

Validación interna del panel **GPS™** **Mycoplasmas Contagious Agalactia dtec- qPCR** siguiendo la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 para la detección en pequeños rumiantes

Gema Bru¹, Aaron Navarro¹ y Antonio Martínez-
Murcia^{1,2} *

¹ Genetic PCR Solutions™, 03206-Elche

²Universidad Miguel Hernández, 03300-Orihuela

*ammurcia@umh.es



XXIV SIMPOSIO
2019

PAMPLONA

AGALAXIA CONTAGIOSA

Ovina y Caprina

Agentes etiológicos:

- ❖ *Mycoplasma agalactiae*
 - ❖ *M. mycoides* subsp. *capri*
 - ❖ *M. capricolum* subsp. *capricolum*
 - ❖ *M. putrefaciens*
- } Complejo Micoides



CUADRO CLÍNICO

- Mastitis
- Artritis
- Queratoconjuntivitis
- Septicemias (jóvenes)

Periodo de incubación: 1 - 2 semanas

Laboratorio Nacional de

Referencia: Laboratorio Central de Sanidad Animal de Santa Fe (Granada), MAPA.



Evolución Epidemiológica



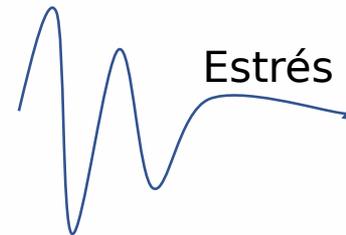
TRANSMISIÓN

Contacto directo, inhalación, lactancia y ordeño

- Leche
- Calostro
- Secreciones respiratorias
- Secreciones oculares, fecales y genitourinarias
- Semen



Portador asintomático



Animal Enfermo

Marco Reglamentario



- ✓ Ley 8/2003, de 24 de abril (prevención, control y mejora sanitaria)



- ✓ Real Decreto 1941/2004 de 27 de septiembre (normas de policía sanitaria: intercambios e importaciones)

BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO

- ✓ Enfermedad de declaración obligatoria, Real Decreto 526/2014



- ✓ Organización Mundial de Sanidad Animal

Distribución geográfica

Agalaxia contagiosa en región mediterránea de Europa, Asia y África del Norte.



En España:

- 1987 endémica (90% *M. agalactiae*)
- 2007 incluida en las Agrupaciones de Defensa Sanitaria (ADS)
- 2015 programa de control voluntario
- **2018 programa nacional voluntario***

Programa nacional voluntario de vigilancia, control y erradicación de la Agalaxia Contagiosa Ovina y Caprina 2018-2020

Identificación del Programa

- Matriz: **leche e hisopos nasales/auriculares** (análisis por PCR)
- Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad (MAPA)

Medidas

- **Mejora del control** (Programas de bioseguridad y desparasitación, separación y aislamiento, plan de vacunación)

Innovación GPS™ : Ensayo en panel qPCR

Mycoplasmas Contagious Agalactia dtec-qPCR Panel

- ✓ *Mycoplasma agalactiae* dtec-qPCR Test
- ✓ *M. mycoides* dtec-qPCR Test
- ✓ *M. capricolum* dtec-qPCR Test
- ✓ *M. putrefaciens* dtec-qPCR Test



MONODOSE GPS™ dtec-qPCR

- ✓ Ensayos de qPCR específicos para cada patógeno
- ✓ Listo para usar (deshidratados)
- ✓ Tarea simple y rápida (solo añadir la muestra)

NO necesita hielo en el transporte

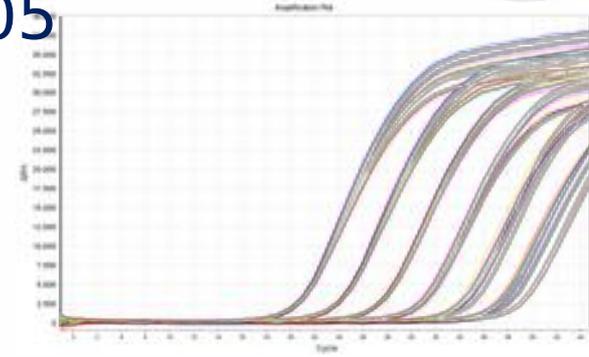
SIN daños en la enzima por congelación/descongelación

