIACIÓN DE COBERTURA		CLAVE: CCAYAC-CR-08/0
CRITERIOS PARA LA CONFIRMACIÓN DEL METODO DE PRUEBA PARA LA DETECCIÓN DE <i>Brucella spp</i> POR PCR		Hoja: 5 de 6
VIGENTE A PARTIR DE: 2014-11-21	FECHA DE PROXIMA REVISIÓN 2017-11-21	SUBSTITUYE A: DOCUMENTO NUEVO FECHA: Nuevo

6.6 Criterio No. 6.- Protocolo de confirmación.

Elaborar un protocolo que incluya lo siguiente:

Título	Protocolo de confirmación de método... (clave interna).
Objetivo	Considerar los parámetros de desempeño a evaluar y el analito a determinar.
Alcance	Indicar el nombre de la metodología y la matriz o matrices en las que este aplicará.
Método de ensayo	Elaborar un diagrama de flujo con la metodología empleada para cuantificar el analito.
Muestras	Indicar la cantidad, lote o procedencia, forma de almacenamiento. Describir la fortificación de blanco de muestra y el paso analítico en que se llevará a cabo.
Equipo	Descripción general del equipo a utilizar.
Reactivos	Indicar nombre y características generales de todos los reactivos a utilizar incluyendo sustancias de referencia y de control. Describir de manera general la preparación de disoluciones de trabajo.
Desarrollo experimental	Describir paso a paso las instrucciones para ejecutar los experimentos de evaluación de los parámetros de confirmación.
Resultados	Propuesta de formato de registro para vaciado de resultados de cada parámetro de confirmación a ensayar.
Criterios de aceptación	Presentar en forma de tabla los criterios de aceptación que se busca satisfacer. Indicar la referencia bibliográfica utilizada, si aplica.

Nota: El protocolo debe incluir firmas de quien elaboró, revisó y aprobó.

COMISIÓN DE CONTROL ANALÍTICO Y AMPLIACIÓN DE COBERTURA		CLAVE: CCAYAC-CR-08/0
CRITERIOS PARA LA CONFIRMACIÓN DEL METODO DE PRUEBA PARA LA DETECCIÓN DE <i>Brucella spp</i> POR PCR		Hoja: 6 de 6
VIGENTE A PARTIR DE: 2014-11-21	FECHA DE PROXIMA REVISIÓN 2017-11-21	SUBSTITUYE A: DOCUMENTO NUEVO FECHA: Nuevo

6.7 Criterio No. 7.- Informe de confirmación

Elaborar un informe de resultados que incluya lo siguiente:

Título	Informe de confirmación de método (clave interna).
Objetivo	Considerar los parámetros de desempeño a evaluar y el analito a determinar.
Alcance	Indicar el nombre de la metodología y la matriz o matrices en las que este aplicará.
Método de ensayo	Elaborar un diagrama de flujo con la metodología empleada para cuantificar el analito
Muestras	Indicar la cantidad, lote o procedencia, forma de almacenamiento. Describir la fortificación de blanco de muestra y el paso analítico en que se llevó a cabo
Equipo	Descripción detallada de las características del equipo utilizado
Reactivos	Indicar nombre y características detalladas de todos los reactivos utilizados incluyendo sustancias de referencia y de control. Describir de manera detallada la preparación de disoluciones de trabajo.
Desarrollo experimental	Describir paso a paso las instrucciones de los experimentos ejecutados para la evaluación de los parámetros de confirmación
Resultados	Formato de registro con los resultados obtenidos incluyendo fechas de análisis, analista (s), matriz, etc.
Análisis de resultados	Presentar en forma de tabla los criterios de evaluación considerados y los resultados obtenidos para los mismos con observaciones
Discusión	Revisar las actividades realizadas, la revisión bibliográfica en relación al tema y los resultados obtenidos. Explicar resultados anómalos e incorporar observaciones relevantes que apoyen la autocritica de los datos obtenidos o las decisiones tomadas.
Conclusiones	Enunciar si se alcanzaron los objetivos esperados
Bibliografía	Citar los documentos revisados y utilizados en el protocolo e informe
Anexos	Los que apliquen para dar evidencia en su ejecución: datos crudos obtenidos, copias de certificados de análisis de reactivos, de servicio a equipos, etc.

Nota: El informe de resultados debe incluir firmas de quien elaboró, revisó y aprobó.

