

Universidad Pública de Navarra

Nafarroako Unibertsitate Publikoa

**ESCUELA TECNICA SUPERIOR DE
INGENIEROS AGRONOMOS**

*NEKAZARITZAKO INGENIARIEN GOI MAILAKO
ESKOLA TEKNIKO*

**VERIFICACIÓN DE UN PROCEDIMIENTO DE ENSAYO PARA LA DETECCIÓN Y
CUANTIFICACIÓN DE ORGANISMOS MANIPULADOS GENÉTICAMENTE.**

**GENETIKOKI ERALDATUTAKO ORGANISMOAK DETEKTATZEKO ETA ZENBATZEKO
METODO BATEN EGIAZTAPENA.**

Presentado por:

J.I. Pascal Gallegos-ek

aurkeztua

**GRADO EN INGENIERÍA AGROALIMENTARIA Y DEL MEDIO RURAL
GRADUA NEKAZARITZAKO ELIKAGAIEN ETA LANDA INGURUNEAREN INGENIARITZAN**

Septiembre 2014

2014-ko Iraila

Resumen

El objetivo de este trabajo es verificar la capacidad del LCA para realizar un procedimiento de ensayo de OGM en maíz, soja y sus harinas mediante PCR. Los parámetros a verificar y sus valores están establecidos por el JRC.

Los parámetros a verificar y sus valores están establecidos por el JRC.

En la extracción y purificación de ADN procedente de soja y/o maíz se verifica que el método cumple con los requisitos de cantidad y ausencia de inhibidores. En los métodos cualitativos se verifica que el límite de detección para los elementos Promotor P-35S, terminador t-NOS, evento MON810 y construcción GTS-40-3-2 es menor del 0,05% en masa.

En la cuantificación del evento MON810 se verifica que el rango dinámico se encuentra entre el 0,05 y el 10 % y entre el 0,1 y el 10 % en la cuantificación de la construcción GTS-40-3-2.

Los datos obtenidos en la verificación se emplean para comenzar el cálculo de la incertidumbre de medida y los límites de aceptación y rechazo.

Palabras clave:

PCR, OGM, Verificación, soja, maíz

Abstract

The aim of this work is to verify the ability of LCA to perform a test procedure of GMOs in maize, soybean and their flours by PCR. The parameters to verify and its values are set by the JRC.

In the extraction and purification of DNA from soybean and / or corn verified that the method meets the requirements of quantity and absence of inhibitors.

In qualitative methods verified that the detection limit for the elements P-35S promoter and t-NOS terminator, for the MON810 event and for the GTS-40-3-2 construction is less than 0.05% by mass.

In quantifying the MON810 event verified that the dynamic range is between 0.05 and 10% and between 0.1 and 10% in quantifying of the GTS-40-3-2 construction.

The data obtained in the verification are used to start calculating of the measurement uncertainty and limits of acceptance and rejection.

Key words

PCR, GMO; Verification, soybean, maize.

Índice.

Índice general.

Resumen	3
Palabras clave:.....	3
Abstract	3
Key words	3
Índice.....	5
Índice general.....	5
Índice de tablas.....	7
Índice de figuras.....	10
1. Introducción.....	11
1.1. Descripción del problema a estudiar.....	11
1.1.1. Organismos Manipulados Genéticamente (OMG).....	11
1.1.2. Entidades implicadas en el análisis de los OMG.....	13
1.1.3. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).....	14
1.1.4. Norma ISO/IEC 17025:2005. Requisitos generales relativos a la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración	17
1.1.5. Plan de verificación e informe de verificación.....	19
1.2. Nivel de resolución.....	20
1.3. Justificación.....	20
1.4. Requisitos a verificar según la documentación de referencia.....	21
1.4.1. Extracción y Purificación de Ácidos Nucleicos.....	21
1.4.2. Métodos Cualitativos.....	22
1.4.3. Métodos Cuantitativos.....	22
1.4.4. Estimación de la Incertidumbre de medida	24
1.4.5. Gráficas de control de Shewhart.....	25
2. Objetivos.....	26
3. Materiales y Métodos.....	27
3.1. Diseño experimental.....	27
3.1.1. Extracción y Purificación de Ácidos Nucleicos.....	27
3.1.2. Métodos cualitativos (LOD).....	27
3.1.3. Cuantificación de eventos y/o construcciones.....	28
3.1.4. Estimación de la Incertidumbre de medida	30
3.2. Materiales.....	31
3.2.1. Materiales de Referencia	31
3.2.2. Aparatos, Equipos y Materiales.....	37

3.2.3.	Reactivos	39
3.3.	Métodos de análisis utilizados.....	41
3.3.1.	Extracción y purificación de ADN	41
3.3.2.	Cuantificación de ADN	42
3.3.3.	PCR, pasos comunes	42
3.3.4.	Métodos Cualitativos.....	44
3.3.5.	Métodos Cuantitativos.....	46
3.4.	Operarios	47
4.	Resultados y discusión.	48
4.1.	Extracción y purificación de ADN.....	48
4.1.1.	Soja.....	48
4.1.2.	Maíz.....	51
4.2.	Métodos cualitativos LD	54
4.2.1.	Soja.....	54
4.2.2.	Maíz.....	55
4.3.	Métodos cuantitativos.....	56
4.3.1.	Construcción Soja GTS 40-3-2	56
4.3.2.	Evento MON810	64
5.	Conclusiones.	72
6.	Bibliografía.....	73
7.	Anexos.....	80
7.1.	Cálculos de concentración.....	80
7.1.1.	Construcción Soja GTS-40-3-2	80
7.1.2.	Evento Maíz MON810	82
7.2.	Rectas de regresión.....	84
7.2.1.	ADH	84
7.2.2.	Soja GTS-40-3-2	85
7.2.3.	Maíz MON810	89

Índice de tablas.

Tabla 1: Características del evento Maíz MON-ØØ81Ø-6 (MON810)	12
Tabla 2: Características del evento Soja MON-Ø4Ø32-6 (GTS 40-3-2 Rondoup Ready)	12
Tabla 3: Parámetros y objetivos a verificar en la extracción y purificación de ADN.	27
Tabla 4: Parámetros y objetivos a verificar en los métodos cualitativos.....	28
Tabla 5: Parámetros y objetivos a verificar en los métodos cuantitativos (Rango dinámico, Precisión y Veracidad).	29
Tabla 6: Parámetros y objetivos a verificar en los métodos cuantitativos (LOQ).....	30
Tabla 7: Valores certificados del MRC MON810 ERM-BF413k.	31
Tabla 8: Valores certificados del MRC Soja GTS-40-3-2, ERM-BF410.....	31
Tabla 9: Valores certificados del MRC Soja GTS-40-3-2, ERM-BF410k.....	31
Tabla 10: Valores certificados del MRC Maíz Bt11, ERM-BF412.	31
Tabla 11: Incertidumbre estimada para la mezcla de harinas de soja GTS-40-3-2 ERM-BF-410 a y 410b (BV-RFIP-002).....	33
Tabla 12: Incertidumbre estimada para la mezcla de harinas de Maíz MON810 ERM-BF-413ak a y 413bk (BV-RFIP-003).....	34
Tabla 13: Cálculo de los volúmenes de extractos para conseguir mezclas equivalentes a un 1 % de MON810.	35
Tabla 14: Datos de partida para el cálculo de la incertidumbre del contenido equivalente de MG de las mezclas de ADN a un 1 % de MON810.....	36
Tabla 15: Cálculos de la incertidumbre de la concentración MG equivalente en mezclas de ADN al 1 % de MON810.....	37
Tabla 16: Incertidumbre de la concentración equivalente de las mezclas de ADN MON810 al 1 %	37
Tabla 17: Parámetros del método para la detección por PCR de la ADH del Maíz.....	44
Tabla 18: Parámetros del método para la detección por PCR del gen de la Lectina de la Soja	44
Tabla 19: Parámetros del método para la detección por PCR del Promotor P35S.....	45
Tabla 20: Parámetros del método para la detección por PCR del terminador t-NOS	45
Tabla 21: Parámetros del método para la detección por PCR del evento MON810.	46
Tabla 22: Parámetros del método para la detección por PCR de la construcción soja GTS-40-3-2.	46
Tabla 23: Resultados de la extracción de ADN en harina de soja.....	48
Tabla 24: Resultados de los ensayos de inhibición en extractos de ADN procedentes de harina de soja.	49
Tabla 25: Cálculos de inhibición en extractos de ADN procedentes de harina de soja.	50
Tabla 26: Resultados de la extracción de ADN en harina de maíz.	51
Tabla 27: Resultados de los ensayos de inhibición en extractos de ADN procedentes de harina de maíz.	52
Tabla 28: Cálculos de inhibición en extractos de ADN procedentes de harina de maíz.	53
Tabla 29: Resultados de los ensayos cualitativos en extractos de ADN procedentes de harina de soja.	54
Tabla 30: Resultados de los ensayos cualitativos en extractos de ADN procedentes de harina de maíz.	55

Tabla 31: Diseño de la placa para la cuantificación de la construcción GTS-40-3-2 en extractos de ADN procedente de harina de soja.	56
Tabla 32: Valores de Ct obtenidos en la cuantificación de la construcción GTS-40-3-2 en extractos de ADN procedente de harina de soja (16/07/14).....	56
Tabla 33: Valores de Ct obtenidos en la cuantificación de la construcción GTS-40-3-2 en extractos de ADN procedente de harina de soja (18/07/14).....	57
Tabla 34: Valores de Ct obtenidos en la cuantificación de la construcción GTS-40-3-2 en extractos de ADN procedente de harina de soja (18/07/14-2).	57
Tabla 35: Valores de Ct obtenidos en la cuantificación de la construcción GTS-40-3-2 en extractos de ADN procedente de harina de soja (18/07/14-3).	57
Tabla 36: Rango lineal, Eficiencia, Pendiente y R^2 para la construcción Soja GTS-40-3-2.	58
Tabla 37: Rango lineal, Eficiencia, Pendiente y R^2 para el gen de la Lectina.	58
Tabla 38: Resultados y cálculo de la precisión para el nivel 1 de Soja GTS-40-3-2 (0,1 %).	59
Tabla 39: Medias diarias en el nivel 1 de Soja GTS-40-3-2	59
Tabla 40: Cálculo del sesgo para el nivel 1 de Soja GTS-40-3-2 (0,1 %).....	59
Tabla 41: Resultados y cálculo de la precisión para el nivel 2 de Soja GTS-40-3-2 (1,0 %).	60
Tabla 42: Medias diarias en el nivel 2 de Soja GTS-40-3-2	60
Tabla 43: Cálculo del sesgo para el nivel 2 de Soja GTS-40-3-2 (1,0 %).....	60
Tabla 44: Resultados y cálculo de la precisión para el nivel 3 de Soja GTS-40-3-2 (10,0 %).	61
Tabla 45: Medias diarias en el nivel 3 de Soja GTS-40-3-2	61
Tabla 46: Cálculo del sesgo para el nivel 3 de Soja GTS-40-3-2 (10,0 %).....	61
Tabla 47: Cálculo de la Incertidumbre de medida de cuantificación de la construcción GTS-40-3-2 en extractos de ADN procedente de harina de soja.....	62
Tabla 48: Datos de partida para el establecimiento de grafica de control en el nivel 2 de soja GTS-40-3-2	63
Tabla 49: Límites de aviso y control	63
Tabla 50: Diseño de la placa para la cuantificación del evento MON810 en extractos de ADN procedente de harina de maíz.....	64
Tabla 51: Valores de Ct obtenidos en la cuantificación del evento MON810 en extractos de ADN procedente de harina de maíz. (05/08/14).....	64
Tabla 52: Valores de Ct obtenidos en la cuantificación del evento MON810 en extractos de ADN procedente de harina de maíz. (05/08/14-2).	65
Tabla 53: Valores de Ct obtenidos en la cuantificación del evento MON810 en extractos de ADN procedente de harina de maíz. (11/08/14).....	65
Tabla 54: Valores de Ct obtenidos en la cuantificación del evento MON810 en extractos de ADN procedente de harina de maíz. (11/08/14-2).	65
Tabla 55: Rango lineal, Eficiencia, Pendiente y R^2 para la construcción Maíz MON810.	66
Tabla 56: Rango lineal, Eficiencia, Pendiente y R^2 para el gen de la ADH.	66
Tabla 57: Resultados y cálculo de la precisión para el nivel 1 de Maíz MON810 (0,05 %).....	67

Tabla 58: Medias diarias en el nivel 1 de maíz MON810.....	67
Tabla 59: Cálculo del sesgo para el nivel 1 de Maíz MON810 (0,05 %).....	67
Tabla 60: Resultados y cálculo de la precisión para el nivel 2 de Maíz MON810 (1,0 %).....	68
Tabla 61: Medias diarias en el nivel 2 de maíz MON810.....	68
Tabla 62: Cálculo del sesgo para el nivel 2 de Maíz MON810 (1,0 %).....	68
Tabla 63: Resultados y cálculo de la precisión para el nivel 3 de Maíz MON810 (10,0 %).....	69
Tabla 64: Medias diarias en el nivel 3 de maíz MON810.....	69
Tabla 65: Cálculo del sesgo para el nivel 3 de Maíz MON810 (10,0 %).....	69
Tabla 66: Cálculo de la Incertidumbre de medida MON810.....	70
Tabla 67: Datos de partida para el establecimiento de grafica de control en el nivel 2 de soja GTS-40-3-2.....	71
Tabla 68: Límites de aviso y control.....	71
Tabla 69: Cálculos del ensayo de cuantificación de la construcción GTS-40-3-2 en extractos de ADN procedente de harina de soja (16/07/14).....	80
Tabla 70: Cálculos del ensayo de cuantificación de la construcción GTS-40-3-2 en extractos de ADN procedente de harina de soja (18/07/14).....	80
Tabla 71: Cálculos del ensayo de cuantificación de la construcción GTS-40-3-2 en extractos de ADN procedente de harina de soja (18/07/14-2).....	81
Tabla 72: Cálculos del ensayo de cuantificación de la construcción GTS-40-3-2 en extractos de ADN procedente de harina de soja (18/07/14-3).....	81
Tabla 73: Cálculos del ensayo de cuantificación del evento MON810 en extractos de ADN procedente de harina de maíz. (05/08/14).....	82
Tabla 74: Cálculos del ensayo de cuantificación del evento MON810 en extractos de ADN procedente de harina de maíz. (05/08/14).....	82
Tabla 75: Cálculos del ensayo de cuantificación del evento MON810 en extractos de ADN procedente de harina de maíz. (11/08/14).....	83
Tabla 76: Cálculos del ensayo de cuantificación del evento MON810 en extractos de ADN procedente de harina de maíz. (11/08/14-2).....	83
Tabla 77: Recta de regresión en la cuantificación de la ADH (28/07/2014).....	84
Tabla 78: Cálculos de regresión en el ensayo de cuantificación de la construcción GTS-40-3-2 en extractos de ADN procedente de harina de soja (16/07/2014).....	85
Tabla 79: Cálculos de regresión en el ensayo de cuantificación de la construcción GTS-40-3-2 en extractos de ADN procedente de harina de soja (18/07/2014).....	86
Tabla 80: Cálculos de regresión en el ensayo de cuantificación de la construcción GTS-40-3-2 en extractos de ADN procedente de harina de soja (18/07/2014-2).....	87
Tabla 81: Cálculos de regresión en el ensayo de cuantificación de la construcción GTS-40-3-2 en extractos de ADN procedente de harina de soja (18/07/2014-3).....	88
Tabla 82: Cálculos de regresión en el ensayo de cuantificación del evento MON810 en extractos de ADN procedente de harina de maíz (05/08/2014).....	89

Tabla 83: Cálculos de regresión en el ensayo de cuantificación del evento MON810 en extractos de ADN procedente de harina de maíz (05/08/2014-2)	90
Tabla 84: Cálculos de regresión en el ensayo de cuantificación del evento MON810 en extractos de ADN procedente de harina de maíz (11/08/2014)	91
Tabla 85: Cálculos de regresión en el ensayo de cuantificación del evento MON810 en extractos de ADN procedente de harina de maíz (11/08/2014-2)	92

Índice de figuras.

Figura 1: Esquema de los elementos y las posibles secuencias diana presentes en el genoma del maíz MON810 (BIOAL, 2013).....	12
Figura 2: Esquema general de la PCR (Mullis, y otros, 1986) 1, 2 y 3: detalle del primer ciclo; 4 y 5: segundo ciclo, 6 y 7: tercer ciclo, en el cual aparecen los primeros fragmentos cortos	15
Figura 3: Separación del reporter y el quencher de una sonda específica hibridada con la secuencia diana, por la acción exonucleasa de la ADN polimerasa (Didenko, 2001).....	16
Figura 4: Resumen del diseño experimental para la verificación simultánea de Rango dinámico, precisión y exactitud, (Papazova, Roosens, & Taverniers, 2013).....	28
Figura 5: Gráfico de control para la soja GTS-40-3-2 en el nivel 2 (1,0 %)	63
Figura 6: Gráfico de control para el maíz en el nivel 2 (1,0 %)	71
Figura 7: Recta de regresión para la ADH (28/07/2014)	84
Figura 8: Rectas de regresión del ensayo de cuantificación de ADN de soja (16/07/14)	85
Figura 9: Rectas de regresión del ensayo de cuantificación de ADN de soja (18/07/14)	86
Figura 10: Rectas de regresión del ensayo de cuantificación de ADN de soja (18/07/14-2).	87
Figura 11: Rectas de regresión del ensayo de cuantificación de ADN de soja (18/07/14-3).	88
Figura 12: Rectas de regresión del ensayo de cuantificación de ADN de maíz (05/08/14)	89
Figura 13: Rectas de regresión del ensayo de cuantificación de ADN de maíz (05/08/14-2).....	90
Figura 14: Rectas de regresión del ensayo de cuantificación de ADN de maíz (11/08/14).	91
Figura 15: Rectas de regresión del ensayo de cuantificación de ADN de maíz (11/08/14-2).....	92

1. Introducción.

Los Organismos Manipulados Genéticamente (OMG), han generado y generan un debate social que en la Unión Europea se ha traducido en una legislación específica para regular su autorización, uso y liberación intencionada. Fruto de esta legislación han surgido una serie de entidades, entre cuyas funciones se encuentra la aprobación de los métodos de ensayo. La técnica de preferencia en estos métodos consiste en la amplificación de secuencias de ADN hasta un nivel detectable, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

El Reglamento (CE) 882/2004, regula los controles oficiales de alimentos y piensos, especificando en el apartado segundo de su artículo 12:

Sin embargo, las autoridades competentes podrán designar únicamente laboratorios que funcionen y estén evaluados y acreditados conforme a las siguientes normas europeas:

a) EN ISO/IEC 17025, «Requisitos generales relativos a la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración»...