BAJO riesgo de contaminación cruzada

SIN deterioro del fluoróforo por luz UV



Validación interna siguiendo las pautas de la norma UNE/EN ISO/IEC 17025: 2005



Parámetros de la Validación

1. Especificidad analítica

- Inclusividad / Exclusividad

2. Sensibilidad analítica

Calibración y Análisis estadístico ($n \geq 10$)

- Evaluación de la regresión lineal (ecuación de la recta y R^2)
- Validación del modelo lineal (Test de Fisher)
- Validación de la eficiencia (rendimiento de la reacción PCR)

3. Fiabilidad ($n \geq 10$):

- Repetibilidad
- Reproducibilidad

4. Sensibilidad ($n \geq 10$):

- Límite de detección (LD)
- Límite de cuantificación (LQ)

Parámetros	Acceptance criteria
Especificidad	Inclusividad: Amplificación positiva frente a todas las cepas de la especie diana. Exclusividad: Amplificación negativa frente al resto de especies de <i>Mycoplasma</i> y géneros cercanos
Sensibilidad*	$-3,587 < a < -3,103$ $F_{\text{assay}} < F_{\text{fisher}}$ $90 \% < e < 110 \%$
Fiabilidad*	Repetibilidad $CV < 10 \%$ Reproducibilidad $CV < 10 \%$
LD* (10 copias)	$P_{\text{posit}} \geq 90 \%$ (* $n \geq 10$)
LQ* (10 copias)	$t_{\text{upper}} \leq t_{\text{study}}$ (ensayos)

Especificidad y Sensibilidad analítica

UNE/EN ISO 17025:2005



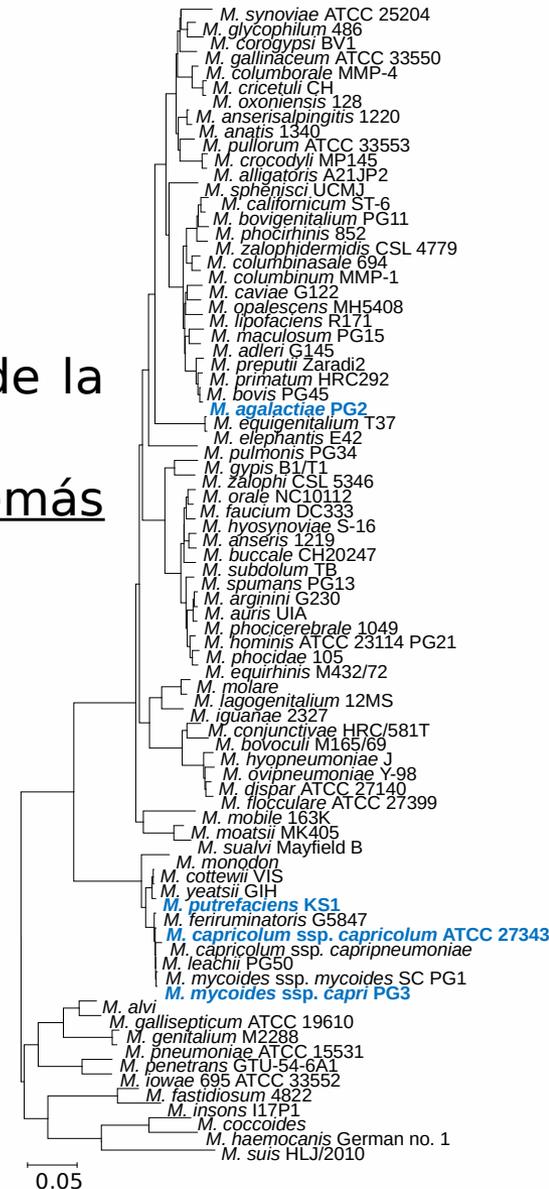
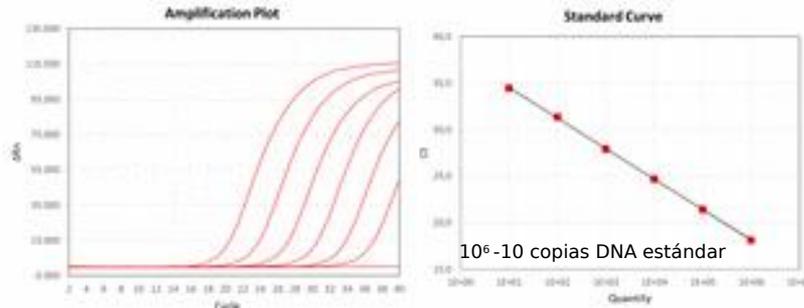
1. Especificidad analítica.

