ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE MEDICIÓN EN LA CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA DE ADN POR PCR EN TIEMPO REAL

John Emerson Leguizamón Guerrero[1], Ivonne Alejandra González Cárdenas[2], Luisa Juana Bernal Roa[3]

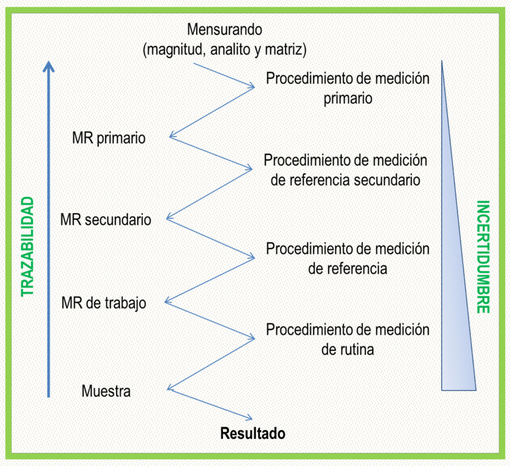
[1] Químico, M. Sc. Subdirección de Metrología Química y Biomedicina, Instituto Nacional de Metrología de Colombia (INM). E-mail: jeleguizamon@inm.gov.co.
[2] Química, M. Sc. Subdirección de Metrología Química y Biomedicina, Instituto Nacional de Metrología de Colombia (INM). E-mail: iagonzalez@inm.gov.co.
[3] Ingeniera Química, M. Sc. Subdirección de Metrología Química y Biomedicina, Instituto Nacional de Metrología de Colombia (INM). E-mail: lbernal@inm.gov.co.

INTRODUCCIÓN

La técnica PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR) es considerada como un método de referencia en el área de biología molecular que se emplea especialmente para la cuantificación de ácidos nucleicos debido a su amplio intervalo dinámico de trabajo, sensibilidad, precisión, rapidez, especificidad, bajo costo y versatilidad. Al igual que cualquier método de medición, es necesario garantizar que sus resultados sean confiables, por tanto, el laboratorio debe estar en capacidad de demostrar la trazabilidad de sus mediciones a través de mecanismos como: la validación del método analítico, el control metrológico sobre los equipos, el uso de materiales de referencia certificados y la estimación de la incertidumbre de medición; todo esto le dará la posibilidad de comparar sus resultados contra los obtenidos en un tiempo y lugar diferente, contra un valor certificado, un límite legal o un resultado obtenido por medio de un procedimiento de medición diferente. A continuación se presenta el tratamiento y la forma de evaluar las fuentes probables de incertidumbre para la cuantificación absoluta de ADN por qPCR.

TRAZABILIDAD [1]

Propiedad del resultado de una medición por la cual este puede relacionarse con una referencia mediante una cadena ininterrumpida y documentada de calibraciones, cada una de las cuales contribuye a la incertidumbre de medida.



INCERTIDUMBRE [1]

Parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los valores atribuidos a un mensurando a partir de la información usada. Puede ser una desviación típica o un intervalo con una probabilidad de cobertura determinada.

PASOS PARA LA ESTIMACIÓN DE INCERTIDUMBRE [2,3]

MODELO MATEMÁTICO

↓

IDENTIFICACIÓN DE FUENTES DE INCERTIDUMBRE

↓

MEDICIÓN INSTRUMENTAL

↓

CÁLCULO DE LA INCERTIDUMBRE TÍPICA

↓

CÁLCULO DE COVARIANZAS ASOCIADAS

↓

RESULTADO DE MEDICIÓN

↓

ESTIMACIÓN DE INCERTIDUMBRE COMBINADA Y EXPANDIDA

ESTIMACIÓN DE INCERTIDUMBRE EN LA CUANTIFICACIÓN DE ADN [4]

$$W_{ADN} = 10^{R_W} f_D$$

W_{ADN}: Concentración ADN
R_W: Valor interpolado en la curva de calibración
f_D: Factor de dilución