La Norma UNE-EN ISO/IEC 17.025-2005, en su sección 5.4.5 exige para la acreditación de un procedimiento, la confirmación de la capacidad por parte del laboratorio para su aplicación. En el caso de métodos validados o normalizados, dicha confirmación consiste en una verificación.

El Laboratorio de Calidad Agroalimentaria (LCA) del Gobierno de Navarra, realiza análisis de la presencia de OMG en piensos y sus materias primas como parte del sistema de control oficial.

La verificación por parte del LCA de su capacidad para la aplicación de los métodos análisis de OMG forma parte del proceso en curso para ampliar el alcance de la acreditación conforme a la norma UNE-EN-ISO/IEC 17.025:2005.

1.1. Descripción del problema a estudiar.

1.1.1. Organismos Manipulados Genéticamente (OMG)

La Directiva 2001/18/CE, incorporada al ordenamiento jurídico español en la Ley 9/2003, define como Organismo Manipulado Genéticamente (OMG):

“el organismo, con excepción de los seres humanos, cuyo material genético haya sido modificado de una manera que no se produce naturalmente en el apareamiento ni en la recombinación natural”

Aunque esta definición abarca cualquier tipo de organismo, en el contexto del presente trabajo nos referiremos exclusivamente a plantas cuyo destino sea la alimentación humana o animal.

El proceso de manipulación genética no es objeto de este trabajo, si bien es conveniente aclarar algunos conceptos que se manejarán a lo largo del mismo (Figura 1).

- **Construcción génica:** Conjunto de genes insertados, compuesto generalmente por una serie de reguladores y el gen que codifica la(s) proteína(s) de interés. Una misma construcción puede estar insertada en distintas especies y/o variedades vegetales.

- **Secuencias reguladoras:** Generalmente promotores y/o terminadores. Los más usuales son el Promotor P-35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y el terminador t-NOS de *Agrobacterium tumefaciens*, presentes en 66 y 61 construcciones transgénicas respectivamente, 37 de las cuales contiene ambos elementos (BVL, 2014).

- **Evento específico:** Una variedad GM concreta, que contiene la(s) construcción(es) insertada(s) en número y lugar conocidos, en la Unión Europea, cada evento posee un código identificador único, independiente del nombre comercial de la variedad de que se trate, establecido en el reglamento (CE) N° 65/2004.

- **Región del Borde de Integración (IBR):** región de unión en la que un elemento procede del organismo huésped y la otra procede del ADN introducido durante la transformación.

- **Taxón específico:** puede referirse a cualquier nivel taxonómico, desde especie hasta reino, del que existe una secuencia de ADN conservada y conocida que está presente en el taxón diana pero ausente en otros taxa. Dicha secuencia se denomina “taxón específica” o “endógena” y no está afectada por la manipulación genética. Es importante conocer el número de copias de la secuencia presentes en un genoma haploide.

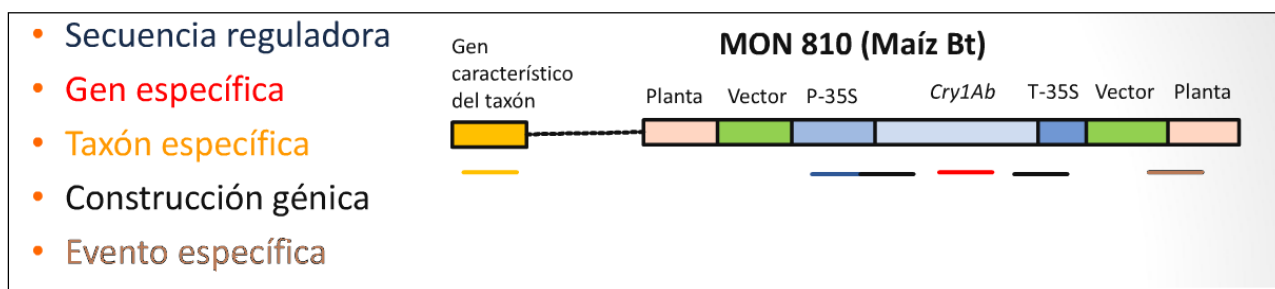


Figura 1: Esquema de los elementos y las posibles secuencias diana presentes en el genoma del maíz MON810 (BIOAL, 2013)

La reseña de los elementos genéticos introducidos en las MG cuyos métodos de detección y cuantificación van a ser verificados, son las siguientes (AgBIO, 2006):

Tabla 1: Características del evento Maíz MON-ØØ81Ø-6 (MON810)

Código	Nombre	Tipo	Promotor, otros	Terminador	Copias	Forma
cry1Ab	delta-endotoxina cry1Ab (Btk HD-1) (<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> (Btk))	RI	promotor 35 S potenciado del CaMV, intrón del gen hsp70del maíz	Ninguno. Perdido por truncamiento de la región 3' durante la integración	1	Truncada

Tabla 2: Características del evento Soja MON-Ø4Ø32-6 (GTS 40-3-2 Roundup Ready)

Código	Nombre	Tipo	Promotor, otros	Terminador	Copias	Forma
CP4 EPSPS	5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa de <i>A. tumefaciens</i> CP4	TH	promotor 35 S potenciado del CaMV, péptido de tránsito al cloroplasto proveniente de <i>Petunia hybrida</i>	señal de poliadenilación del gen nopalina sintasa (nos) de <i>A. tumefaciens</i>	1	Nativa; además, 2 secuenciasgénicas parciales (250 pb, 72pb)

RI: Resistencia a insectos TH: Tolerancia a herbicidas

1.1.2. Entidades implicadas en el análisis de los OMG

El Reglamento (CE) N° 1829/2003, contempla un umbral del 0,9% en masa (por ingrediente en el caso de alimentos; de las materia primas y aditivos en el caso de piensos) de presencia accidental o técnicamente inevitable de OMG autorizados, por encima del cual el etiquetado es obligatorio.

Si bien el reglamento establece la trazabilidad como principal método de identificación, es preciso realizar una serie de ensayos de laboratorio, cualitativos para la detección y/o identificación de OMG, y cuantitativos para determinar la obligación del etiquetado.

El procedimiento para la autorización de un nuevo OMG establecido en el citado reglamento, especifica (art. 5, aptdo. 3, para alimentos, y art. 17, aptdo. 3 para piensos), que el solicitante de la autorización entre otras cosas debe incluir en documentación:

i) métodos de detección, muestreo [...] e identificación de la transformación...

La autoridad, (art. 6, aptdo. 3, para alimentos, y art. 18, aptdo. 3 para piensos), para preparar su dictamen:

d) remitirá al laboratorio comunitario de referencia lo dispuesto en las letras i y j del [...] Dicho laboratorio comunitario de referencia probará y validará el método de detección e identificación propuesto por el solicitante

Dichos métodos, tras su validación por el laboratorio comunitario de referencia, formarán parte del dictamen.

En su anexo el reglamento (CE) N° 1829/2003, señala las competencias y tareas del laboratorio comunitario de referencia (EURL-GMFF) y designa como tal al Centro Común de Investigación de la Comisión (JRC), el cual estará asistido por un consorcio de Laboratorios Nacionales de Referencia (LNR) denominado Red Europea de Laboratorios OMG (ENGL).

Dentro del JRC, el IHCP (Institute for Health and Consumer Protection) es el organismo encargado de actuar como Laboratorio Europeo de Referencia para Alimentos y Piensos Genéticamente Modificados (EURL-GMFF, antes CRL-GMFF).

El JRC, además de su papel como EURL-GMFF, a través del JRC-IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements), desarrolla y produce Materiales de Referencia Certificados (MRC) necesarios para la validación y control de calidad de los métodos analíticos.

El IRMM forma parte del consorcio ERM, marca a través de la que se distribuyen los MRC de los OMG.

El JRC, la ENGL, el IRMM o la ERM han establecido y publicado en materia de análisis de OMG los documentos que servirán de guía en el presente trabajo:

- Los requisitos mínimos que han de cumplir los métodos analíticos.
- Los métodos analíticos validados y sus informes de validación.
- Procedimientos para la verificación por los laboratorios de los métodos analíticos validados.
- Métodos de medida de la incertidumbre en los laboratorios.
- Guías para la acreditación flexible de los laboratorios
- Guías para el uso de los MRC.

1.1.3. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Las técnicas de detección de OMG consisten en la búsqueda de la diferencia entre la variedad convencional y la MG. Esto puede realizarse detectando la proteína codificada por la MG o el ADN insertado, existiendo por tanto dos opciones (Terrón, 2008):

- 1.- El ensayo de inmunoabsorción enzimática o ELISA, que permite estudiar la presencia de proteínas específicas gracias a la especificidad de la unión antígeno-anticuerpo.
- 2.- La reacción en cadena de la polimerasa o PCR, que se basa en la detección de secuencias nuevas de DNA en el genoma de la planta.

Las técnicas basadas en proteínas actualmente están en desuso, ya que ni los genes se expresan de manera homogénea dentro de la misma planta, ni es posible el ELISA para proteínas con la estructura desnaturalizada por procesos de transformación de la industria agroalimentaria.

Por tanto la técnica analítica habitual en el análisis de OMG es la PCR. Sin entrar en detalles, se resumen los principios generales de la técnica.

La PCR consiste en la replicación de una secuencia (molde o diana) de ADN, gracias a la acción enzimática de la ADN-Polimerasa, en presencia de desoxiribonucleótidos-trifosfato (dNTPs) y de ciertos cofactores necesarios (principalmente el Mg^{2+}).

La acción enzimática comienza en un punto en el que la doble hebra de ADN está interrumpida en su extremo 5' faltando la hebra complementaria en sentido 5'-3', que es reconstruida por la ADN-Polimerasa.

Este punto de inicio se puede recrear artificialmente, en un ADN desnaturalizado, empleando oligonucleótidos (alrededor de 20 pares de bases) complementarios de dos regiones cortas que flanqueen a la secuencia que se pretende amplificar como cebadores (Primers), uno para cada una de las dos hebras de la secuencia. Generalmente se denominan cebadores directo y reverso (Forward y Reverse, abreviados F y R).

Para que estos cebadores se unan al ADN molde, este debe estar desnaturalizado (con la doble hebra separada). La desnaturalización se consigue aumentando la temperatura de la mezcla hasta 94-95°C. La ADN-Polimerasa debe ser capaz de resistir estas temperaturas sin perder su estructura, por lo que se emplean enzimas originarias de bacterias termófilas, habitualmente la Taq Polimerasa de *Thermus aquaticus*.

La especificidad de la reacción dependerá de la especificidad de la unión cebador-molde, la cual está influida por la temperatura a la que se produzca la hibridación molde-cebadores (más temperatura implica más especificidad, la temperatura óptima depende de la proporción AT/CG del cebador y debe establecerse experimentalmente).

Todos los reactivos deben estar libres de ADNasas, para lo cual se debe emplear agua de calidad PCR en su disolución.

La extracción y purificación del ADN de las muestras es un punto crítico. Las muestras deben estar libres de inhibidores de la reacción, sustancias que por afectar al ADN, a la ADN-Polimerasa o a los cofactores, impiden el desarrollo normal de la PCR.

Actualmente suelen emplearse Premix que con una concentración habitual de 2x, contienen la Polimerasa, los dNTPs y el Mg^{2+} , en un tampón de pH adecuado para la acción enzimática.

A esta PreMix se le añaden los oligonucleótidos en los volúmenes adecuados para la concentración final deseada y se completa el volumen (a falta de la muestra) con agua. Esta mezcla maestra (MasterMix) se distribuye en los distintos tubos o pocillos en los que se va a desarrollar la reacción.

A continuación se añade la muestra y se lleva a cabo la reacción:

La etapa de amplificación consta de varios ciclos con tres etapas de tiempo y temperatura, como se muestra en la Figura 2.

- 1.- Desnaturalización
- 2.- Hibridación (Annealing)
- 3.- Elongación (la hibridación y la elongación pueden tener lugar simultáneamente, consistiendo cada ciclo aparentemente en dos etapas)

Estos ciclos se repiten un determinado número de veces (Figura 2; 4 y 5: segundo ciclo, 6 y 7: tercer ciclo). De este modo, en cada reacción la cantidad del ADN diana se duplica. Inicialmente predominan los fragmentos largos, pero progresivamente van apareciendo fragmentos, denominados amplicones, correspondientes en tamaño a la distancia entre los dos cebadores.

Los aparatos en que se realiza la amplificación, capaces de subir y bajar la temperatura en breve espacio de tiempo y mantenerla constante durante los periodos programados para ello, son denominados Termocicladores.

Teóricamente, una sola copia de la secuencia diana puede convertirse en 2^n copias al cabo de n ciclos ($1,1 \times 10^{12}$ copias en 40 ciclos).

Esta sensibilidad de la técnica implica que el riesgo de obtener resultados falsos positivos por contaminación es un aspecto a considerar.

La contaminación durante una PCR puede proceder de diferentes fuentes (Terrón, 2008):

- Mesas de laboratorio, equipos y pipetas, que pueden estar contaminados con preparados anteriores de DNA, o con fragmentos de restricción purificados.
- Contaminación cruzada entre muestras.
- Productos de amplificaciones anteriores por PCR.

Las fuentes de estas contaminaciones son el polvo y la dispersión de aerosoles.

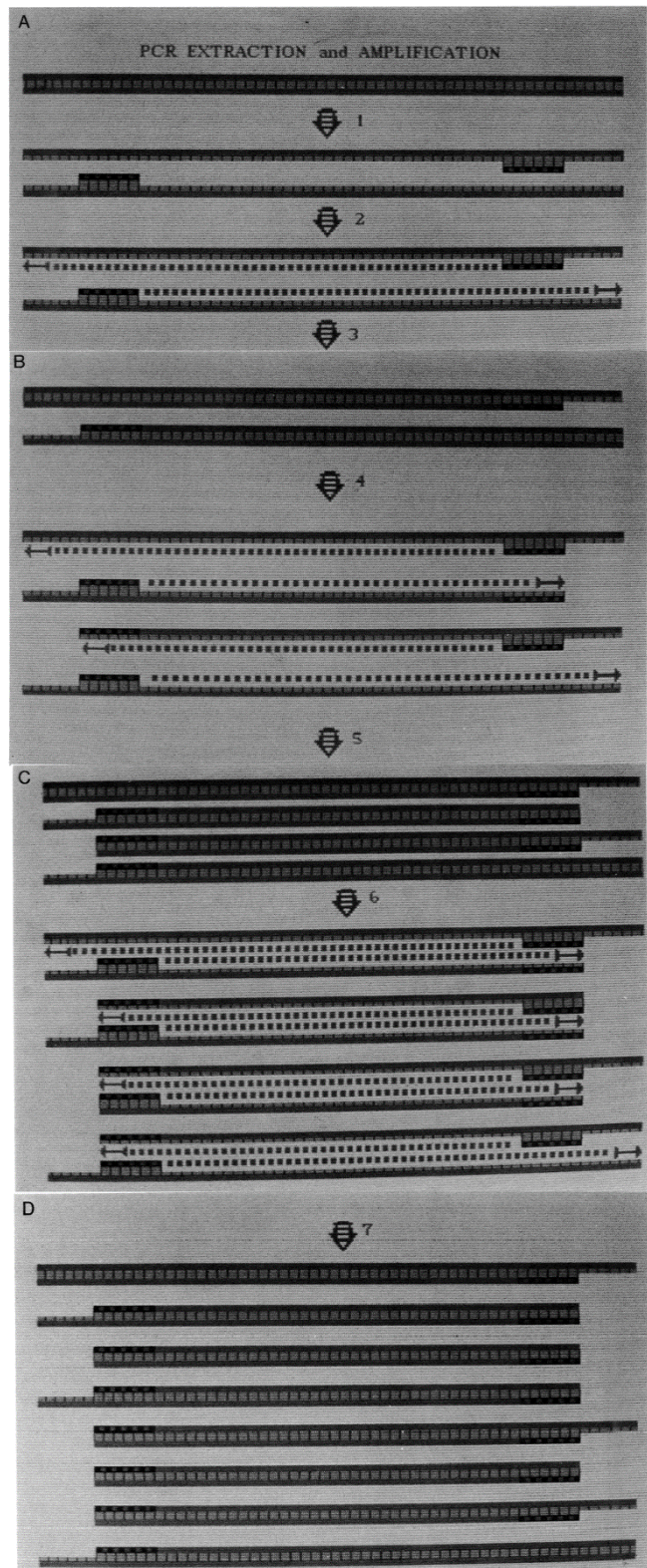


Figura 2: Esquema general de la PCR (Mullis, y otros, 1986) 1, 2 y 3: detalle del primer ciclo; 4 y 5: segundo ciclo, 6 y 7: tercer ciclo, en el cual aparecen los primeros fragmentos cortos

En consecuencia la organización del área de trabajo en el laboratorio se basa en (UNE-EN ISO 24276, 2007):

- Aislamiento sistemático de los pasos metodológicos implicados en la producción de resultados.
- El principio de flujo hacia delante para la manipulación de las muestras.

En un ensayo por PCR se deben utilizar controles positivos para comprobar que se ha producido la amplificación y negativos, para descartar posibles contaminaciones.

La detección de los productos de la amplificación puede realizarse:

- Tras la finalización de la PCR, (PCR de punto final), mediante técnicas de electroforesis en gel de agarosa o similares.

- Simultáneamente al proceso de amplificación usando fluorescencia, de forma que su aumento sea proporcional a la cantidad de ADN formada (PCR a tiempo real o q-PCR). Este sistema requiere de un aparato capaz de realizar tanto las variaciones de temperatura como la emisión y detección de luz a la longitud de onda adecuada para el fluorocromo empleado.

A su vez la PCR a tiempo real se divide según el tipo de fluorocromo (Sundquist, 2005)

La PCR en tiempo real implica el uso de sondas de ácidos nucleicos marcados con fluorescencia, o cebadores de unión al ADN o colorantes fluorescentes, tales como SYBR ® Green, para detectar y cuantificar un producto de PCR en cada ciclo durante la amplificación. Mientras que los colorantes de unión al ADN son fáciles de usar, no diferencian entre productos específicos y no específicos de la PCR, y la acumulación de productos de PCR no específicos pueden causar falsos positivos. Las sondas marcadas con fluorescencia tienen la ventaja de que sólo reconocen los productos de PCR específicos, pero pueden ser costosas y difíciles de diseñar.