(*in silico* - *in vitro*)

- La **inclusividad**, detección de todas las cepas de la especie
- La **exclusividad**, NO detección de todas las demás especies

2. Sensibilidad analítica. Validación de la recta de calibrado

- Regresión lineal (ecuación de la recta y R^2)
- Modelo lineal (Test de Fisher)
- Eficiencia (rendimiento de la reacción PCR)



Árbol filogenético de *Mycoplasma* spp. obtenido a partir del alineamiento (NJ method, 1000 replicas) de 1226 bp del gen 16S para 86 secuencias de diferentes especies del género.

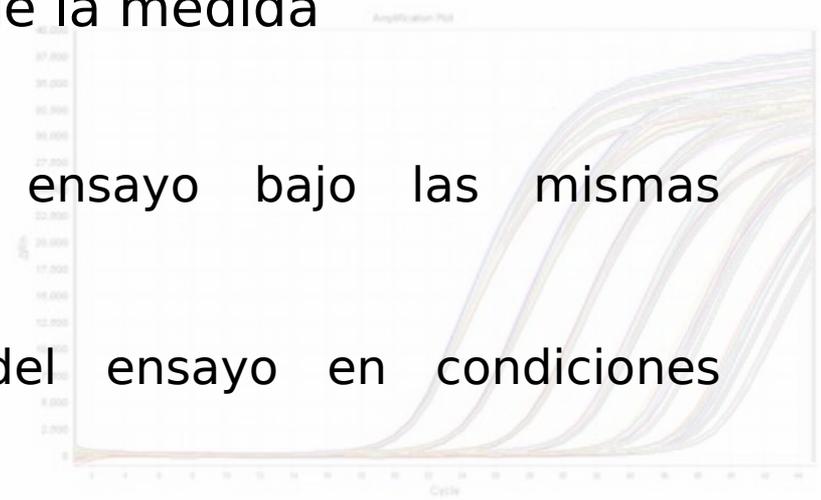
3. Fiabilidad

UNE/EN ISO 17025:2005

Grado de precisión o exactitud de la medida

Repetibilidad. Variabilidad del ensayo bajo las mismas condiciones

Reproducibilidad. Variabilidad del ensayo en condiciones diferentes



Fiabilidad

Coefficiente de Variación (CV) GPS™ dtec-qPCR Test

		MycAga	MycMyc	MycCa p	MycPut
Repetibilidad	Intra-ensayo	1,13 %	1,15 %	1,37 %	0,73 %
	Inter-ensayo	1,74 %	1,45 %	1,12 %	1,56 %
Reproducibilidad		1,67 %	2,17 %	2,27 %	1,36 %

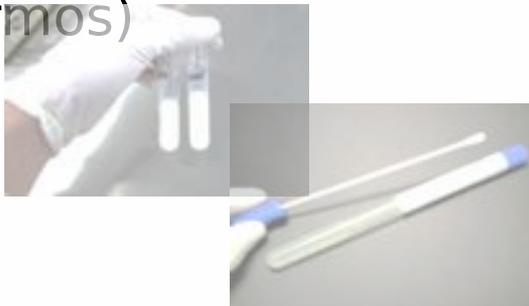
Criterio de aceptación CV < 10%

Especificidad y sensibilidad diagnóstica

Ensayos con muestras

Especificidad diagnóstica. (Falsos positivos en sujetos sanos)