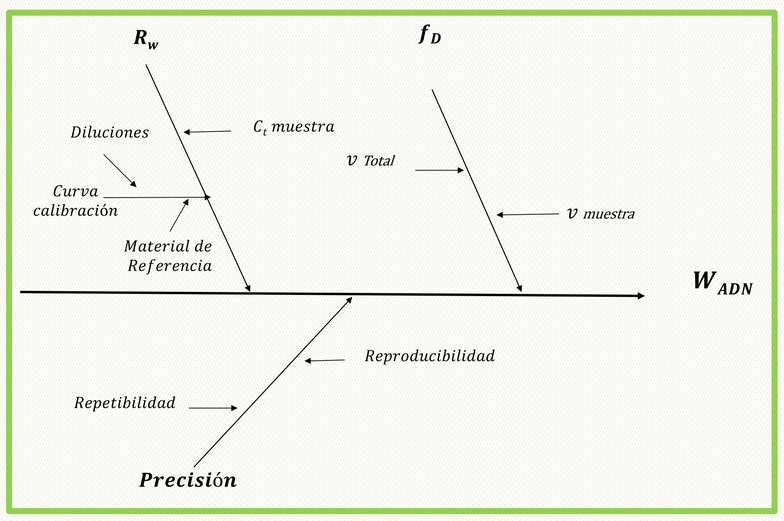


Figura 1 Diagrama de causa efecto para identificar las fuentes de incertidumbre

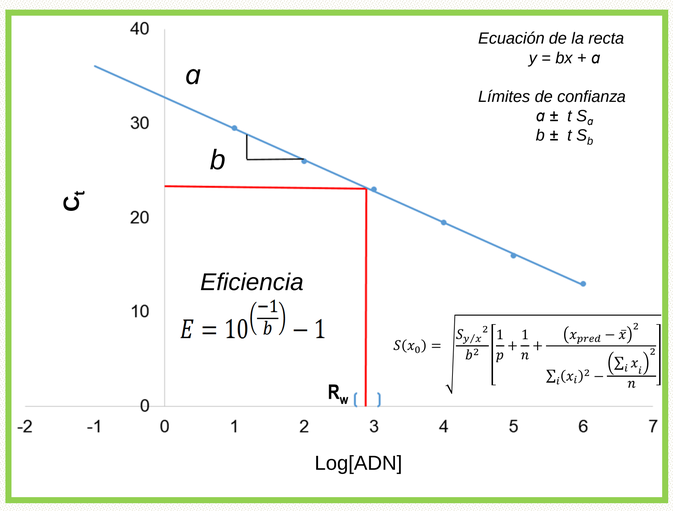


Figura 2 Curva de calibración para la cuantificación de ADN, indicando los parámetros obtenidos a partir de la regresión

Tabla 1. Presupuesto de incertidumbre para la cuantificación absoluta de ADN por qPCR

Fuente de incertidumbre	Tipo de incertidumbre	Distribución	Incertidumbre tipica o estandar ($u(x_i)$)	Coef. Sensibilidad (C_{xi})	Incertidumbre combinada (u_c)
R_w	A: Estadística (incluye contribución de incertidumbres tipo B del material volumétrico)	Incertidumbre tipo A: Distribución normal.	Normal: $\frac{s}{\sqrt{n}}$	$\frac{\partial y}{\partial x_i}$	$\sqrt{\sum_{i=1}^{N} C_{xi}^2\, u^2(x_i)}$
f_D		Incertidumbre tipo B: Distribuciones rectangulares o triangulares	Rectangular: $\frac{a}{\sqrt{3}}$		
Precisión	A: Estadística		Triangular: $\frac{a}{\sqrt{6}}$		
$W_{ADN} \pm k\, u_c$					

s : desviación estándar; ***n*** : número de observaciones; ***a*** : tolerancia del instrumento; ***k*** : factor de cobertura

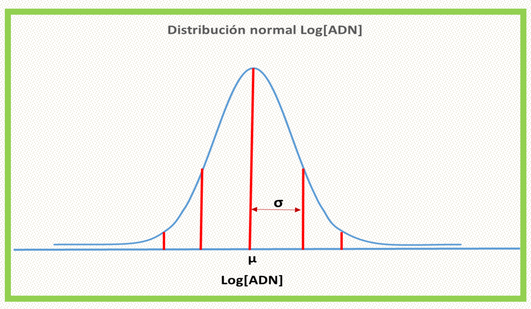


Figura 2 Esquema distribución normal de los resultados de medición de log[ADN]

La relación entre la indicación instrumental (C_t) y la concentración de ADN no tiene un comportamiento lineal, por lo que es necesario emplear la función logaritmo que permite linealizar la tendencia. Para el cálculo de la incertidumbre típica es necesario transformar la incertidumbre en términos de log[ADN] en [ADN].

CONCLUSIÓN

Dado que no se encuentra un gran número de trabajos publicados donde se realicen estimaciones de incertidumbre en el cálculo de la concentración de ADN, se plantea un modelo teórico que permita asociar esté parámetro a un resultado de medición. Es de esperarse que en un trabajo práctico, al evaluar las fuentes de incertidumbre, se encuentre que las principales contribuciones se den por el material de referencia, la repetibilidad y la reproducbilidad del método analítico que se determina durante la validación.

BIBLIOGRAFÍA

1. BIPM, 2012. JCGM 200:2012 International vocabulary of metrology - Basic and general concepts and associated terms. Tercera edición. En BIPM, http://www.bipm.org (108 p.); consulta: marzo 2014
2. JCGM 104:2009. Evaluation of measurement data – An introduction to the "Guide to the expression of uncertainty in measurement". First edition. En BIPM, http://www.bipm.org; consulta: marzo 2014
3. S L R Ellison and A Williams (Eds). Eurachem/CITAC guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, Third edition, (2012) ISBN 978-0-948926-30-3. Available from www.eurachem.org; consulta: marzo 2014
4. Love, J.L.; Scholes, P.; Gilpin, B.; Savill, M.; Lin, S.; Samuel, L. 2006. Evaluation of uncertainty in quantitative real-time PCR. Journal of Microbiological Methods, 67, 349-356.