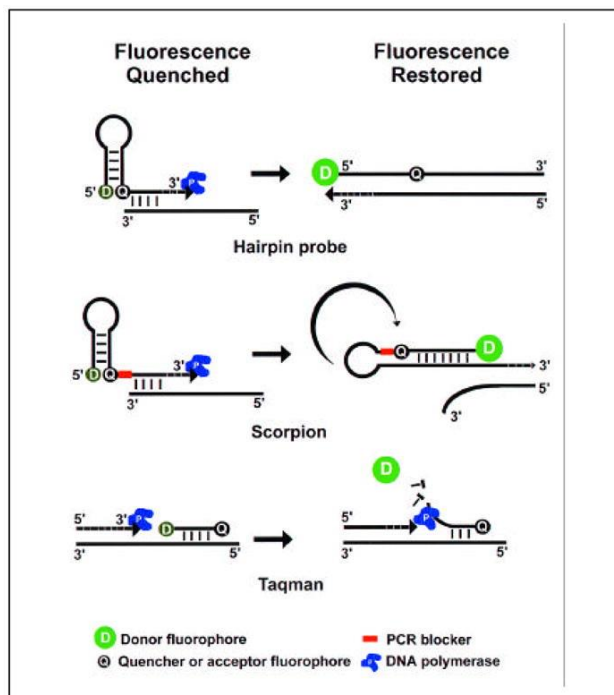


Figura 3: Separación del reporter y el quencher de una sonda específica hibridada con la secuencia diana, por la acción exonucleasa de la ADN polimerasa (Didenko, 2001).

Muchos enfoques de PCR en tiempo real emplean dos fluorocromos diferentes y se basan en la transferencia de energía de un fluorocromo (el donador de energía) a un segundo fluorocromo (el aceptor de energía) cuando los fluorocromos están en proximidad. El segundo indicador puede ser un inhibidor de la fluorescencia o un fluorocromo.

Un extinguidor absorbe la energía del primer fluorocromo y la emitirá como calor en lugar de luz, lo que lleva a una disminución en la señal fluorescente. Un fluorocromo absorberá la energía para emitirla a otra longitud de onda a través de la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), revisado por (Didenko, 2001), resultando en una disminución de la fluorescencia del donador de energía y el aumento de fluorescencia del aceptor de energía. El cambio en la fluorescencia es proporcional a la acumulación de producto de PCR.

Los fluorocromos emisores son denominados reporter y el extinguidor o secuestrador se denomina quencher.

El reporter más habitual es la FAM (6-carboxifluoresceína), pero existe gran variedad, con distintos espectros de emisión y absorción, permitiendo la detección simultánea de más de una secuencia diana (PCR-Multiplex).

El incremento de la fluorescencia (R_n) sigue el modelo exponencial de la amplificación de la secuencia diana (en caso de que la misma esté presente), hasta que en un determinado ciclo se alcanza el umbral de fluorescencia fijado para considerar una muestra como positiva (Ciclo umbral o C_t por sus siglas en inglés). El C_t puede establecerse a partir de la pendiente de la curva de aumento de R_n o fijarse en un valor determinado de R_n , debiendo estar situado en la zona de crecimiento exponencial de la curva de R_n frente al número de ciclos.

Los C_t de una serie de muestras con un número conocido de copias de la secuencia diana permite realizar una cuantificación del número de copias presentes en la muestra problema. Para ello se debe realizar una curva de regresión representando el logaritmo de distintas concentraciones conocidas frente a sus C_t s. Obteniendo por mínimos cuadrados la ecuación de la recta, se procede a interpolar el C_t de la muestra problema para obtener el logaritmo de su concentración.

En el caso particular de la cuantificación de OMG hay que considerar los siguientes aspectos (JRC, Trapman, & et al., 2014):

1.- Los umbrales legales están establecidos en fracciones máxicas, por lo que los datos obtenidos como número de copias de genoma haploide, deben ser transformados a sus equivalentes en masa. Esto se realiza considerando la masa del genoma haploide, la cigosidad de la transformación y en el caso de semillas o granos de cereal, las proporciones entre el embrión y el resto de la semilla y sus correspondientes ploidías, datos todos ellos con una importante incertidumbre.

Esta dificultad se subsana en parte utilizando como patrones MRC de la misma matriz que las muestras, generalmente mezclas de harinas GM y no GM en proporciones conocidas, que se someten a procesos de extracción y purificación de ADN idénticos a las muestras problema (la extractabilidad del ADN debe ser igual para la harina GM y no GM).

2.-La legislación sobre alimentos y piensos indica el contenido umbral en OMG por ingrediente, por lo tanto es preciso realizar simultáneamente una cuantificación del ADN MG y el de la especie vegetal de que procede, para poder hallar el valor relativo:

$$\%GM = 100 \times c \text{ ADN MG} / c \text{ ADN Endógeno} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Siendo:

c ADN MG = Concentración de ADN Manipulado Genéticamente.

c ADN Endógeno = Concentración de ADN Taxón específica.

3.- Los puntos de curvas de calibración pueden obtenerse de dos maneras para el OMG:

- Utilizando ADN de MRC de distintas concentraciones de OMG
- Mediante diluciones de ADN de MRC de una concentración elevada.

Sin embargo para la secuencia endógena, solo la segunda posibilidad está disponible, por lo que habitualmente es la empleada para ambas dianas. La presencia de inhibidores solubles junto al ADN afectaría en este caso de forma distinta a las muestras problema (sin diluir) que las muestras que se emplean en los puntos de la curva de calibración (diluidas).

1.1.4. Norma ISO/IEC 17025:2005. Requisitos generales relativos a la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración

El informe final de la auditoría efectuada en España del 21 al 30 de noviembre de 2011 con el fin de evaluar los controles oficiales de los organismos modificados genéticamente, realizada por la Oficina Veterinaria y

Alimentaria (FVO en sus siglas inglesas), un servicio de inspección y control de la Dirección General de Salud y Consumidores de la Comisión Europea (DG SANCO) señala (FVO, 2012):

En España veintinueve laboratorios afirmaron participar en las actividades de control oficial en relación con la presencia de OMG en alimentos, piensos y semillas. De los laboratorios que realizan análisis de muestras oficiales para la detección de OMG, cuatro para alimentos y tres para piensos no están acreditados. Además, tampoco está acreditado uno de los tres laboratorios que llevan a cabo análisis de muestras oficiales para la detección de OMG en semillas. Por lo tanto, en total existen ocho laboratorios para OMG no acreditados

La acreditación de un laboratorio para un procedimiento de ensayo conforme a la Norma EN ISO/IEC 17025 implica el cumplimiento de una serie de requisitos tanto de gestión como técnicos. El cumplimiento de estos requisitos ha de ser comprobado por la Entidad Española de Acreditación (ENAC) mediante su correspondiente auditoria.

El presente trabajo se centra en la parte técnica de la acreditación, concretamente en la verificación de los métodos analíticos (Sección 5.4.5 de la Norma) y la estimación de la incertidumbre de medida (Sección 5.4.6).

a) Verificación.

La verificación consiste en la confirmación por parte del laboratorio de su capacidad para aplicar métodos normalizados (UNE-EN ISO/IEC 17025, 2005). La definición exacta es (UNE-EN ISO 9000, 2005):

Validación: Confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos del método para una utilización o aplicación específica prevista.

Verificación: Confirmación mediante la aportación de pruebas objetivas de que se han cumplido los requisitos.

La validación de los métodos de ensayo de OMG se realiza mediante ensayos de aplicabilidad, robustez y una etapa posterior de ensayos intercomparativos organizados por el JRC en los que participan los laboratorios pertenecientes a la ENGL, en los que se comprueba que el método cumple con los requisitos establecidos en el documento “*Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing*” (ENGL, 2008).

Una vez validados, los métodos de análisis de OMG se publican en la web del JRC y periódicamente se recogen en el “*Compendium of Reference Methods for GMO Analysis*” (JRC, 2011). Parte de estos métodos están también recogidos en las Normas UNE-EN ISO 21569:2006, 21570:2008, 21.571:2005 y 24.276:2007 y en sus respectivas modificaciones del año 2013.

Igualmente los métodos publicados por los Laboratorios Nacionales de Referencia (LNR) se consideran suficientemente validados (ENAC, 2011). En el estado español, existen dos LNR para OGM, el Laboratorio Arbitral Agroalimentario (LAA) dependiente del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA) y el Centro Nacional de Alimentación (CNA) dependiente de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN).

Los parámetros a verificar en el caso del análisis de OMG mediante métodos de PCR validados, están publicados en los documentos:

- “*Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods*” (JRC, Trapman, & et al., 2011)

- “*European technical guidance document for the flexible scope accreditation of laboratories quantifying GMOs*” (JRC, Trapman, & et al., 2014)

Dichos parámetros (considerando que la especificidad y la robustez de los métodos han sido ya validadas y no es precisa su verificación) son:

- Extracción y purificación de ADN:

- Concentración.
- Ausencia de Inhibidores.
- Métodos cualitativos:
 - Estimación del Límite de Detección (LOD).
- Métodos cuantitativos:
 - Estimación del Límite de Cuantificación (LOQ).
 - Rango Dinámico, Coeficiente R² y Eficiencia de la Amplificación
 - Precisión: Desviación Estándar Relativa de la Repetibilidad (RSDr).
 - Veracidad: Sesgo.

La verificación se realiza a partir de MRC con distintas concentraciones conocidas, siguiendo un plan preestablecido.

b) Estimación de la incertidumbre de medida

Siguiendo los documentos “*Guidance Document on Measurement Uncertainty for GMO Testing Laboratories*” (JRC, Trapman, & et al., 2009) y “*European technical guidance document for the flexible scope accreditation of laboratories quantifying GMOs*” (JRC, Trapman, & et al., 2014), el cálculo de incertidumbre de medida se realiza mediante la estimación de la precisión intermedia por repetición de análisis independientemente, que representan la variación a largo plazo de los componentes de análisis en el laboratorio, por ejemplo, distintos operadores, las soluciones madre, nuevos lotes de reactivos críticos, la recalibración de equipos, etc

1.1.5. Plan de verificación e informe de verificación

a) Plan de Verificación

Se entiende como **Plan de Verificación**, a un documento (tipo protocolo) en el cual se definen previamente a la experiencia; las pruebas o parámetros de verificación necesarios y el diseño experimental a desarrollar en base a los requerimientos del método.

El “Plan de Verificación” deberá contener al menos (Instituto de Salud Pública, 2010):

- Alcance de la verificación:
 - Método.
 - Analito.
 - Matrices.
 - Requerimientos del método.
- Diseño experimental:
 - Muestra(s) a ser analizada(s).
 - Material(es) de referencia certificados
 - Parámetro(s) y pruebas a desarrollar
 - Numero de análisis requeridos para cada prueba y/o parámetro.
 - Criterios de aceptabilidad para cada parámetro.
 - Analista(s) responsable de realizar la(s) prueba(s) analítica(s).
- Materiales, insumos y equipos necesarios para desarrollar la validación.

- Responsable de la Validación, fecha o tiempo programado para realizar la validación y fecha de elaboración del plan. Cualquier modificación realizada al plan de validación, durante el proceso, debe quedar debidamente documentada.

b) Informe de Verificación

El responsable de la verificación, deberá realizar un informe en el cual presentará los resultados obtenidos y las conclusiones.

El informe debe contener la declaración de la aplicabilidad del método.

1.2. Nivel de resolución.

El Procedimiento a verificar incluye:

- La extracción y purificación de ADN a partir de muestras de semillas, alimentos, piensos y/o sus materias primas¹.
- La cuantificación y control de la pureza del ADN extraído mediante espectrofotometría Ultravioleta.
- La comprobación de la presencia de ADN procedente de Maíz (*Zea mays* L.) y Soja (*Glycine max* L.) y su amplificabilidad, mediante técnicas de PCR a tiempo real con sonda, utilizando como dianas los genes de la Alcohol deshidrogenasa (ADH) del maíz y de la Lectina de la soja.
- Un cribado para detectar o no la presencia de posibles manipulaciones genéticas, mediante técnicas de PCR a tiempo real con sonda, utilizando como dianas el Promotor P-35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y el terminador t-NOS de *Agrobacterium tumefaciens*, presentes en numerosas construcciones transgénicas.
- La detección del evento MON810 en las muestras de donde se detecte la presencia de ADN de maíz junto con el Promotor P-35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), mediante técnicas de PCR a tiempo real con sonda.
- La detección de la Construcción GTS-40-3-2 (soja Rondoup Ready) en las muestras de donde se detecte la presencia de ADN de soja junto con el Promotor P-35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y el terminador t-NOS de *Agrobacterium tumefaciens*, mediante técnicas de PCR a tiempo real con sonda.
- El descarte de falsos positivos de promotor P-35S y terminador t-NOS, en aquellos casos en que no se detecten eventos ni construcciones, mediante técnicas de PCR para la detección del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y/o de *Agrobacterium tumefaciens*.
- La cuantificación relativa del evento MON810, en las muestras de donde se haya detectado, mediante técnicas de PCR a tiempo real con sonda.
- La cuantificación relativa de la Construcción GTS-40-3-2, en las muestras de donde se haya detectado, mediante técnicas de PCR a tiempo real con sonda.

1.3. Justificación.

El Laboratorio de Calidad Agroalimentaria (LCA), situado en Villava, depende del departamento de Desarrollo Rural Medio Ambiente y Administración Local (DRMAyAL) y desde 1915 su misión es mejorar la cuenta de resultados de las explotaciones agrarias de Navarra mediante (www.navarra.es):

- La protección y promoción de la sanidad animal y la salud pública.
- La protección y promoción de la sanidad vegetal.

¹ En la fase actual, únicamente se procede a verificar las matrices descritas en el apartado 2 Objetivos.

- La mejora de los medios de producción en el sector primario.
- Promover y participar en proyectos de I+D en las áreas de sanidad animal, sanidad vegetal y protección de la salud pública.

Es un Laboratorio Oficial autorizado para el análisis de piensos y sus materias primas (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación) y viene realizando análisis de OMG desde el año 2007, siendo un Laboratorio asociado a la ENGL desde 2010 (ENGL, 2010, págs. 2, Annex, art.2).

Actualmente trabaja acreditado bajo la norma internacional ISO/IEC 17.025, si bien los ensayos de OMG no están dentro del alcance de la acreditación, existiendo la intención de acreditar dichos ensayos. Para ello, durante el presente año, se ha implementado un nuevo método de extracción de ADN, se han modificado los métodos de cribado, se ha actualizado el método de cuantificación del evento MON810 y se ha puesto en marcha el método de detección y cuantificación de la construcción GTS-40-3-2.

La verificación de los métodos analíticos y la estimación de la incertidumbre de medida, como pasos hacia la acreditación, requieren de tiempo y esfuerzo, siendo un trabajo práctico y de un nivel teórico y técnico elevado.

1.4. Requisitos a verificar según la documentación de referencia.

La verificación del desempeño del laboratorio en la detección y cuantificación de OMG debe realizarse siguiendo las especificaciones desarrolladas en los documentos desarrollados por el JRC.

A continuación se describen los requisitos a verificar en los distintos pasos del procedimiento:

1.4.1. Extracción y Purificación de Ácidos Nucleicos.

La extracción se realizará mínimo 2 veces (3 recomendado) con dos submuestras cada vez, en días distintos y con distintos operarios (JRC, Trapman, & et al., 2011). El procedimiento se verificará para cada matriz (JRC, Trapman, & et al., 2011). Deberán cumplirse los siguientes requerimientos (ENGL, 2008):

a) Concentración del ADN extraído: Debe obtenerse suficiente cantidad para los subsiguientes análisis, (150 ng, equivalentes a una concentración mínima de 20 ng/μl en maíz y 50 ng en soja, 10 ng/μl).

Se comprueba mediante espectrofotometría ultravioleta, midiendo la absorbancia a $\lambda=260$ nm (A260).

La concentración de ADN de doble cadena (ng/μl) en un extracto purificado situado una cubeta de 1 cm puede calcularse como:

$$\text{Concentración (ng/}\mu\text{l)} = 50 * A_{260} \text{ (OGT, 2011)} \quad \text{(Ecuación 2)}$$

La presencia de ARN en el extracto, así como el grado de desnaturalización del ADN extraído pueden conllevar a una sobrestimación de la concentración de ADN, afectando a los Límites Prácticos de Detección o de Cuantificación en las reacciones de PCR subsiguientes (MOENS, 2005). Por tanto debe incluirse un paso de eliminación de ARN y utilizar un tampón de extracción que asegure la estabilidad del ADN extraído.

b) Estado de fragmentación: el peso molecular del ADN extraído debe ser mayor que el del amplicón que se espera obtener en las PCR siguientes. En el caso de PCR a tiempo Real (q-PCR), con amplicones normalmente menores a 200 pares de bases, no es un criterio tan importante como en las PCR a tiempo final, con amplicones de peso molecular muy superior. Se han adoptado métodos a tiempo real con sonda para todos los ensayos, por lo que se considera que si el resto del proceso de verificación es satisfactorio, este paso puede ser omitido de la verificación.

c) Ausencia de Inhibidores: La presencia de compuestos co-extraídos puede inhibir la reacción de PCR. Un método preliminar de estimar la pureza de un extracto de ADN consiste en observar los ratios de absorción entre las longitudes de onda $\lambda=260$ nm (ácidos nucleicos), $\lambda=280$ nm (proteínas) y $\lambda=230$ nm (carbohidratos y compuestos empleados habitualmente en la extracción de ADN).

Ratios A260/A280 y A260/A230 menores de 1,8 y 2,0 respectivamente, pueden indicar la presencia de dichos compuestos. (Thermo Scientific, 2010).

Sin embargo, aun con bajos ratios A260/A280 A260/A230, los compuestos co-extraídos pueden no afectar a las reacciones de PCR, debiendo comprobar la eficiencia de la amplificación, calculada como:

$$E=100*(10^{(-1/b)}-1) \quad (\text{Ecuación 3})$$

Siendo b, la pendiente de la curva de regresión que se obtiene situando en ordenadas el ciclo umbral (Ct) frente al logaritmo en base 10 de la concentración, obteniendo los valores de la recta a partir de 4 diluciones seriadas del extracto de ADN a evaluar, con concentraciones 1:4, 1:16, 1:64 y 1:256.

Deben cumplirse las siguientes condiciones (JRC, Trapman, & et al., 2011)

- El coeficiente de ajuste de la recta de regresión (R^2) debe ser mayor de 0.98
- E debe situarse entre el 90 y el 110 %, correspondientes a valores de b entre -3,1 y -3,6 (100% equivale a $b=-3,32$).
- La diferencia entre el Ct calculado mediante la recta de regresión, y el Ct real (ΔCt) de una muestra sin diluir debe ser menor de 0,5 en números absolutos.