Sensibilidad diagnóstica. (Falsos negativos en sujetos enfermos)



134 muestras de leche ovina/caprina

57 hisopos nasales/auriculares

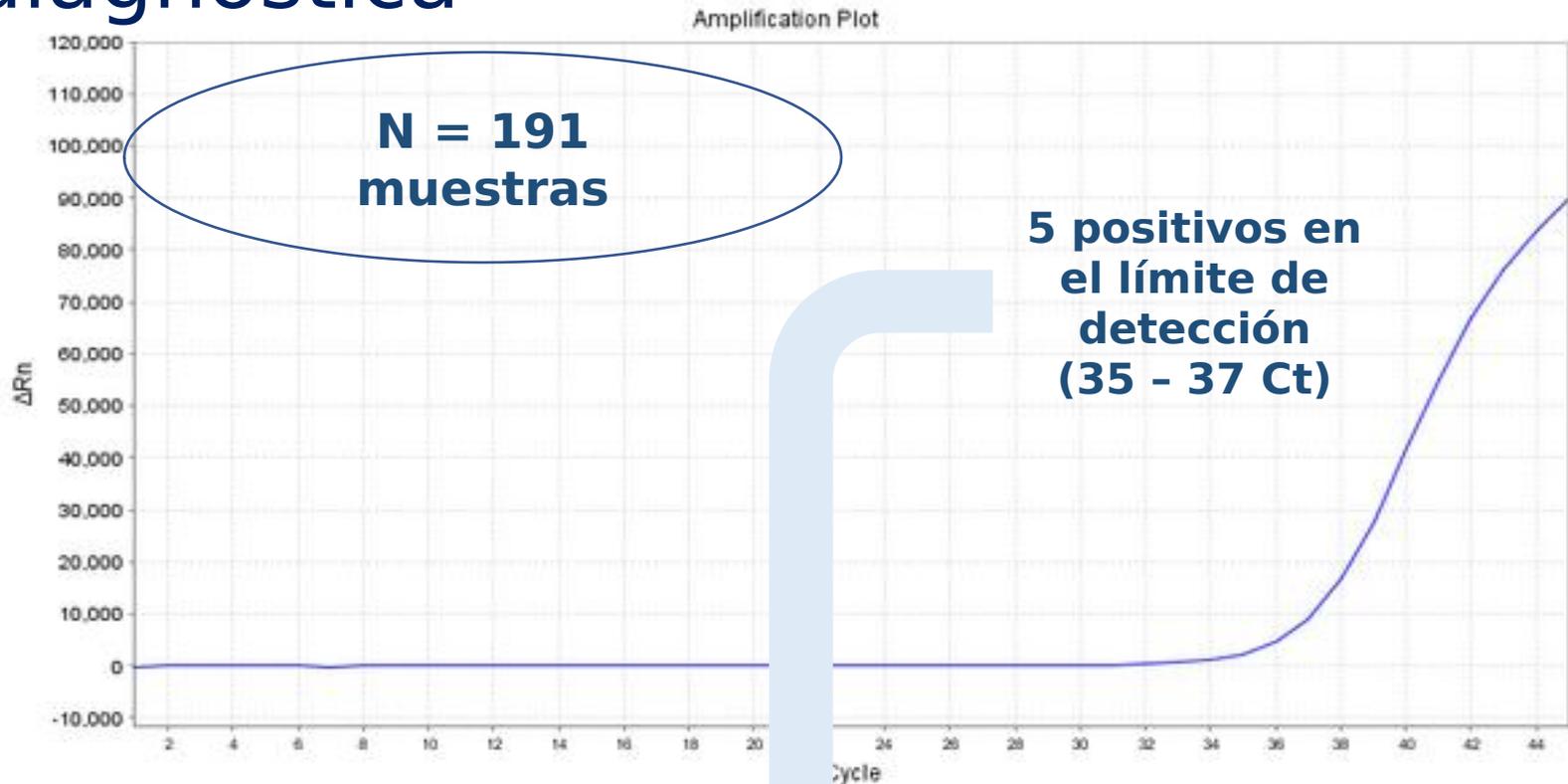
191 muestras

GPSpin Tissue DNA de
GPS™

	Ensayos GPS™ dtec-qPCR Test			
	MycAg a	MycMy c	MycCa p	MycPut
Especificidad diagnóstica	97,0 %	99,4 %	100 %	100 %
Sensibilidad diagnóstica	100 %	100 %	100 %	100 %
Eficiencia diagnóstica	97,9 %	99,5 %	100 %	100 %