La diana de elección para la verificación de la calidad del ADN es el gen específico del taxón.

1.4.2. Métodos Cualitativos.

En los métodos de cribado y detección de eventos y/o construcciones, únicamente se debe verificar el siguiente parámetro:

a) Límite de detección (LOD): Mínima concentración del analito que puede ser detectada con fiabilidad (UNE-EN ISO 24276, 2007).

- Debe ser menor de 1/20 de la concentración diana, es decir menor del 0,045%, considerando el 0,9 % como umbral legal para el etiquetado (ENGL, 2008). Por motivos prácticos (MRC disponibles) se redondea el límite al 0,05 %.
- La fiabilidad del resultado debe ser del 95%, asegurando menos del 5 % de resultados falsos negativos (ENGL, 2008).

Su estimación se realiza con 10 replicados de PCR a baja concentración. El LOD es la menor concentración en la que todas las réplicas son positivas.

1.4.3. Métodos Cuantitativos.

Verificación del cumplimiento de los siguientes requisitos establecidos en los documentos de la European Network GMO Laboratories (ENGL), para los métodos de cuantificación del evento MON810 en maíz y de la construcción GTS-40-3-2 en soja.

Para fijar condiciones, las concentraciones mencionadas se entiende que son para un ADN 100% de la especie vegetal considerada.

a) Límite de Cuantificación (LOQ): Es la menor cantidad (o concentración) de un analito en una muestra que se puede cuantificar con un nivel conocido y aceptable de precisión y exactitud.

- Para los métodos de control de OMG al nivel del 0,9%, el valor mínimo ha de ser de 0,09% (1/10 del valor legal) y en este punto, el método debe repetir con una RSDr máxima del 25 % (ENGL, 2008).

Su estimación se realiza con 10 replicados de PCR a baja concentración. El LOQ es la concentración más baja de una serie en la que la RSD (desviación típica relativa o Coeficiente de Variación CV) de las

mediciones de la concentración se encuentra por debajo del 25% y el punto está cubierto por la curva estándar

Se pretende verificar que el método es eficaz para cuantificar una concentración del analito en harina de maíz desde el 0,05% en peso (0,5 g/kg) y en harina de soja desde el 0,1 % (1,0 g/kg).

b) Rango dinámico de trabajo: Es el campo de concentraciones para el que el método funciona de manera controlada: respuesta lineal, veracidad y precisión aceptables (ENGL, 2008).

- Para controlar eficazmente el valor legal del 0,9%, se considera aceptable un rango entre el 4,5% (5 veces el valor umbral) y el 0,09% (1/10 del el valor umbral).
- El coeficiente de ajuste de de la recta de regresión (R^2) debe ser mayor de 0,98
- La eficiencia de la amplificación debe situarse entre el 90 y el 110%, correspondientes a valores de b entre -3,1 y -3,6.

En la bibliografía (JRC, Trapman, & et al., 2011), se proponen varios ejemplos sobre cómo llevar a cabo la verificación. El sistema elegido consiste en realizar al menos cuatro rectas de calibrado con cinco puntos cada una, midiendo cada punto con dos replicas (JRC, Trapman, & et al., European technical guidance document for the flexible scope accreditation of laboratories quantifying GMOs, 2014).

El rango de trabajo que se pretende verificar está comprendido entre el 0,05 % y el 10 % en harina de maíz y en harina de soja desde el 0,1 % hasta el 10,0 %.

c) Veracidad: Es la proximidad entre el valor medio de una serie de medidas y el valor real o aceptado como de referencia (UNE-EN ISO 24276:2007/A1, 2013).

Su medida se expresa habitualmente en términos de sesgo (bias) (UNE-EN ISO 24276:2007/A1, 2013).

- La máxima desviación permitida de veracidad es el 25% del valor tomado como referencia en todo el rango dinámico (ENGL, 2008).

Este documento no contempla la incertidumbre del valor del MRC, que en el caso de la soja GTS 40-3-2 en el nivel del LOQ es del 50 %. En el punto 2 del apartado 1.4.4 se propone un método de evaluación del sesgo considerando dicha incertidumbre. En los casos de que la incertidumbre de la concentración del MRC sea superior al 25 %, se optará por este segundo sistema.

Entre los ejemplos que el JRC (JRC, Trapman, & et al., 2011) propone para su verificación se ha seleccionado el siguiente:

Al menos 2 niveles de OMG (uno alrededor de umbral de etiquetado y uno alrededor de LOQ, un tercero recomendado en la parte superior del rango dinámico) [...]

Ejemplo 2: Dos réplicas de extracción de ADN por nivel de OMG, dos réplicas de PCR por extracción y placa, realizando 4 placas resultan 16 resultados y 8 estimaciones de concentración de OMG por nivel.

De esta forma se puede verificar simultáneamente el rango dinámico y la veracidad.

d) Precisión en condiciones de repetibilidad: Condiciones idénticas de aplicación, método, técnico, equipo, porción de análisis.

Se mide como el Coeficiente de Variación en condiciones de repetibilidad (CV_r , también desviación típica relativa, RSD_r). Se calcula sobre réplicas de PCR o también a replicados de extracción sobre la misma muestra, extraídos al mismo tiempo y amplificados a la vez.

- El valor máximo aceptable de RSD_r en esta situación es del 25% si el resultado está dentro del rango de trabajo (ENGL, 2008).

Su verificación se realiza simultáneamente a la de la veracidad.

1.4.4. Estimación de la Incertidumbre de medida

La relación entre el resultado de ensayo (RE) y la incertidumbre (U) se presenta como $RE \pm U$. Cuando la reglamentación o el valor límite contractual es superior a $RE + U$ o inferior a $RE - U$, la conclusión es clara [...]. Si el valor límite se encuentra entre esos dos límites, no es posible llegar a una conclusión clara. (UNE-CEN GUÍA 13 IN, 2010)

Siguiendo los documentos “*Guidance Document on Measurement Uncertainty for GMO Testing Laboratories*” (JRC, Trapman, & et al., 2009), y “*European technical guidance document for the flexible scope accreditation of laboratorios quantifying GMOs*” (JRC, Trapman, & et al., 2014), el cálculo de incertidumbre de medida (MU) se realiza mediante la combinación de la estimación de la precisión intermedia (s_R) y el producto del resultado cuya incertidumbre queremos medir por la desviación estándar relativa (RSU).

La desviación estándar relativa se obtiene por combinación de la desviación estándar de la reproducibilidad relativa (RSD_R) y la incertidumbre asociada al sesgo (u_{bias})

Son precisos al menos 15 resultados duplicados en condiciones de reproducibilidad. Los pasos para su cálculo son los siguientes

a) Precisión en condiciones de reproducibilidad (desviación típica relativa, RSD_R): En condiciones de aplicación variables, diferentes laboratorios (validación inter-laboratorio) o el mismo laboratorio con análisis en diferentes días (validación intra-laboratorio), para un muestra (i), se obtienen dos resultados (c_{i1} y c_{i2}).

Para cada resultado i se estima el valor medio (\bar{c}_i) y las desviaciones absoluta (d_i) y relativa (rad_i) y aplicando

$$\bar{c}_i = (c_{i1} + c_{i2}) / 2 \quad \text{(Ecuación 4)}$$

$$d_i = |c_{i1} - c_{i2}| \quad \text{(Ecuación 5)}$$

$$rad_i = d_i / \bar{c}_i \quad \text{(Ecuación 6)}$$

A partir de la media de las desviaciones absolutas (d_i) de los seis resultados cuyo \bar{c}_i es menor se realiza el cálculo de la desviación estándar de la reproducibilidad absoluta (S_R).

$$\bar{d} = \sum_{i=1}^6 d_i / 6 \quad \text{(Ecuación 7)}$$

$$S_R = \bar{d} / d_2 \quad \text{(Ecuación 8)}$$

Siendo d_2 un valor tabulado que para el caso de dos réplicas es 1,128

Con la media de las desviaciones relativas (\overline{rad}) del resto de resultados se estima la desviación estándar de la reproducibilidad relativa (RSD_R)

$$\overline{rad} = \sum_{i=7}^n rad_i / (n-6) \quad \text{(Ecuación 9)}$$

$$RSD_R = \overline{rad} / d_2 \quad \text{(Ecuación 10)}$$

b) Sesgo: Se puede calcular el sesgo a partir de los resultados de la medición de Materiales de Referencia Certificados (MRC), por el siguiente método (ERM & Linsinger, 2005); (JRC, Trapman, & et al., 2009):

$$\Delta_m = |c_m - c_{MRC}| \quad \text{(Ecuación 11)}$$

Siendo:

Δ_m : diferencia absoluta entre la media del valor medido y el valor del certificado

c_m : Media de los valores medidos.

c_{MRC} : Valor certificado del MRC

Esta medición debe ir acompañada por su incertidumbre, (u_Δ), calculada como:

$$u_{\Delta} = (u_m^2 + u_{MRC}^2)^{1/2} \text{ (Ecuación 12)}$$

Siendo:

u_m : Incertidumbre de los valores medidos

u_{MRC} : Incertidumbre del valor certificado del MRC

Los valores de u_m se calculan con la siguiente ecuación:

$$u_m = s_r / \sqrt{n} \text{ (Ecuación 13)}$$

Siendo:

s_r : desviación estándar de la repetibilidad.

n : número de medidas independientes,

($n=6$ siguiendo el ejemplo del anexo III del doc. JRC 2009).

A continuación se calcula la incertidumbre expandida (U_{Δ}) para una cobertura del 95% ($k=2$):

$$U_{\Delta} = u_{\Delta} * 2 \text{ (Ecuación 14)}$$

Si $\Delta_m \leq U_{\Delta}$, entonces no existe diferencia significativa entre el valor medido y el certificado, y por tanto el método no tiene sesgo.

c) Incertidumbre asociada al sesgo (u_{bias})

$$u_{bias} = [(RSD_R^2 / n) + (100 * u_{MRC} / c_{MRC})^2]^{1/2} \text{ (Ecuación 15)}$$

d) Desviación estándar relativa (RSU)

$$RSU = [RSD_R^2 + u_{bias}^2]^{1/2} \text{ (Ecuación 16)}$$

e) Incertidumbre de medida

$$u = [u_0^2 + (c * RSU)^2]^{1/2} \text{ (Ecuación 17)}$$

Siendo:

$$u_0 = S_R$$

c = resultado del ensayo al cual se aplicará la incertidumbre u

f) Incertidumbre expandida

$$U = k * u \text{ (Ecuación 18)}$$

Siendo:

$k = 2$; para un nivel de confianza del 95 %

Durante la verificación del método se obtendrán los datos para el cálculo de los valores del sesgo y su incertidumbre asociada.

1.4.5. Gráficas de control de Shewhart

A partir de los resultados de la verificación en el nivel más próximo al límite legal de etiquetado y de la incertidumbre del material de referencia empleado, se calcularán los límites de aviso y de control (UNE 66.006.74, 1974)² mediante la fórmula $u_{\Delta} = (u_m^2 + u_{MRC}^2)^{1/2}$ (Ecuación 12), que combina la incertidumbre del material de referencia y la variabilidad de las mediciones.

$$\text{Límite de aviso} = 2 * u_{\Delta} \text{ (Ecuación 19)} \quad \text{Límite de control} = 3 * u_{\Delta} \text{ (Ecuación 20)}$$

² Próximamente se publicará la serie de Normas ISO 7870 que actualizarán la sistemática para el uso de gráficos de control, pero actualmente solo está publicada la Parte 1: "Directrices generales" de Junio de 2013.

2. Objetivos.

1.- Establecer una metodología de extracción y purificación de ADN y verificar que sea adecuada a las necesidades de los pasos siguientes y a la disponibilidad de personal y tiempo del Laboratorio de Calidad Agroalimentario, en las siguientes matrices:

- Granos de maíz y sus harinas.
- Habas de soja y sus harinas.

2.- Poner a punto y verificar una serie de métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección y cuantificación de determinados OMG, en extractos de ADN procedentes de alimentos, piensos y sus materias primas.

- Métodos cualitativos:

- Detección del Promotor P35S.
- Detección del Terminador T-NOS.
- Detección de la construcción GTS-40-3-2.
- Detección del evento MON810.

- Métodos cuantitativos:

- Cuantificación relativa de la construcción GTS-40-3-2.
- Cuantificación relativa del evento MON810.

3.- Estimar la incertidumbre de medida en los métodos cuantitativos.

4.- Establecer un control de calidad en base a gráficas de control.

3. Materiales y Métodos.

3.1. Diseño experimental.

3.1.1. Extracción y Purificación de Ácidos Nucleicos.

Para cada matriz se realizan 10 extracciones, en al menos tres días, por al menos dos operarios. En cada extracto se mide la concentración de ADN y los ratios A260/280 y A260/230.

En dos extractos de cada matriz y de cada jornada de extracción se comprueba la ausencia de inhibidores, empleando como diana el gen endógeno de la especie que se trate.

Se realiza sobre MRC o sus mezclas que se emplean en los pasos posteriores de la verificación.

Tabla 3: Parámetros y objetivos a verificar en la extracción y purificación de ADN.

Parámetro	Objetivo	Método	Muestras	Operarios/ jornadas	Otros
Concentración Kit Qiagen Soja	>10 ng/μl	Espectrofotometría UV	10 (ADN extraído de mezcla de harinas 0,5 % y 0 % en proporción 1:9)	3 / 3	Se comprobaran los ratios A260/A280 y A260/A230
Ausencia de inhibidores Kit Qiagen Soja	R2 > 0,98 -3.1 <b <-3.6 ΔCt < 0,5	q-PCR del gen Lectina, con factores de dilución 1, 4, 16, 64, 256	6 (ADN extraído de mezcla de harinas 0,5 % y 0 % en proporción 1:9)	3 / 3	Termociclador SmartCycler, Enzima Takara probe. Se realizarán réplicas de PCR
Concentración Kit Qiagen Maíz	>10 ng/μl	Espectrofotometría UV	10 (ADN extraído de mezcla de harinas 0,5 % y 0 % en proporción 1:9)	3 / 3	Se comprobaran los ratios A260/A280 y A260/A230
Ausencia de inhibidores Kit Qiagen Maíz	R2 > 0,98 -3.1 <b <-3.6 ΔCt < 0,5	q-PCR del gen ADH con factores de dilución 1, 4, 16, 64, 256	6 (ADN extraído de mezcla de harinas 0,5 % y 0 % en proporción 1:9)	3 / 3	Termociclador SmartCycler, Enzima Takara probe. Se realizarán réplicas de PCR

3.1.2. Métodos cualitativos (LOD)

Su estimación se realiza con 10 replicados de PCR a baja concentración. El LOD es la menor concentración en la que todas las réplicas son positivas.

Se pretende verificar que el método (incluyendo la extracción de ADN), es eficaz para detectar una concentración de los analitos desde el 0,05 % en peso (0,5 g/kg) de OMG.

Para ello en lugar de 10 réplicas de PCR, se analizarán 10 réplicas de extracción, realizadas en tres días por diferentes operadores, de MRC al nivel deseado de concentración. Los extractos se analizarán en diferentes días por al menos dos operadores, para las diferentes secuencias diana realizando duplicados de PCR para cada extracto (2 matrices x 10 Réplicas de extracción x 4 dianas x 2 réplicas de PCR = 160 resultados)

Tabla 4: Parámetros y objetivos a verificar en los métodos cualitativos.

Parámetro	Objetivo	Método	Muestras	Operarios/ jornadas	Otros
LOD P35S en Maíz	$\leq 0,05\%$	q-PCR del P35S	10 (ADN extraído de mezcla de harinas 0,5 % y 0 % en proporción 1:9)	2 / 3	Termociclador SmartCycler, Enzima Takara probe. Se realizarán réplicas de PCR
LOD MON810 en Maíz	$\leq 0,05\%$	q-PCR del evento	10 (ADN extraído de mezcla de harinas 0,5 % y 0 % en proporción 1:9)	2 / 3	Termociclador SmartCycler, Enzima Takara probe. Se realizarán réplicas de PCR
LOD P35S en soja	$\leq 0,05\%$	q-PCR P35S	10 (ADN extraído de mezcla de harinas 0,5 % y 0 % en proporción 1:9)	2 / 3	Termociclador SmartCycler, Enzima Takara probe. Se realizarán réplicas de PCR
LOD t-NOS en soja	$\leq 0,05\%$	q-PCR t-NOS	10 (ADN extraído de mezcla de harinas 0,5 % y 0 % en proporción 1:9)	2 / 3	Termociclador SmartCycler, Enzima Takara probe. Se realizarán réplicas de PCR
LOD GTS-40-3-2 en soja	$\leq 0,05\%$	q-PCR de la construcción	10 (ADN extraído de mezcla de harinas 0,5 % y 0 % en proporción 1:9)	2 / 3	Termociclador SmartCycler, Enzima Takara probe. Se realizarán réplicas de PCR

3.1.3. Cuantificación de eventos y/o construcciones.

a) Rango dinámico, Precisión y Veracidad

Se verifican simultáneamente, según el esquema siguiente:

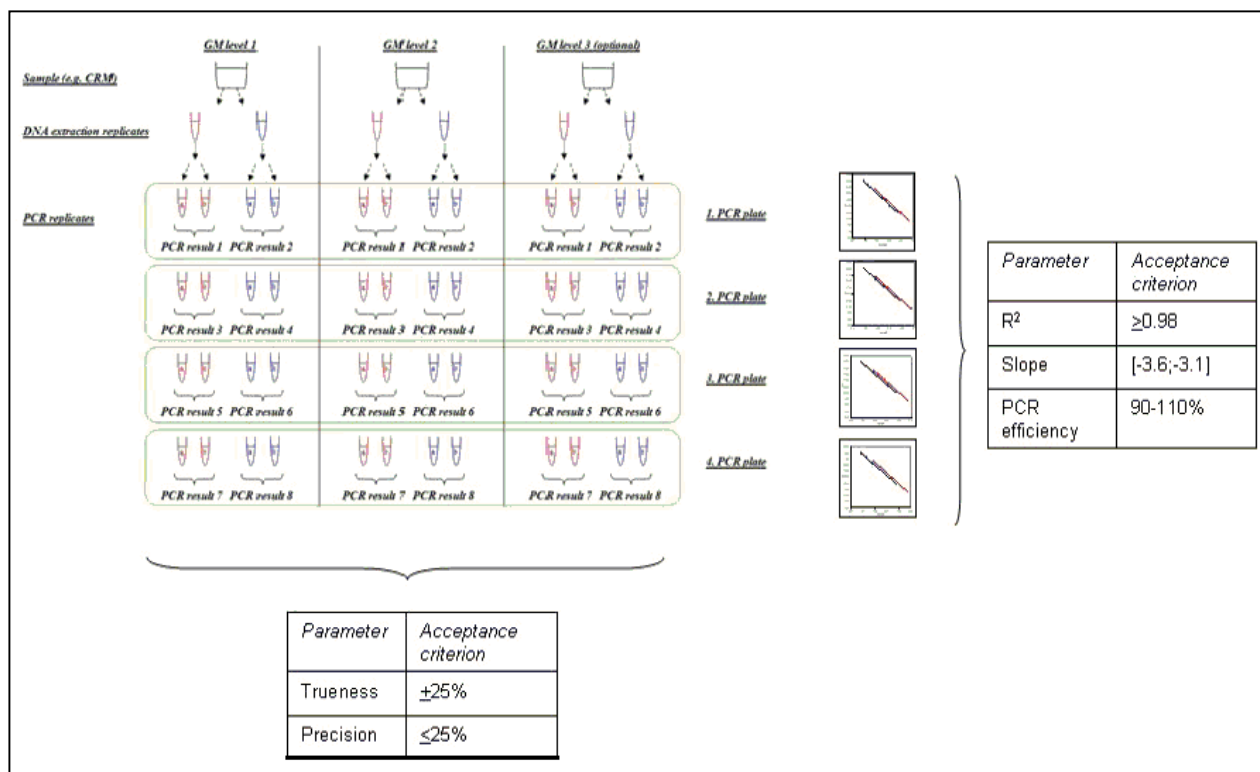


Figura 4: Resumen del diseño experimental para la verificación simultánea de Rango dinámico, precisión y exactitud, (Papazova, Roosens, & Taverniers, 2013)

Tabla 5: Parámetros y objetivos a verificar en los métodos cuantitativos (Rango dinámico, Precisión y Veracidad).

Parámetro	Objetivo	Método	Muestras	Operarios/ Jornadas/placas	Otros
R ² MON810 en Maíz	≥0.98	q-PCR del Evento y el endógeno en la misma placa	4 rectas de regresión para el gen endógeno y otras 4 para el transgén	1/ 2/ 4	Termociclador StepOne, Enzima TaqMan. Se realizarán réplicas de PCR
R ² GTS-40-3-2 en soja	≥0.98	q-PCR del Evento y el endógeno en la misma placa	4 rectas de regresión para el gen endógeno y otras 4 para el transgén	1/ 2/ 4	Termociclador StepOne, Enzima TaqMan. Se realizarán réplicas de PCR
E MON810 en Maíz	90≤E≤110 %	q-PCR del Evento y el endógeno en la misma placa	4 rectas de regresión para el gen endógeno y otras 4 para el transgén	1/ 2/ 4	Termociclador StepOne, Enzima TaqMan. Se realizarán réplicas de PCR
E GTS-40-3-2 en soja	90≤E≤110 %	q-PCR del Evento y el endógeno en la misma placa	4 rectas de regresión para el gen endógeno y otras 4 para el transgén	1/ 2/ 4	Termociclador StepOne, Enzima TaqMan. Se realizarán réplicas de PCR
b MON810 en Maíz	-3.6≤E≤-3.1	q-PCR del Evento y el endógeno en la misma placa	4 rectas de regresión para el gen endógeno y otras 4 para el transgén	1/ 2/ 4	Termociclador StepOne, Enzima TaqMan. Se realizarán réplicas de PCR
b GTS-40-3-2 en soja	-3.6≤E≤-3.1	q-PCR del Evento y el endógeno en la misma placa	4 rectas de regresión para el gen endógeno y otras 4 para el transgén	1/ 2/ 4	Termociclador StepOne, Enzima TaqMan. Se realizarán réplicas de PCR
Precisión MON810 en Maíz	RSDr ≤25 % ≤50% (en el LOQ)	q-PCR del Evento y el endógeno en la misma placa	6 (2 en el LOQ, 2 en límite legal, 2 en el límite superior del rango)	1/ 2/ 4	Termociclador StepOne, Enzima TaqMan. Se realizarán réplicas de PCR
Precisión GTS-40-3-2 en soja	RSDr ≤25 % ≤50% (en el LOQ)	q-PCR del Evento y el endógeno en la misma placa	6 (2 en el LOQ, 2 en límite legal, 2 en el límite superior del rango)	1/ 2/ 4	Termociclador StepOne, Enzima TaqMan. Se realizarán réplicas de PCR
Veracidad MON810 en Maíz	$\Delta_m \leq U_\Delta$ o desviación ≤ 25%	q-PCR del Evento y el endógeno en la misma placa	6 (2 en el LOQ, 2 en límite legal, 2 en el límite superior del rango)	1/ 2/ 4	Termociclador StepOne, Enzima TaqMan. Se realizarán réplicas de PCR
Veracidad GTS-40-3-2 en soja	$\Delta_m \leq U_\Delta$ o desviación ≤25%	q-PCR del Evento y el endógeno en la misma placa	6 (2 en el LOQ, 2 en límite legal, 2 en el límite superior del rango)	1/ 2/ 4	Termociclador StepOne, Enzima TaqMan. Se realizarán réplicas de PCR

b) LOQ

Su estimación se realiza con 10 replicados de PCR a baja concentración. El LOQ es la menor concentración en la que todas las réplicas son positivas.

En la verificación del rango dinámico, precisión y exactitud, ya se realizan 8 réplicas de PCR en 2 réplicas de extracción en el punto de concentración más baja del rango.

Tabla 6: Parámetros y objetivos a verificar en los métodos cuantitativos (LOQ).

Parámetro	Objetivo	Método	Muestras	Operarios/ jornadas	Otros
LOQ MON810 en Maíz	0,05 %	q-PCR	2	1 / 2 / 4	Termociclador StepOne, Enzima TaqMan. Se realizarán réplicas de PCR
LOQ GTS-40-3-2 en soja	0,1 %	q-PCR	2	1 / 2 / 4	Termociclador StepOne, Enzima TaqMan. Se realizarán réplicas de PCR

3.1.4. Estimación de la Incertidumbre de medida

A partir de los datos de la verificación se iniciará el cálculo de la incertidumbre de medida, concretamente los siguientes parámetros:

a) Precisión en condiciones de reproducibilidad

Los datos obtenidos de la verificación servirán como los datos iniciales de los 15 datos precisos en el cálculo de RSD_R .

Para su cálculo, se cotejarán las diferencias entre los datos de concentración calculada entre los dos replicados de extracción (c_{1j} y c_{2j}) y la media de cada una de las dos jornadas que dura cada ensayo (c_{e1} y c_{e2}). Así para cada uno de los tres niveles de MRC ensayados, obtenemos los siguientes datos:

$$c_{11} - c_{22}$$

$$c_{21} - c_{12}$$

$$c_{11} - c_{12}$$

$$c_{21} - c_{22}$$

Posteriormente se obtendrán el resto de los valores a partir de las muestras de rutina que estén en el rango dinámico (la mayor parte de las muestras de rutina están fuera del rango, ya sea por tratarse de materiales MG puros o por tratarse de contaminaciones accidentales muy débiles).

b) Sesgo

Se empleará para el cálculo de la incertidumbre de medida, la estimación del sesgo del nivel el más próximo al límite legal del 0,9%, siempre que exista una estimación fiable del mismo (MRC original del nivel apropiado).

3.2. Materiales.

3.2.1. Materiales de Referencia

En la verificación de los métodos de ensayo se emplearán preferentemente Materiales de referencia certificados y en el caso de no existir a los niveles necesarios, se emplearán mezclas de MRC, bien en forma de polvo o de sus extractos de ADN.

a) MRC

Se emplearán MRC en los casos en que estén disponibles a las concentraciones necesarias, concretamente los siguientes:

Tabla 7: Valores certificados del MRC MON810 ERM-BF413k.

	Valor certificado (g/kg)	Incertidumbre (g/kg)	Cód. LCA
ERM-BF413ak	< 0,9	-*	BV-RFC-034
ERM-BF413ck	4,9	1,0**	BV-RFC-035
ERM-BF413ek	19,8	1,5**	BV-RFC-036
ERM-BF413gk	99	5**	BV-RFC-033

Tabla 8: Valores certificados del MRC Soja GTS-40-3-2, ERM-BF410.

	Valor certificado (g/kg)	Incertidumbre (g/kg)	Cód. LCA
ERM-BF410a	< 0,3	-*	
ERM-BF410c	5,0	1,0**	

Tabla 9: Valores certificados del MRC Soja GTS-40-3-2, ERM-BF410k.

	Valor certificado (g/kg)	Incertidumbre (g/kg)	Cód. LCA
ERM-BF410bk	1,0	0,5**	BV-RFC-037
ERM-BF410dk	10,0	1,0**	BV-RFC-038
ERM-BF410fk	100,0	7**	BV-RFC-043

Tabla 10: Valores certificados del MRC Maíz Bt11, ERM-BF412.

	Valor certificado (g/kg)	Incertidumbre (g/kg)	Cód. LCA
ERM-BF412a	< 0,12	-*	

(* Con un 95% de probabilidad; ** Incertidumbre expandida con $k = 2$)

En el resto de casos se prepararán Materiales de Referencia Internos (MRI) a partir los MRC siguiendo los procedimientos descritos por el JRC (European technical guidance document for the flexible scope accreditation of laboratories quantifying GMOs, 2014).

Los Extractos a utilizar como controles serán los siguientes:

ADN 0,05 % Soja RR (BV-RVP-771) extraído a partir del BV-RFIP-002

ADN 0,1 % Soja RR (BV-RVP-721) extraído a partir del BV-RFC-038

ADN 1,0 % Soja RR (BV-RVP-723) extraído a partir del BV-RFC-040

ADN 10,0 % Soja RR (BV-RVP-725) extraído a partir del BV-RFC-043

ADN <0,09 % Maíz Mon810 (BV-RVP-738) extraído a partir del BV-RFC-034

ADN 0,05 % Maíz Mon810 (BV-RVP-772) extraído a partir del BV-RFIP-003

ADN 0,49 % Maíz Mon810 (BV-RVP-739) extraído a partir del BV-RFC-035

ADN 1,00 % Maíz Mon810 (BV-RFIP-004) mezcla de BV-RVP-738 y BV-RVP-740

ADN 1,98 % Maíz Mon810 (BV-RVP-740) extraído a partir del BV-RFC-036

ADN 9,90 % Maíz Mon810 (BV-RVP-741) extraído a partir del BV-RFC-033

ADN <0,12 % Maíz Bt11 (BV-RVP-738) extraído a partir del BV-RFC-034

b) Mezcla de harinas

El problema de la inexistencia de Material de Referencia Certificado (MRC) de la concentración del LOD, se resuelve mediante la mezcla de harinas, (ya que se pretende verificar el procedimiento incluyendo la extracción y purificación de ADN). La mezcla se realiza con MRC de nivel 0 (Blank = NMG) y nivel 2 (aprox. 5 g/kg de OMG = MG).

Según el procedimiento descrito en el documento “*European technical guidance document for the flexible scope accreditation of laboratories quantifying GMOs*” (JRC, Trapman, & et al., 2014), la fracción en masa de la mezcla resultante (W_{MG}) en g/kg será:

$$W_{MG} = 1000 \times (m_{MG} \times p_{MG} + m_{NMG} \times ip_{NMG}) / (m_{MG} + m_{NMG}) \text{ (Ecuación 21)}$$

Siendo:

m_{MG} = masa de polvo GM (g)

p_{MG} = pureza del polvo GM (fracción)

m_{NMG} = masa de polvo No GM (g)

ip_{NMG} = pureza del polvo No GM (fracción)

La incertidumbre del contenido en OMG de la mezcla, se calcula a partir de la incertidumbre de las pesadas (u_{mMG} y u_{mNMG}), estimada a partir de los datos de la calibración de la balanza y la incertidumbre del contenido del MRC (u_{pMG} y u_{ipNMG}), estimada a partir valor de incertidumbre del certificado (U_{pMG} y U_{ipNMG}) y de su coeficiente de cobertura [habitualmente $k = 2$, el factor del 1,96 se emplea para transformar el 95 % de probabilidad (1,96 s) en desviación estándar (1 s)],

$$u_{pMG} = U_{pMG} / k \text{ (Ecuación 22)}$$

P.ej, para obtener un MR del 0,05 % a partir de MRC de MON810, ERM-BF413ak y ERM-BF413ck (ver Tabla 7: Valores certificados del MRC MON810 ERM-BF413k), el valor de la incertidumbre de la pureza para el ERM-BF413ck (4,9 g/kg) es sencillo de calcular:

$$p_{MG} \pm u_{pMG} = [4,9 \pm (1,0/2)] \text{ (g/kg)} / 1000 \text{ (g/kg)} = 0,0049 \pm 0,0005$$

En cambio para el ERM- BF413ak (<0,9 g/kg), únicamente encontramos el valor certificado, sin embargo en el informe de certificación del ERM-BF413k (ERM, Broothaerts, & et al., 2009) leemos:

Como no se encontró ninguna evidencia de una contaminación en el polvo no modificado genéticamente, se utilizó una pureza del 100% para el cálculo de la fracción de masa GM certificada de las mezclas de polvo de semillas. [...]

[...] Para el material blanco, el límite de detección del método se utiliza para describir el intervalo de confianza del 95% sobre el valor de la fracción de masa GM certificada (<0,9 g / kg). Esto está apoyado por la alta pureza del material (no-GM) y la ausencia de cualquier etapa de mezcla; el cálculo de la u_{MRC} para el material blanco en base a la única incertidumbre estándar cuantificable ($u_{char, 3}$) dio lugar a un valor de 0,3 g/kg, que es inferior a <0,9 g/kg, valor certificado. El LOD es, por lo tanto, ya una estimación conservadora del valor certificado y no se asigna ninguna incertidumbre.

Nota: $u_{char, 3}$ es la incertidumbre de la determinación de la pureza del material no-GM.

En el informe correspondiente al MRC ERM-BF410k $u_{char, 3} = 0,2021$, por consiguiente:

Verificación de un procedimiento de ensayo para la detección y cuantificación de Organismos Manipulados Genéticamente.

$$ip_{NMG} \pm u_{ip_{NMG}} (MON810) = [0,0 \pm 0,3] (g/kg) / 1000 (g/kg) = 0,0000 \pm 0,0003$$

$$ip_{NMG} \pm u_{ip_{NMG}} (GTS-40-3-2) = [0,0 \pm 0,2021] (g/kg) / 1000 (g/kg) = 0,0000 \pm 0,0002021$$

A partir de los datos de las pesadas y la incertidumbre de la balanza, ($u_m = 0,00004$ g, para ambos pesos, datos de calibración interna), se estiman, $m_{MG} \pm u_{m_{MG}}$ y $m_{NMG} \pm u_{m_{NMG}}$

La incertidumbre combinada de la concentración en masa de la mezcla de harinas se calcula según el siguiente procedimiento (JRC, Trapman, & et al., 2014):

1.-La fórmula $W_{MG} = 1000 \times (m_{MG} \times p_{MG} + m_{NMG} \times ip_{NMG}) / (m_{MG} + m_{NMG})$ (Ecuación 21) se resuelve cuatro veces, reemplazando cada vez, una de la cuatro variables por la variable sumada a su incertidumbre asociada ($m_{MG} + u_{m_{MG}}$; $p_{MG} + u_{p_{MG}}$; $m_{NMG} + u_{m_{NMG}}$; $ip_{NMG} + u_{ip_{NMG}}$)

2.-A cada uno de los cuatro resultados, se les sustrae el valor de W_{MG} (0,049 g/kg). Cada resultado obtenido corresponde con la contribución individual de cada variable a la incertidumbre del MR:

$$1) u (W_{MG};m_{MG}) = |W_{MG} (m_{MG} + u_{m_{MG}}) - W_{MG}| \quad (\text{Ecuación 23})$$

$$2) u (W_{MG};p_{MG}) = |W_{MG} (p_{MG} + u_{p_{MG}}) - W_{MG}| \quad (\text{Ecuación 24})$$

$$3) u (W_{MG};m_{NMG}) = |W_{MG} (m_{NMG} + u_{m_{NMG}}) - W_{MG}| \quad (\text{Ecuación 25})$$

$$4) u (W_{MG};ip_{NMG}) = |W_{MG} (ip_{NMG} + u_{ip_{NMG}}) - W_{MG}| \quad (\text{Ecuación 26})$$

La incertidumbre combinada de estos cuatro factores se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$u = (u^2(W_{MG};m_{MG}) + u^2(W_{MG};p_{MG}) + u^2(W_{MG};m_{NMG}) + u^2(W_{MG};ip_{NMG}))^{1/2} \quad (\text{Ecuación 27})$$

Siendo:

u = Incertidumbre estándar combinada

Y según lo expuesto anteriormente, $U = k * u$ (Ecuación 18)

Los valores estimados de incertidumbre en los casos que nos ocupan son los siguientes:

Tabla 11: Incertidumbre estimada para la mezcla de harinas de soja GTS-40-3-2 ERM-BF-410 a y 410b (BV-RFIP-002).

Datos de partida

	m (g)	p (g/g)	u _m (g)	U _p (g/g)	k	u _p (g/g)	m+u _M (g)	p+u _p (g/g)
MG	0,1022	0,005	0,00004	0,001	2	0,0005	0,10224	0,0055
NMG	0,9010	0	0,00004	0,0002021	1	0,0002021	0,90104	0

Cálculos

W_{MG0} (g/kg)	0,509370	$W_{MGn} - W_{MG0}$	$(W_{MGn} - W_{MG0})^2$
$W_{MG 1}$ (g/kg)	0,560307	0,050937	0,0025945781
$W_{MG 2}$ (g/kg)	0,509549	0,000179	0,0000000321
$W_{MG 3}$ (g/kg)	0,509350	-0,000020	0,0000000004
$W_{MG 4}$ (g/kg)	0,690881	0,181511	0,0329463389
		Σ	0,0355409495
		u (g/kg) = $(\Sigma)^{1/2}$	0,1885230743
		U (g/kg) = $2 \times u$	0,3770461486

Tabla 12: Incertidumbre estimada para la mezcla de harinas de Maíz MON810 ERM-BF-413ak a y 413bk (BV-RFIP-003).