Criterio de aceptación del 90%

Especificidad y sensibilidad diagnóstica



M. agalactiae: **Oravcova et al. (2009)**

M. mycoides, *M. capricolum* y *M. putrefaciens*: **Becker et al. (2012)**

Parámetros										
Especificidad analítica	Estudios <i>in silico</i> frente a todas las secuencias de las cepas de la especie diana	Estudios <i>in silico</i> frente a todas las secuencias de las cepas de la especie diana	Estudios <i>in silico</i> frente a todas las secuencias de las cepas de la especie diana	Estudios <i>in silico</i> frente a todas las secuencias de las cepas de la especie diana	Inclusividad: Amplificación positiva en todas las cepas de la especie diana	ACEPTADO				
	Estudios <i>in silico</i> frente al resto de las especies del genero <i>Mycoplasma</i> y los géneros cercanos <i>Spiroplasma</i> , <i>Mesoplasma</i> , <i>Entomoplasma</i> y <i>Haemobartonella</i>	Estudios <i>in silico</i> frente al resto de las especies del genero <i>Mycoplasma</i> y los géneros cercanos <i>Spiroplasma</i> , <i>Mesoplasma</i> , <i>Entomoplasma</i> y <i>Haemobartonella</i>	Estudios <i>in silico</i> frente al resto de las especies del genero <i>Mycoplasma</i> y los géneros cercanos <i>Spiroplasma</i> , <i>Mesoplasma</i> , <i>Entomoplasma</i> y <i>Haemobartonella</i>	Estudios <i>in silico</i> frente al resto de las especies del genero <i>Mycoplasma</i> y los géneros cercanos <i>Spiroplasma</i> , <i>Mesoplasma</i> , <i>Entomoplasma</i> y <i>Haemobartonella</i>	Exclusividad: Amplificación negativa frente al resto especies de <i>Mycoplasma</i> y géneros cercanos	ACEPTADO				
Sensibilidad analítica	$Y = -3.485 \cdot X + 38.646$ $a = -3.485$ $R^2 = 1.000$	$Y = -3.526 \cdot X + 39.938$ $a = -3.526$ $R^2 = 0.999$	$Y = -3.555 \cdot X + 42.252$ $a = -3.555$ $R^2 = 0.998$	$Y = -3.492 \cdot X + 39.504$ $a = -3.492$ $R^2 = 1.000$	$-3.587 < a < -3.103$	ACEPTADO				
	$F_{\text{assay}} = 3.80101$ $F_{\text{fisher}} = 5.31766$	$F_{\text{assay}} = 4.98647$ $F_{\text{fisher}} = 5.31766$	$F_{\text{assay}} = 4.74936$ $F_{\text{fisher}} = 5.31766$	$F_{\text{assay}} = 1.27551$ $F_{\text{fisher}} = 5.31766$	$F_{\text{assay}} < F_{\text{fisher}}$	ACEPTADO				
	Eficiencia (e) = 93.6 %	Eficiencia (e) = 92.1 %	Eficiencia (e) = 91.10 %	Eficiencia (e) = 93.3 %	$75 \% < e < 125 \%$	VALIDADO				
Fiabilidad*	Repetibilidad		Repetibilidad		Repetibilidad		Repetibilidad		CV < 10 %	REPETIBLE