Datos de partida

	m (g)	p (g/g)	u_M (g)	U_p (g/g)	k	u_p (g/g)	m+u_M (g)	p+u_p (g/g)
MG	0,1003	0,0049	0,00004	0,001	2	0,0005	0,10034	0,0054
NMG	0,8996	0	0,00004	0,0003	1	0,0003	0,89964	0

Cálculos

W_{MG0} (g/kg)	0,49151915	W_{MGn}-W_{MG0}	(W_{MGn}-W_{MG0})²
W_{MG 1} (g/kg)	0,54167417	0,05015502	0,0025155256
W_{MG 2} (g/kg)	0,4916955	0,00017635	0,0000000311
W_{MG 3} (g/kg)	0,49149949	-0,000020	0,0000000004
W_{MG 4} (g/kg)	0,76142614	0,26990699	0,0728497836
		Σ	0,0753653407
		u (g/kg)= (Σ)^{1/2}	0,2745274862
		U (g/kg) = 2 x u	0,5490549725

c) Mezcla de ADN.

La inexistencia de MRC MON810 de concentración similar al límite legal se soluciona mediante la mezcla de ADN extraídos a partir de MRC del 0% y del 1,98 %.

El procedimiento consiste en mezclar volúmenes en la siguiente proporción (JRC, Trapman, & et al., 2014):

$$X = (A/B) * (Y-1) + 1 \quad \text{(Ecuación 28)}$$

Siendo:

X = Factor de dilución práctico

A = Número de copias del gen endógeno en el extracto de ADN MG

B = Número de copias del gen endógeno en el extracto de ADN No MG

Y = Factor de dilución teórico, en nuestro caso Y= 1,98

A y B se obtienen de una cuantificación del gen endógeno, realizada por PCR, con cinco réplicas de cada muestra, obteniendo la incertidumbre de esta medición por la fórmula:

$$u_{cADH} = s_{cADH} / \sqrt{n} \quad \text{(Ecuación 29)}$$

Siendo:

u_{cADH} = Incertidumbre de la concentración de ADH

s_{cADH} = Desviación estándar de la medición de la concentración de ADH

n = Número de repeticiones, en nuestro caso n = 5

Tabla 13: Cálculo de los volúmenes de extractos para conseguir mezclas equivalentes a un 1 % de MON810.

ADN 1	Contenido OGM (%)	Ct endog.	Media Ct En	log conc. endog	Copias Endógeno	ADN 2	Cont OGM ADN 2	Cont OGM buscado	Factor de dilución Teórico	Factor de dilución real	Vol. mezcla (µl)	Vol.* ADN 1	Vol.* ADN 2
14/0658	0,00	25,95	26,03	4,48	30165,34			1,00			100		
		26,05							100				
		26,18				14/0551	1,98	1,00		100			
		25,97				14/0660	1,98	1,00		100			
		25,99				14/0661	1,98	1,00		100			
14/0659	0,00	26,01	26,02	4,48	30232,35			1,00			100		
		26,03							100				
		26,06				14/0551	1,98	1,00		100			
		26,05				14/0660	1,98	1,00		100			
		25,97				14/0661	1,98	1,00		100			
14/0793	0,00	25,95	25,96	4,50	31605,94			1,00			100		
		25,99							100				
		25,98				14/0551	1,98	1,00		100			
		25,94				14/0660	1,98	1,00		100			
		25,96				14/0661	1,98	1,00		100			
14/0551	1,98	26,02	26,09	4,46	28872,25	14/0658	0,00	1,00	1,98	1,94	100	51,6	48,4
		26,09				14/0659	0,00	1,00	1,98	1,94	100	51,7	48,3
		26,18				14/0793	0,00	1,00	1,98	1,90	100	52,8	47,2
		26,09						1,00			100		
		26,06						1,00			100		
14/0660	1,98	25,98	26,00	4,49	30746,50	14/0658	0,00	1,00	1,98	2,00	100	50	50
		26,02				14/0659	0,00	1,00	1,98	2,00	100	50,1	49,9
		25,95				14/0793	0,00	1,00	1,98	1,95	100	51,2	48,8
		25,98						1,00			100		
		26,07						1,00			100		
14/0661	1,98	26,06	26,03	4,48	30215,38	14/0658	0,00	1,00	1,98	1,98	100	50,5	49,5
		26,03				14/0659	0,00	1,00	1,98	1,98	100	50,5	49,5
		26,05				14/0793	0,00	1,00	1,98	1,94	100	51,6	48,4
		26,04						1,00			100		
		25,94						1,00			100		

* Resaltadas en negrita las mezclas a realizar.

Desarrollando la fórmula para calcular la concentración de la mezcla de ADN es la siguiente:

$$C_{MG\text{ mezcla}} = (C_{MG} * V_{MG} * c_{ADH\ MG} + C_{NMG} * V_{NMG} * c_{ADH\ NMG}) / (V_{MG} * c_{ADH\ MG} + V_{NMG} * c_{ADH\ NMG})$$

(Ecuación 30)

Siendo:

$$C_{MG\text{ mezcla}} = \text{Concentración equivalente de MG en la mezcla de ADN}$$

Verificación de un procedimiento de ensayo para la detección y cuantificación de Organismos Manipulados Genéticamente.

c_{MG} = Concentración equivalente de MG en el ADN MG

c_{NMG} = Concentración equivalente de MG en el ADN no MG (en principio = 0)

V_{MG} = Volumen empleado del ADN MG

V_{NMG} = Volumen empleado del ADN no MG

$c_{ADH\ MG}$ = Concentración de ADH en el ADN MG

$c_{ADH\ NMG}$ = Concentración de ADH en el ADN no MG

Para el cálculo de la incertidumbre del contenido de MG en harina al que equivale la mezcla de ADN, se ha empleado el mismo método que en la mezcla de harinas, estimando el valor en cada caso individual, en función de la incertidumbre en el pipeteo (obtenida de la calibración de la pipeta), la incertidumbre del MRC (Tabla 7) y la incertidumbre en la medida de la concentración de ADH $u_{c_{ADH}} = s_{c_{ADH}} / \sqrt{n}$ (Ecuación 29).

Reemplazando en la fórmula de cálculo de la concentración (Ecuación 30) el valor original por la suma del valor más su incertidumbre, para un solo parámetro cada vez y repitiendo la operación con los seis parámetros, obtenemos seis valores de concentración de MG equivalente, que sustraídos del valor real nos dan la aportación de la incertidumbre de cada parámetro a la incertidumbre del resultado. La incertidumbre total se calcula como la raíz cuadrada de la suma de los cuadrados de cada componente:

$$u_{c_{MG\ mezcla}} = [(u_{c_{MG}})^2 + (u_{c_{NMG}})^2 + (u_{V_{MG}})^2 + (u_{V_{NMG}})^2 + (u_{c_{ADH\ MG}})^2 + (u_{c_{ADH\ NMG}})^2]^{1/2} \quad \text{(Ecuación 31)}$$

Tabla 14: Datos de partida para el cálculo de la incertidumbre del contenido equivalente de MG de las mezclas de ADN a un 1 % de MON810

Cód. Mezcla	ADN1 (ver Tabla 13)	ADN2 (ver Tabla 13)	c_{MG1} (g/g)	c_{MG2} (g/g)	c_{MG} teórico (g/g)	c_{MG} real (g/g)
RFIP-004-001	14/0551	14/0658	0,0198	0	0,0102	0,0100
RFIP-004-002	14/0660	14/0659	0,0198	0	0,0099	0,0100
RFIP-004-003	14/0661	14/0793	0,0198	0	0,0102	0,0100

Cód. Mezcla	n	c_{ADH1} (copias)	c_{ADH2} (copias)	$s_{c_{ADH1}}$ (copias)	$s_{c_{ADH2}}$ (copias)	$u_{c_{ADH1}}$ (copias)	$u_{c_{ADH2}}$ (copias)
RFIP-004-001	5	28872	30165	1202	1995, 6	537	892
RFIP-004-002	5	30747	30232	1026	840	459	376
RFIP-004-003	5	30215	31606	1134	512	507	229

Cód. Mezcla	u_{MRC1} (g/g)	u_{MRC2} (g/g)	k1	k2	u_{MG1} (g/g)	u_{MG2} (g/g)
RFIP-004-001	0,0015	0,0003	2	1	0,00075	0,0003
RFIP-004-002	0,0015	0,0003	2	1	0,00075	0,0003
RFIP-004-003	0,0015	0,0003	2	1	0,00075	0,0003

Cód. Mezcla	V1 (µl)	V2 (µl)	u_V (%)	u_{V1} (µl)	u_{V2} (µl)
RFIP-004-001	51,6	48,4	0,0042	0,21672	0,20328
RFIP-004-002	50,1	49,9	0,0042	0,21042	0,20958
RFIP-004-003	51,6	48,4	0,0042	0,21672	0,20328

Tabla 15: Cálculos de la incertidumbre de la concentración MG equivalente en mezclas de ADN al 1 % de MON810

Cód. Mezcla	CMG1 + uMG1 (g/g)	CMG2 + uMG2 (g/g)	CADH1 + u _c ADH1 (copias)	CADH2 + u _c ADH2 (copias)	V1 + u _{v1} (µl)	V2 + u _{v2} (µl)
RFIP-004-001	0,02055	0,0003	29410	31058	51,81672	48,60328
RFIP-004-002	0,02055	0,0003	31205	30608	50,31042	50,10958
RFIP-004-003	0,02055	0,0003	30723	31835	51,81672	48,60328

Cód. Mezcla	c _{MG} (g/g) (CMG1 + uMG1)	c _{MG} (g/g) (CMG2 + uMG2)	c _{MG} (g/g) (CADH1 + u _c ADH1)	c _{MG} (g/g) (CADH2 + u _c ADH2)	c _{MG} (g/g) (V1 + u _{v1})	c _{MG} (g/g) (V2 + u _{v2})
RFIP-004-001	0,010378822	0,010148517	0,010091315	0,010360863	0,010020776	0,0097039
RFIP-004-002	0,010382183	0,010151706	0,010076576	0,009980917	0,010024015	0,010004217
RFIP-004-003	0,010372753	0,010142758	0,010076579	0,010252484	0,010014929	0,009698054

Cód. Mezcla	c _{MG real} - c _{MG} (CMG1 + uMG1) (g/g)	c _{MG real} - c _{MG} (CMG2 + uMG2) (g/g)	c _{MG real} - c _{MG} (CADH1 + u _c ADH1) (g/g)	c _{MG real} - c _{MG} (CADH2 + u _c ADH2) (g/g)	c _{MG real} - c _{MG} (V1 + u _{v1}) (g/g)	c _{MG real} - c _{MG} (V2 + u _{v2}) (g/g)
RFIP-004-001	3,7879E-04	1,4848E-04	9,1282E-05	3,6083E-04	2,0744E-05	2,9613E-04
RFIP-004-002	3,7891E-04	1,4844E-04	7,3305E-05	2,2354E-05	2,0744E-05	9,4633E-07
RFIP-004-003	3,7857E-04	1,4857E-04	8,2394E-05	2,5830E-04	2,0744E-05	2,9613E-04

Tabla 16: Incertidumbre de la concentración equivalente de las mezclas de ADN MON810 al 1 %

Cód. Mezcla	u (g/g)	u (%)	U (k = 2) (g/g)	U (k = 2) (%)
RFIP-004-001	0,000626246	0,0626246	0,0013	0,13
RFIP-004-002	0,000414622	0,0414622	0,0008	0,08
RFIP-004-003	0,000571855	0,0571855	0,0011	0,11

Se considera el valor más desfavorable (U = 0,13 %, k=2).

3.2.2. Aparatos, Equipos y Materiales

Todos los equipos que lo requieran deberán tener su calibración y/o verificación vigente. Estos registros estarán en la aplicación LIMs del laboratorio.

a) Equipos generales

Cámara frigorífica (5 ± 3°C).

Congelador <-20°C

Autoclave.

Puntas desechables estériles con filtro para pipetas (B-CN-057).

Puntas desechables biesterilizadas para pipetas (B-CN-028, B-CN-43).

Guantes nitrilo (B-CN-052).

Papel de filtro para cubrir la mesa.

Recipientes para los residuos sólidos (cubo con bolsa de plástico verde, cajas de puntas vacías).

Recipiente para los residuos líquidos (botella de plástico).

Verificación de un procedimiento de ensayo para la detección y cuantificación de Organismos Manipulados Genéticamente.

Viales Eppendorf de 1,5 ml biesterilizados (B-CN-012).

Viales Eppendorf de 2 ml biesterilizados (B-CN-011).

Viales Eppendorf de 0,5 ml biesterilizados (B-CN-036).

Marcador indeleble para los tubos.

Gradillas para viales Eppendorf.

Fotómetro UV.

b) Extracción de ADN

Pipetas monocanales con rango entre 10-100, 40-200 μ l y 100-1000 μ l.

Termobloque con rango 5-130 °C.

Centrifugadora refrigerada con velocidad entre 2000-13000 rpm.

Agitador de tubos.

Campana de extracción.

Reloj temporizador.

c) Métodos cualitativos

Campanas de bioseguridad sala PCR 1.

Bloque 0°C para soporte de reactivos.

Bloque congelado para soporte tubos reacción.

Centrífuga-Agitador para Tubos Eppendorf de 0,5 ml.

Vortex.

Centrífuga para Tubos SMART CYCLER.

Termociclador Cepheid SMART CYCLER II.

Tubos de reacción para Cepheid SMART CYCLER II (B-CN-003).

d) Métodos cuantitativos

Campanas de bioseguridad sala PCR 1.

Bloque 0°C para soporte de reactivos.

Bloque congelado para soporte tubos reacción.

Centrífuga-Agitador para Tubos Eppendorf de 0,5 ml.

Vortex.

Pipetas monocanales con rangos 0,5-10 μ l, 5-50 μ l, y 20-200 μ l.

Rodillo sellador de placas.

Centrífuga para placas.

Termociclador Applied StepOne.

Ordenador.

Impresora.

Guantes nitrilo (B-CN-052).

Placas 48 pocillos (B-CN-038).

Film transparente para placas (B-CN-039)

3.2.3. Reactivos

a) Comunes

Agua Calidad PCR libre de DNasa alícuotas de 1 ml biesterilizadas (B-RVP-059). Conservación a -20°C

b) Extracción de ADN

Kit Qiagen DNAsy Mericon Food. (B-RVC-566). Conservación a T^a ambiente (21 ± 3°C). Incluye:

Food Lysis Buffer. Listo para su uso.

Proteinasa K

Buffer PB. Listo para su uso.

Buffer AW2. Concentrado.

Buffer EB. Listo para su uso. Etanol 96% v/v (B-RVC-039). Conservación a T^a ambiente

Columnas QIAquick

Tubos de colección

Cloroformo (B-RVC-061). Conservación a T^a ambiente.

RNAsa 10 mg/ml (B-RVP-519). Conservación a -20°C.

c) PCR

PreMix

Métodos cualitativos.

PreMix Takara Probe (BV-RVC-507) Conservada a -20°C.

Métodos cuantitativos

TaqMan Universal PCR MasterMix (2X) (RVC-214). Conservada a 4°C.

Cebadores y sondas

ADH

Cebador forward ADH-F 50 µM en alícuotas (BV-RVP-619) Conservado a -20°C.

5'- CGT CGT TTC CCA TCT CTT CCT CC -3':

Cebador reverse ADH - R 50 µM en alícuotas (BV-RVP-621) Conservado a -20°C.

5'- CCA CTC CGA GAC CCT CAG TC-3'

Sonda 5' FAM ADH -S 5 µM preparado en alícuotas (BV-RVP-623). Es un reactivo fotosensible y hay que guardarlo en alícuotas, a -20°C y preservado de la luz.

5'-/56-FAM-/AAT CAG GGC TCA TTT TCT CGC TCC TCA /36-TAMSp/3'

Lectina

Cebador forward Le3 25 µM en alícuotas (BV-RVP-727) Conservado a -20°C.

5'- GCC CAT CTG CAA GCC TTT TT -3':

Cebador reverse Le5 25 µM en alícuotas (BV-RVP-729) Conservado a -20°C.

5'- GCC CTC TAC TGG ACC CCC A-3'

Sonda 5' FAM Le-S 10 µM preparado en alícuotas (BV-RVP-731). Es un reactivo fotosensible y hay que guardarlo en alícuotas, a -20°C y preservado de la luz.

5'-/56-FAM-AGC TTC GCC GCT TCC TTC AAC TTC AC /36-TAMSp/3'

Promotor P35S

Cebador forward 35S-F 2 µM en alícuotas (BV-RVP-758) Conservado a -20°C.

5' - GCC TCT GCC GAC AGT GGT -3':

Cebador reverse 35S- R 2 µM en alícuotas (BV-RVP-760) Conservado a -20°C.

5' - AAG ACG TGG TTG GAA CGT CTT-3'

Sonda 5' FAM 35S-S 2 µM preparado en alícuotas (BV-RVP-762). Es un reactivo fotosensible y hay que guardarlo en alícuotas, a -20°C y preservado de la luz.

5'-/56-FAM-CAA AGA TGG ACC CCC ACC CAC G36-TAMSp/3'

Terminador t-NOS

Cebador forward 180-F 50 µM en alícuotas (BV-RVP-753) Conservado a -20°C.

5' - CAT GTA ATG CAT GAC GTT ATT TAT -3':

Cebador reverse 180- R 50 µM en alícuotas (BV-RVP-755) Conservado a -20°C.

5' - TTG TTT TCT ATC GCG TAT TAA ATG T-3'

Sonda 5' FAM 180-S 5 µM preparado en alícuotas (BV-RVP-757). Es un reactivo fotosensible y hay que guardarlo en alícuotas, a -20°C y preservado de la luz.

5' - FAM-ATG GGT TTT TAT GAT TAG AGT CCC GCA A-TAMRA

Evento MON-810

Cebador forward MON810 -F 50 µM en alícuotas (BV-RVP-143) Conservado a -20°C.

5' - TCG AAG GAC GAA GGA CTC TAA CGT -3':

Cebador reverse MON810 - R 50 µM en alícuotas (BV-RVP-144) Conservado a -20°C.

5' - GCC ACC TTC CTT TTC CAC TAT CTT-3'

Sonda 5' FAM MON810-S 5 µM preparado en alícuotas (BV-RVP-145). Es un reactivo fotosensible y hay que guardarlo en alícuotas, a -20°C y preservado de la luz.

5'-/56-FAM-/AAC ATC CTT TGC CAT TGC CCA GC /36-TAMSp/3'

Construcción Soja GT-40-3-2 (Rondoup Ready)

Cebador forward RR3 25 µM en alícuotas (BV-RVP-733) Conservado a -20°C.

5' - CCT TTA GGA TTT CAG CAT CAG TGG -3':

Cebador reverse RR5 25 µM en alícuotas (BV-RVP-735) Conservado a -20°C.

5' - GAC TTG TCG CCG GGA ATG-3'

Sonda 5' FAM RRT 10 µM preparado en alícuotas (BV-RVP-737). Es un reactivo fotosensible y hay que guardarlo en alícuotas, a -20°C y preservado de la luz.