	Conc.	CV (%)	Conc.	CV (%)	Conc.	CV (%)	Conc.	CV (%)		
	10 ⁶ copias	0.54	10 ⁶ copias	0.76	10 ⁶ copias	0.52	10 ⁶ copias	0.94		
	10 ⁵ copias	0.29	10 ⁵ copias	0.99	10 ⁵ copias	0.57	10 ⁵ copias	0.38		
	10 ⁴ copias	0.33	10 ⁴ copias	0.44	10 ⁴ copias	0.45	10 ⁴ copias	0.31		
	10 ³ copias	0.37	10 ³ copias	0.49	10 ³ copias	0.50	10 ³ copias	0.36		
	10 ² copias	0.51	10 ² copias	1.06	10 ² copias	2.17	10 ² copias	0.56		
	10 ¹ copias	3.27	10 ¹ copias	2.25	10 ¹ copias	2.71	10 ¹ copias	2.20		
	Reproducibilidad		Reproducibilidad		Reproducibilidad		Reproducibilidad		CV < 10 %	REPRODUCIBLE
	Conc.	CV (%)	Conc.	CV (%)	Conc.	CV (%)	Conc.	CV (%)		
	10 ⁶ copias	1.84	10 ⁶ copias	0.87	10 ⁶ copias	0.79	10 ⁶ copias	0.94		
	10 ⁵ copias	1.50	10 ⁵ copias	1.88	10 ⁵ copias	2.41	10 ⁵ copias	0.37		
	10 ⁴ copias	1.35	10 ⁴ copias	1.81	10 ⁴ copias	1.85	10 ⁴ copias	0.38		
	10 ³ copias	0.75	10 ³ copias	1.96	10 ³ copias	2.62	10 ³ copias	0.60		
10 ² copias	0.92	10 ² copias	2.24	10 ² copias	2.94	10 ² copias	0.83			
10 ¹ copias	2.93	10 ¹ copias	3.95	10 ¹ copias	2.50	10 ¹ copias	3.12			
LD* (10 copias)	Posit. = 93,3%	Posit. = 93,3%	Posit. = 93,3%	Posit. = 100%	Positivos ≥ 90 %	ACEPTADO				
LQ* (10 copias)	t value = 1.234 $t_{\text{student}} = 2.145$	t value = 0.050 $t_{\text{student}} = 2.201$	t value = 0.063 $t_{\text{student}} = 2.160$	t value = 0.160 $t_{\text{student}} = 2.144$	t value < t_{student}	ACEPTADO				
Especificidad diagnóstica	Verdaderos Negativos: 128 Falsos Positivos: 4 ED = 97.0 %	Verdaderos Negativos: 174 Falsos Positivos: 1 ED = 99.4 %	Verdaderos Negativos: 181 Falsos Positivos: 0 ED = 100 %	Verdaderos Negativos: 181 Falsos Positivos: 0 ED = 100 %	ED > 90 %	ACEPTADO				
Sensibilidad diagnóstica	Verdaderos Positivos: 59 Falsos Negativos: 0 SD = 100 %	Verdaderos Positivos: 16 Falsos Negativos: 0 SD = 100 %	Verdaderos Positivos: 10 Falsos Negativos: 0 SD = 100 %	Verdaderos Positivos: 10 Falsos Negativos: 0 SD = 100 %	SD > 90 %	ACEPTADO *n=15				

Laboratorio Autorizado por M Nº Autorización: R-10046



ISO 9001

BUREAU VERITAS
Certification



ISO 13485

BUREAU VERITAS
Certification





Genetic PCR Solutions™
by **GENETIC ANALYSIS STRATEGIES S.L**

CEEI - Elche

Polg. Ind. Carrús

Ronda Vall d'Uxó 125

03206-Elche (Alicante) Spain

Phone: +34-965429901

Fax: +34-966661040

www.geneticpcr.com

info@geneticpcr.com