5'-/56-FAM-CGC AAC CGC CCG CAA ATC C /36-TAMSp/3'

3.3. Métodos de análisis utilizados.

3.3.1. Extracción y purificación de ADN

Método basado en las instrucciones del kit DNAsy Mericon Food de Qiagen, incluyendo un paso de digestión con RNAsa como adaptación a las necesidades de los métodos cuantitativos.

- Pesar 200 mg \pm 10 mg de muestra homogeneizada en viales Eppendorf de 2 ml (B-CN-011).

Nota: Los Materiales de Referencia Certificados se pesaran 100 mg \pm 5 mg

- Añadir 1 ml de Food Lysis Buffer y 2,5 μ l de Proteínasa K.
- Agitar en el vortex, asegurándose de que la muestra se ha humedecido y está bien mezclada.
- Incubar en el termobloque a 60°C durante 30 min, en agitación de 1000 rpm.
- Añadir 10 μ l de RNAsa (B-RVP-519), e incubar 10 minutos más
- Para que precipiten los inhibidores, refrescar la muestra hasta temperatura ambiente (15-25°C) en hielo, después de la incubación.
- Centrifugar durante 5 min a 2.500xg.

Nota: El volumen de sobrenadante depende mucho de la naturaleza de la muestra y de la cantidad de precipitados que se produce del complejo CTAB-inhibidor. Se espera que este volumen sea de entre 200-700 μ l. Hay que asegurarse en no llevarse con la pipeta ningún precipitado del fondo.

- Recoger el máximo volumen sobrenadante del tubo del paso anterior en un tubo vacío. Mezclarlo bien aspirando e soltándolo con la pipeta.
- Pipetear 500 μ l de cloroformo (B-RVC-061) en viales Eppendorf de 2 ml (B-CN-011) (campana de extracción sala Nematodos 2).
- Transferir el sobrenadante a los tubos que contienen el cloroformo.
- Agitar con el vortex durante 15 s vigorosamente y centrifugar durante 15 min a 14.000xg.

Nota: Si el sobrenadante no queda claro, volver a centrifugar durante 5 min.

- Pipetear 350 μ l del buffer PB en un vial Eppendorf de 2 ml (B-CN-011) vacío.
- Añadir 350 μ l de la fase superior acuosa del tubo procedente de paso anterior y agitarlo en un vortex completamente.
- Pipetear la solución resultante en una columna de Qiaquick colocada en un tubo de colección. Centrifugar durante 1 min. a 17.900xg, tirar el filtrado. Reutilizar el tubo en el paso siguiente.
- Añadir 500 μ l de buffer AW2 a la misma columna, centrifugar durante 1 min. a 17.900xg y tirar el filtrado. Volver a centrifugar el tubo con la columna durante 1 min. a 17.900xg, para secar la membrana.

Nota: En matrices procedentes de soja es conveniente realizar un segundo lavado con 350 μ l de buffer AW2

- Transferir la columna a un vial Eppendorf de 1,5 ml (B-CN-012), previamente rotulado con el código del ADN y añadir 100 μ l de buffer EB en la columna.
- Incubar durante 1 min. a temperatura ambiente (15-25°C).
- Centrifugar durante 1 min. a 17.900xg. para extraer el ADN de la columna.
- Si no se va a realizar inmediatamente la PCR, guardar los extractos a -20° C.

3.3.2. Cuantificación de ADN

a) Ajuste del Blanco:

- Añadir al menos 50 µL de buffer EB a una Cubeta UV para 50-2000 µL (B-CN-021).
- Comprobar al trasluz que no hay burbujas en el líquido y que la altura del mismo supera la zona estrecha del fondo de la cubeta.
- Colocar la cubeta en el fotómetro en la posición correcta.
- Seleccionar “Blank” pulsando la tecla elíptica y esperar a que se realice la medición y el ajuste.
- Descartar la cubeta y el líquido en un contenedor de desechos

b) Medida de la concentración de ADN en las muestras:

- Agitar la muestra al menos 5 segundos en un agitador Vortex.
- Añadir, con la micropipeta de 1-100 µL al menos 50 µL de muestra a una Cubeta UV para 50-2000 µl (B-CN-021).
- Comprobar al trasluz que no hay burbujas en el líquido y que la altura del mismo supera la zona estrecha del fondo de la cubeta.
- Colocar la cubeta en el fotómetro en la posición correcta.
- Seleccionar “Sample” pulsando la tecla elíptica y esperar unos segundos a que se realice la medición.
- Si la concentración está fuera del rango del fotómetro (aparece en la pantalla “+++++”):
 - Inicialmente, realizar una dilución 1:5 de la muestra pipeteando 20 µl de muestra junto con 80 µl de agua calidad PCR (o cantidades proporcionales) en un vial Eppendorf. Repetir los pasos anteriores.
- Si la concentración está dentro del rango del fotómetro (aparece en la pantalla un valor numérico), anotar el resultado en la hoja de trabajo, junto con los ratios A260/A230 y A260/A280 que proporciona el aparato.
- Recuperar el líquido vertiéndolo en el mismo tubo Eppendorf del que procedía y descartar la cubeta en el contenedor de desecho.
- Realizar los cálculos para ajustar la concentración de ADN de tal modo que la carga necesaria en cada reacción este en un volumen de 4-6 µl.

3.3.3. PCR, pasos comunes

a) Preparación y distribución de la MasterMix. Sala PCR1 (dentro de la campana de Primers)

- Encender el flujo de la campana de bioseguridad para Primers.
- Introducir el bloque 0°C con los reactivos y el bloque congelado para soporte de tubos o placas de reacción en la campana.

Cualitativos: Introducir en la campana el número de tubos de reacción para SmartCycler (B-CN-003) que se precisen (Máximo 16 por Run). Numerarlos y colocarlos en orden dentro del bloque congelado para soporte de tubos de reacción. No tocar con los dedos más que la zona superior de los tubos.

Cuantitativos: Introducir en la campana la placa de reacción para StepOne

- Introducir en el Bloque frío un Tubo Eppendorf de 0,5 ml biesterilizado (B-CN-036) para realizar la MasterMix. En caso de realizar simultáneamente más de una MasterMix anotar el nombre del gen en la tapa el tubo correspondiente.

Verificación de un procedimiento de ensayo para la detección y cuantificación de Organismos Manipulados Genéticamente.

- Añadir en este orden los volúmenes calculados en la Hoja de trabajo correspondiente: Agua, PreMix, Primer-F, Primer-R y Sonda. Cerrar el vial.
- Agitar el vial conteniendo la MasterMix, en la centrifuga-agitadora programa:
 - 2 ciclos consistentes en:
 - Centrifugación: 2 s a 2000 r.p.m.
 - Agitación: 5 s “hard”.
- Añadir el volumen de MasterMix calculado en la hoja de trabajo a todos los Tubos de reacción para SmartCycler, o pocillos de la placa.

b) Adición de las muestras. Sala PCR1 (dentro de la campana de manejo de ADN)

- Encender el flujo de la campana de bioseguridad para Manejo de ADN.
- Pasar el bloque congelado con la placa del StepOne o los tubos de reacción para SmartCycler a los que se ha añadido la MasterMix, a la campana de manejo de ADN.
- Agitar los ADNs correspondientes a las muestras y los controles en el vortex durante unos segundos. Asegurarse que el líquido queda en el fondo.
- Añadir el volumen calculado en la hoja de trabajo de las Muestras y Controles a los pocillos de la placa del StepOne o a sus correspondientes tubos de reacción para SmartCycler según la Hoja de Trabajo. Cerrar cada tubo tras la adición de la muestra.
- Centrifugar en la centrifuga para tubos de reacción para SmartCycler o de placas para StepOne. Comprobar visualmente que el contenido del tubo está en el fondo, si no es así centrifugar nuevamente.

c) Amplificación

- Introducir los tubos o la placa en el termociclador. Asegurarse que están colocados correctamente.
- Seleccionar el protocolo de tiempo y temperatura adecuado.
- Darle a la tecla Start Run.
- Al terminar, quitar los tubos o la placa del termociclador y sin abrir tirarlos directamente a la Caja de residuos.
- Se Anotará como resultado el Ct (Ciclo Umbral) de cada tubo de reacción en la hoja de trabajo correspondiente.

d) Limpieza

- Al terminar limpiar con papel mojado con desinfectante la campana, la poyata y todo el material que hayamos utilizado: superficies, pipetas, cajas de puntas... todo aquello con lo que hayamos tenido contacto.
- Conectar la luz ultravioleta de las campanas de bioseguridad.
- Cuando se llene una caja de residuos, se trasladará al bidón de residuos situado en la sala PCR3.

3.3.4. Métodos Cualitativos.

a) ADH

Método implementado siguiendo la adaptación del LAA para la cuantificación de MON810.

Código Compendium: QT-TAX-ZM-001 (antes QT/TAX/001)

Referencia ISO: 21570:2005 Anexo A1

Tamaño del amplicón: 134 pb

Secuencia diana: adh1

LOD en la validación: 10 copias

Tabla 17: Parámetros del método para la detección por PCR de la ADH del Maíz.

	Datos validación	LAA
Carga ADN	<250 ng	150 ng
Concentración cebador F	300 nM	900 nM
Concentración cebador R	300 nM	900 nM
Concentración Sonda	200 nM	200 nM
Nº ciclos	45	=
Tª hibridación	60°C	=

b) Lectina

Se incrementa la carga de ADN y el nº de ciclos para unificar con el resto de métodos, al ser el gen endógeno el que va a ser empleado en la verificación de la Eficiencia y como control blanco de extracción. En el método cuantitativo se mantienen los parámetros de la bibliografía.

Código Compendium: QT-CON-00-001 (antes QT/MG/001)

Referencia ISO: 21570:2005 Anexo C4

Tamaño del amplicón: 118 pb

Secuencia diana: le1

LOD en la validación: 20 copias / 0,01 %

Tabla 18: Parámetros del método para la detección por PCR del gen de la Lectina de la Soja

	Datos validación	Adaptación
Carga ADN	50 ng	150 ng / 50 ng (cuantitativo)
Concentración cebador F	500 nM	=
Concentración cebador R	500 nM	=
Concentración Sonda	200 nM	=
Nº ciclos	40	45 / 40 (cuantitativo)
Tª hibridación	60°C	=

c) Promotor P35S

Parte del método dúplex para P35s y t-NOS que desarrollan el Compendium y la norma ISO. Durante la puesta a punto del método se observó falta de sensibilidad en diluciones seriadas, problema que se subsana incrementando la concentración de oligonucleótidos.

Código Compendium: QL-ELE-00-012 (antes SC/ELE/012)

Referencia ISO: 21569:2006 A1:2013 Anexo B9

Tamaño del amplicón: 82 pb

Secuencia diana:

LOD en la validación: 10 copias

Tabla 19: Parámetros del método para la detección por PCR del Promotor P35S

	Datos validación	Adaptación
Carga ADN	<200 ng	150 ng
Concentración cebador F	100 nM	150 nM
Concentración cebador F	100 nM	150 nM
Concentración Sonda	100 nM	120 nM
Nº ciclos	40	45
Tª hibridación	60°C	=

d) Terminador t-NOS

Código Compendium: QL-ELE-00-011 (antes SC/ELE/011)

Referencia ISO: 21569:2006 A1:2013 Anexo B6

Tamaño del amplicón: 84 pb

Secuencia diana: región 3' terminal del gen NOS

LOD en la validación: $\leq 0,1 \%$

Tabla 20: Parámetros del método para la detección por PCR del terminador t-NOS

	Datos validación	Adaptación
Carga ADN	<200 ng	150 ng
Concentración cebador F	100 nM	=
Concentración cebador F	100 nM	=
Concentración Sonda	100 nM	=
Nº ciclos	45	=
Tª hibridación	60°C	=

e) Evento MON-810

Método implementado siguiendo la adaptación del LAA para la cuantificación de MON810.

Código Compendium: QT-EVE-ZM-020 (antes QT/ZM/020)

Referencia ISO: 21570:2005 Anexo D2

Tamaño del amplicón: 92 pb

Secuencia diana: 5'IBR

LOD en la validación del LAA: 0,05 %

Tabla 21: Parámetros del método para la detección por PCR del evento MON810.

	Datos validación	LAA
Carga ADN	150 ng	=
Concentración cebador F	300 nM	=
Concentración cebador F	300 nM	=
Concentración Sonda	180 nM	200 nM
Nº ciclos	45	=
Tª hibridación	60°C	=

f) Construcción Soja GT-40-3-2 (Rondoup Ready)

En combinación con el método de la lectina se emplea para la cuantificación relativa de la construcción.

Código Compendium: QT-CON-00-001 (antes QT/MG/001)

Referencia ISO: 21570:2005 Anexo C4

Tamaño del amplicón: 118 pb

Secuencia diana: CTP Petunia híbrida EPSPS

LOD en la validación: 20 copias / 0,01 %

Tabla 22: Parámetros del método para la detección por PCR de la construcción soja GTS-40-3-2.

	Datos validación	Adaptación
Carga ADN	50 ng	150 ng /50 ng (cuantificación)
Concentración cebador F	500 nM	=
Concentración cebador F	500 nM	=
Concentración Sonda	200 nM	=
Nº ciclos	40	45 /40 (cuantitativo)
Tª hibridación	60°C	=

3.3.5. Métodos Cuantitativos

La cuantificación relativa de los OMG se realiza siguiendo las directrices de la guía para la acreditación flexible (JRC, Trapman, & et al., 2014), en cuanto a las curvas de calibrado (5 puntos duplicados, excepto en la cuantificación de la ADH, que hemos empleado 3 réplicas de PCR).

Los procedimientos consisten en la combinación de un método para la cuantificación del transgén realizado simultáneamente con una cuantificación del gen endógeno (ADH + MON810 y Lectina + GTS-40-3-2).

3.4. Operarios

Los operarios citados con número a continuación son los siguientes:

- 1.- I. Pascal. Cualificado.
- 2.- M.Borda. En proceso de cualificación.
- 3.- O.Cajal. En proceso de cualificación.

4. Resultados y discusión.

4.1. Extracción y purificación de ADN

4.1.1. Soja

a) Concentración ADN

La extracción se realizó sobre $0,100 \text{ g} \pm 0,005 \text{ g}$ de mezcla de harina MG y no MG de MRC ERM-BF-410a y ERM-BF-410c, en proporción 9:1, realizada tras mantener las harinas al aire para igualar sus contenidos de humedad. La mezcla fue realizada en un recipiente hermético de vidrio que se homogeneizó durante dos horas por volteo, y posteriormente se repartió en 10 viales eppendorf para proceder a su extracción. Durante el tiempo entre una tanda de extracción y la siguiente se mantuvieron protegidas de la luz en nevera a 4°C. Se usó un Kit de extracción distinto en la tercera jornada.

Tabla 23: Resultados de la extracción de ADN en harina de soja.

	Operario	extracción		Concentración ADN			
		Fecha	cod ADN	Fecha	c ADN (ng/ul)	A260/A280	A260/A230
soja	1	23/05/2014	14/0441	28/05/2014	61,40	1,70	1,16
soja	1	23/05/2014	14/0442	28/05/2014	47,60	1,68	1,16
soja	1	23/05/2014	14/0443	28/05/2014	48,40	1,72	1,18
soja	1	23/05/2014	14/0444	28/05/2014	47,20	1,70	1,12
media diaria		23/05/2014		28/05/2014	51,15	1,70	1,16
Sr1		23/05/2014		28/05/2014	6,85	0,02	0,03
soja	2	28/05/2014	14/0454	28/05/2014	49,80	1,70	1,13
soja	2	28/05/2014	14/0455	28/05/2014	47,70	1,71	1,14
soja	2	28/05/2014	14/0456	28/05/2014	42,00	1,66	1,05
media diaria		28/05/2014		28/05/2014	46,50	1,69	1,11
Sr2		28/05/2014		28/05/2014	4,04	0,03	0,05
soja	3	09/06/2014	14/0548	10/06/2014	63,20	1,62	1,00
soja	3	09/06/2014	14/0549	10/06/2014	43,60	1,65	1,02
soja	3	09/06/2014	14/0550	10/06/2014	51,40	1,64	1,00
media diaria		09/06/2014		10/06/2014	52,73	1,64	1,01
Sr3		09/06/2014		10/06/2014	9,87	0,02	0,01
media interdiaria					50,13	1,68	1,09
SR					3,29	0,01	0,03
media total					50,23	1,68	1,10
Stotal					6,93	0,03	0,07

Se verifica que el método de extracción suministra suficiente cantidad de ADN para el procedimiento de ensayo.

El ratio A260/A280 es mayor de 1,6 en todos los extractos, mientras que el ratio A260/A230 está muy por debajo del valor teórico.

b) Ausencia de inhibidores

Los ensayos se realizaron en distintas jornadas según la disponibilidad de tiempo

Resultados

Tabla 24: Resultados de los ensayos de inhibición en extractos de ADN procedentes de harina de soja.

cod ADN	Fecha	factor dilución	endógeno										
			1			4		16		64		256	
			Conc			0,25		0,0625		0,0156		0,0039	
			log			-0,602		-1,204		-1,806		-2,408	
			Oper. / Observ.	Ct1	Ct2	Ct medio	Ct1	Ct2	Ct1	Ct2	Ct1	Ct2	Ct1
14/0443	04/06/14	1	25,51	25,44	25,48	27,37	27,17	29,35	29,34	31,21	31,2	33,39	33,17
14/0444	05/06/14	1	25,3	25,5	25,40	27,19	27,27	29,32	29,15	30,91	31,09	33,24	33,31
media			25,44			27,25		29,29		31,10		33,28	
s _{r1}			0,097			0,091		0,094		0,139		0,094	
14/0454	03/06/14	1	25,39	25,22	25,31	27,43	27,27	29,27	29,15	30,98	31,31	33,25	33,23
14/0455	03/06/14(2)	1	25,44	25,31	25,38	27,24	27,18	29,29	29,03	30,99	31,27	33,36	33,48
media			25,34			27,28		29,19		31,14		33,33	
s _{r2}			0,096			0,107		0,120		0,177		0,115	
14/0534	06/06/14	1	25,51	25,44	25,48	27,37	27,17	29,35	29,34	31,21	31,2	33,39	33,17
14/0530	06/06/14(2)	1	25,54	25,47	25,51	27,34	27,24	29,26	29,21	31,14	31,24	33,11	33,3
media			25,49			27,28		29,29		31,20		33,24	
s _{r3}			0,044			0,092		0,067		0,042		0,126	
media			25,42			27,27		29,26		31,15		33,28	
s _R			0,076			0,017		0,061		0,048		0,044	

Cálculos

Tabla 25: Cálculos de inhibición en extractos de ADN procedentes de harina de soja.

cod ADN	Fecha	R ²	punto de corte (a)	Pendiente (b)	eficiencia	Ct calculado	Δ Ct
14/0443	04/06/14	0,998	25,303	-3,304	100,750	25,303	-0,175
14/0444	05/06/14	0,997	25,210	-3,305	100,710	25,210	-0,190
media		0,998	25,257	-3,305	100,730	25,257	25,257
S _{r1}		0,001	0,066	0,001	0,028	0,064	0,066
14/0454	03/06/14	0,997	25,335	-3,256	102,830	25,335	0,035
14/0455	03/06/14(2)	0,997	25,080	-3,422	95,990	25,080	-0,295
media		0,997	25,208	-3,339	99,410	25,210	25,208
S _{r2}		0,000	0,180	0,117	4,837	0,184	0,180
14/0534	06/06/14	0,998	25,303	-3,304	100,750	25,303	-0,175
14/0530	06/06/14(2)	0,999	25,305	-3,272	102,130	25,305	-0,195
media		0,999	25,304	-3,288	101,440	25,305	25,304
S _{r3}		0,001	0,001	0,023	0,976	0,007	0,001
Media interdiaria		0,998	25,256	-3,311	100,527	25,257	25,256
S _R		0,001	0,048	0,026	1,030	0,048	0,048
Media Total		0,998	25,256	-3,311	100,527	25,257	25,256
S _{total}		0,001	0,096	0,058	2,391	0,097	0,096

Se verifica la ausencia de inhibición. Los parámetros R², Eficiencia de la amplificación y ΔCt están en todos los casos dentro de los requerimientos.

4.1.2. Maíz

Como en el caso de la soja la extracción fue realizada en 3 jornadas por 3 operarios distintos, sobre una mezcla de harinas procedentes de MRC ERM-BF-413ak y ERM-BF-413cK, en igual proporción y procedimiento que el descrito en el apartado 4.1.1. Se usó un Kit distinto en la tercera jornada. Se incluyó en el ensayo de inhibición una muestra de MRC ERM-BF-412a (maíz Bt11 Blank, Códigos de ADN 14/0532 y 14/0533)

a) Concentración ADN

Tabla 26: Resultados de la extracción de ADN en harina de maíz.

	Operario	extracción		Concentración ADN			
		Fecha	cod ADN	Fecha	ng/ul	A260/A280	A260/A230
Maiz	1	23/05/2014	14/0445	28/05/2014	46,70	1,77	1,78
Maiz	1	23/05/2014	14/0446	28/05/2014	36,00	1,79	1,73
Maiz	1	23/05/2014	14/0447	28/05/2014	35,80	1,82	1,74
Maiz	1	23/05/2014	14/0448	28/05/2014	34,90	1,77	1,76
media diaria					38,35	1,79	1,75
S _{r1}					5,59	0,02	0,02
Maiz	2	28/05/2014	14/0457	28/05/2014	38,70	1,78	1,77
Maiz	2	28/05/2014	14/0458	28/05/2014	40,60	1,79	1,87
Maiz	2	28/05/2014	14/0459	28/05/2014	41,90	1,79	1,84
media diaria					40,40	1,79	1,83
S _{r2}					1,61	0,01	0,05
Maiz	3	09/06/2014	14/0545	10/06/2014	44,80	1,81	1,69
Maiz	3	09/06/2014	14/0546	10/06/2014	47,30	1,81	1,68
Maiz	3	09/06/2014	14/0547	10/06/2014	39,50	1,80	1,68
media diaria					43,87	1,81	1,68
S _{r3}					3,98	0,01	0,01
media interdiaria					40,87	1,79	1,75
S _R					1,45	0,00	0,05
media total					40,62	1,79	1,75
S _{total}					4,51	0,02	0,06

Se verifica que la concentración de ADN es suficiente para las necesidades del procedimiento.

Los ratios A260/A280 y A260/A230 están dentro de los valores teóricos, siendo superiores a los de la soja, destacando la diferencia entre las dos matrices en el ratio A260/A230.

b) Ausencia de inhibidores

Se emplearon extractos de ADN procedentes de MRC de maíz MON810 y Bt11. En la primera jornada se agotó la sonda, realizándose las dos últimas con una nueva dilución.

Resultados

Tabla 27: Resultados de los ensayos de inhibición en extractos de ADN procedentes de harina de maíz.

cod DNA	Fecha	factor dilución	endógeno										
			1			4		16		64		256	
			1			0,25		0,0625		0,0156		0,0039	
			0			-0,602		-1,204		-1,806		-2,408	
			Observ.	Ct1	Ct2	Ct medio	Ct1	Ct2	Ct1	Ct2	Ct1	Ct2	Ct1
14/0457	03/06/14		23,89	23,83	23,86	26,27	26,2	28,03	28,21	30,12	30,05	32,08	32,21
14/0458	03/06/14(2)		24,07	23,97	24,02	26,17	26,07	27,85	28,17	30,59	30,21	31,62	32,16
media			23,94			26,18		28,07		30,24		32,02	
Sr1			0,10			0,08		0,16		0,24		0,27	
14/0447	05/06/14	sonda nueva	24,79	24,79	24,79	26,89	26,95	29,04	28,96	30,87	30,96	33,22	32,95
14/0448	05/06/14(2)	sonda nueva	24,61	24,42	24,52	26,62	26,75	28,68	28,61	30,54	31,02	32,4	32,32
media			24,65			26,80		28,82		30,85		32,72	
Sr2			0,18			0,15		0,21		0,21		0,43	
14/0532	09/06/14		25,03	24,97	25,00	26,83	26,77	29	29,1	31,05	31,13	32,72	32,56
14/0533	10/06/14		24,92	24,88	24,90	27,04	26,94	28,96	29,05	30,84	30,98	32,98	32,87
media			24,95			26,90		29,03		31,00		32,78	
Sr3			0,065			0,120		0,061		0,123		0,183	
media			24,51			26,63		28,64		30,70		32,51	
S _{total}			0,519			0,390		0,507		0,401		0,425	

Cálculos

Tabla 28: Cálculos de inhibición en extractos de ADN procedentes de harina de maíz.

cod DNA	Fecha	R ²	punto de corte (a)	Pendiente (b)	eficiencia	Ct calculado	Δ Ct
14/0443	04/06/2014	1,00	24,22	-3,27	102,17	24,22	0,36
14/0444	05/06/2014	0,99	24,18	-3,27	102,13	24,18	0,16
media		0,99	24,20	-3,27	102,15	24,20	0,26
S _{r1}		0,01	0,03	0,00	0,03	0,03	0,14
14/0454	03/06/2014	1,00	24,88	-3,39	97,24	24,88	0,09
14/0455	03/06/2014(2)	0,99	24,83	-3,18	106,19	24,83	0,31
media		1,00	24,85	-3,29	101,72	24,86	0,20
S _{r2}		0,00	0,04	0,15	6,33	0,04	0,16
14/0532	06/06/2014	0,99	25,01	-3,25	103,14	25,01	0,01
14/0533	06/06/2014 (2)	1,00	25,03	-3,27	102,04	25,03	0,13
media		1,00	25,02	-3,26	102,59	25,02	0,07
S _{r3}		0,00	0,02	0,02	0,78	0,01	0,08
Media interdiaria		0,99	24,69	-3,27	102,15	24,69	0,18
S _R		0,00	0,43	0,01	0,44	0,43	0,10
Media Total		0,99	24,69	-3,27	102,15	24,69	0,18
S _{total}		0,01	0,39	0,07	2,88	0,39	0,13

Se verifica la ausencia de inhibición. Los parámetros R², Eficiencia de la amplificación y ΔCt están en todos los casos dentro de los requerimientos.

4.2. Métodos cualitativos LD

4.2.1. Soja

Los ensayos se realizaron en tres jornadas para cada secuencia, por dos operarios, partiendo del ADN extraído anteriormente en tres jornadas distintas de una mezcla de harinas con una concentración de soja GTS-40-3-2 (Rondup Ready) del 0,05 %.

Tabla 29: Resultados de los ensayos cualitativos en extractos de ADN procedentes de harina de soja.

	Opera rio	cod ADN	P35S			T-NOS			GT-40-3-2		
			Fecha	Ct1	Ct2	Fecha	Ct1	Ct2	Fecha	Ct1	Ct2
soja	1	14/0441	28/5/14	38,29	38,32	30/5/14	36,29	35,39	30/5/14	35,28	35,22
soja	1	14/0442	28/5/14	39,05	38,37	30/5/14	36,35	36,94	30/5/14	36,07	35,74
soja	1	14/0443	28/5/14	38,77	38,70	30/5/14	36,28	35,48	30/5/14	35,60	35,73
soja	1	14/0444	28/5/14	38,63	38,68	30/5/14	36,07	35,85	30/5/14	35,82	35,94
media diaria			28/5/14	38,60		30/5/14	36,08		30/5/14	35,68	
S _{r1}			28/5/14	0,26		30/5/14	0,51		30/5/14	0,30	
soja	1	14/0454	28/5/14(2)	38,70	37,60	2/6/14	35,56	36,12	02/6/14	36,35	35,93
soja	1	14/0455	28/5/14(2)	37,45	37,25	2/6/14	36,43	35,77	02/6/14	36,12	35,81
soja	1	14/0456	28/5/14(2)	38,15	38,23	2/6/14	35,51	35,72	02/6/14	36,81	36,45
media diaria			28/5/14(2)	37,90		2/6/14	35,85		2/06/14	36,25	
S _{r2}			28/5/14(2)	0,55		2/6/14	0,36		2/6/14	0,37	
soja	3	14/0548	18/6/14	37,70	37,67	18/6/14	36,51	37,10	18/6/14	34,93	35,25
soja	3	14/0549	18/6/14	38,40	37,97	18/6/14	36,56	36,37	18/6/14	35,37	35,30
soja	3	14/0550	18/6/14	37,51	37,58	18/6/14	35,78	35,85	18/6/14	34,79	35,53
media diaria			18/6/14	37,81		18/6/14	36,36		18/6/14	35,20	
S _{r3}			18/06/14	0,33		18/6/14	0,49		18/6/14	0,28	
media interdiaria			38,10			36,10			35,71		
S _R			0,44			0,26			0,53		
Media operario 1			38,25			35,97			35,96		
S _{O1}			0,50			0,16			0,40		
Media operario 2			37,81			36,36			35,20		
S _{O1}			0,33			0,49			0,28		
media total			38,15			36,10			35,70		
S _{total}			0,53			0,48			0,51		

Se verifica que el LOD es menor o igual al 0,05 % de soja Rondoup Ready en masa tanto para la construcción, como para el promotor P35S y el terminador t-NOS, ya que no se ha registrado ningún negativo en las 20 réplicas de cada diana.

Los valores de Ct en los ensayos con el promotor P35S como diana son del orden de dos ciclos más tardíos que en el resto de secuencias. En la puesta a punto del método ya se había observado que a las concentraciones de cebadores y sonda propuestas en el Compendium el LOD era superior al del resto de secuencias, por lo que se incrementaron ligeramente. Las desviaciones estándar de las tres dianas son del orden de 0,5 Ct, tanto diarias, como considerando los efectos de la reproducibilidad.

4.2.2. Maíz

Los ensayos se realizaron en tres jornadas para cada secuencia, por dos operarios de los extractos descritos en apartado 4.1.2. conteniendo un 0,05 % de MON810 . En el caso del P35S, por motivos de capacidad del termociclador, un extracto de la primera extracción se amplificó junto con los de la segunda tanda.

Tabla 30: Resultados de los ensayos cualitativos en extractos de ADN procedentes de harina de maíz.

	Opera rio	cod ADN	P35S			T-NOS			MON810		
			Fecha	Ct1	Ct2	Fecha	Ct1	Ct2	Fecha	Ct1	Ct2
maíz	1	14/0445	28/05/14	40,28	40,57	05/06/14			02/06/14	36,04	35,51
maíz	1	14/0446	28/05/14	41,33	41,07	05/06/14	42,27	40,08	02/06/14	35,46	36,04
maíz	1	14/0447	28/05/14	41,15	40,30	05/06/14	40,42	40,92	02/06/14	35,32	35,07
maíz	1	14/0448	28/05/14(2)	40,52	40,60	05/06/14		41,38	02/06/14	34,63	35,59
media diaria			28/05/14	40,73		05/06/14	41,01		02/06/14	35,46	
S _{r1}			28/05/14	0,40		05/06/14	0,86		02/06/14	0,47	
maíz	1	14/0457	28/05/14(2)	39,60	40,07	05/06/14	38,86		30/5/14(3)	35,10	35,04
maíz	1	14/0458	28/05/14(2)	40,71	39,96	05/06/14			30/5/14(3)	34,95	34,44
maíz	1	14/0459	28/05/14(2)	39,78	41,29	05/06/14			30/5/14(3)	35,60	35,20
media diaria			28/5/14(2)	40,24		05/06/14	38,86		30/5/14(3)	35,06	
S _{r2}			28/5/14(2)	0,64		05/06/14	-		30/5/14(3)	0,38	
maíz	3	14/0545	18/06/14	39,22	41,16	18/06/14	39,69	42,27	18/06/14	37,27	38,20
maíz	3	14/0546	18/06/14	39,64	39,98	18/06/14		42,63	18/06/14	36,35	36,60
maíz	3	14/0547	18/06/14	40,06	39,93	18/06/14			18/06/14	36,39	37,11
media diaria			18/06/14	40,00			41,53			36,99	
S _{r3}			18/06/14	0,65			1,60			0,70	
media interdiaria				40,32			40,47			35,83	
S _R				0,37			1,42			1,02	
Media operario 1				40,48			39,94			35,26	
S _{O1}				0,35			1,52			0,28	
Media operario 2				40,00			41,53			36,99	
S _{O2}				0,65			1,60			0,70	
media total				40,36			40,95			35,80	
S _{total}				0,62			1,30			0,96	

Se verifica que el LOD es menor o igual al 0,05 % de MON810 en masa tanto para el evento como para el promotor P35S, ya que no se ha registrado ningún negativo en las 20 réplicas.

Los valores de Ct en los ensayos con el promotor P35S como diana son del orden de cuatro ciclos más tardíos que en el evento MON810.

El terminador t-NOS, teóricamente ausente de la construcción ha dado positivo en 9 de las 20 réplicas, con un Ct medio de 40,95. El posible motivo está en que el MRC no certifica la ausencia de OMG distintos del MON810.

4.3. Métodos cuantitativos

4.3.1. Construcción Soja GTS 40-3-2

Los cuatro ensayos se realizaron en 2 jornadas, ya que en una no da tiempo material, por el mismo operario (1), empleando el mismo patrón y los mismos reactivos.

Se utilizaron nuevos extractos de ADN procedentes de MRC ERM-BF-413bk ($0,1 \pm 0,05$ %), MRC ERM-BF-413dk ($1,0 \pm 0,1$ %) y MRC ERM-BF-413fk ($10,00 \pm 0,7$ %).

Tabla 31: Diseño de la placa para la cuantificación de la construcción GTS-40-3-2 en extractos de ADN procedente de harina de soja.

	Lec		Soja RR		Soja RR		Lec	
	1	2	3	4	5	6	7	8
a	P10	P10	P10	P10	14/0757	14/0757	14/0757	14/0757
b	P10/2	P10/2	P10/2	P10/2	14/0758	14/0758	14/0758	14/0758
c	P10/5	P10/5	P10/5	P10/5	14/0759	14/0759	14/0759	14/0759
d	P10/20	P10/20	P10/20	P10/20	14/0760	14/0760	14/0760	14/0760
e	P10/100	P10/100	P10/100	P10/100	14/0762	14/0762	14/0762	14/0762
f	C(-)	C(-)	C(-)	C(-)	14/0763	14/0763	14/0763	14/0763
				Total Muestras:	6			

P10: Patrón de calibración (ADN extraído de MRC soja RR 10 %)

P10/2: Dilución 1:2 de P10 (5 % soja RR y 50 % Lectina)

P10/5: Dilución 1:5 de P10 (2 % soja RR y 20 % Lectina)

P10/20: Dilución 1:20 de P10 (0,5 % soja RR y 5 % Lectina)

P10/100: Dilución 1:100 de P10 (0,1 % soja RR y 1 % Lectina)

C (-): control negativo de amplificación

14/0757 y 14/0758: ADN extraído de MRC soja RR 0,1 %

14/0759 y 14/0760: ADN extraído de MRC soja RR 1,0 %

14/0762 y 14/0763: ADN extraído de MRC soja RR 10,0 %

Resultados (Ct)

16/07/2014

Tabla 32: Valores de Ct obtenidos en la cuantificación de la construcción GTS-40-3-2 en extractos de ADN procedente de harina de soja (16/07/14).

	Endogeno		Transgén				Endogeno	
	1	2	3	4	5	6	7	8
a	26,83642769	26,6062851	27,76946449	27,85306931	34,27217865	34,0429039	26,74031067	26,89308167
b	27,62295532	27,43470573	28,69923401	28,81866837	34,33660507	34,55315018	26,79768944	26,9305687
c	28,88848877	28,70065689	30,18257713	30,20446014	31,397089	31,37751389	26,6393013	26,89378166
d	30,9901371	30,72784615	32,26685715	32,33880997	31,33289719	31,62600899	26,76161575	26,94365311
e	33,70249176	33,42886734	34,2791214	34,93854141	27,97793579	27,9437542	26,77606964	26,96017838
f	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	27,97802162	27,9689312	26,86921692	27,0564537

18/07/2014

Tabla 33: Valores de Ct obtenidos en la cuantificación de la construcción GTS-40-3-2 en extractos de ADN procedente de harina de soja (18/07/14).

	Endogeno		Transgén				Endogeno	
	1	2	3	4	5	6	7	8
a	26,9025726	26,8143673	28,30013657	28,1346836	34,4276428	34,8610802	26,888588	27,04558182
b	27,5879173	27,6707993	28,97328568	29,0611572	34,7676849	34,9574089	27,0331345	26,95985222
c	28,8432922	28,7626705	30,11642838	30,1959076	31,8133945	31,4870834	26,7397766	26,87806129
d	31,3153362	30,6610432	32,1970253	32,5362282	31,7253323	31,749836	26,8009319	26,89358521
e	33,3297501	33,1141167	34,97985077	34,9710274	28,152071	28,1676445	26,937952	26,95321465
f	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	28,255331	28,2347431	27,0527058	27,05875397

18/07/2014 (2)

Tabla 34: Valores de Ct obtenidos en la cuantificación de la construcción GTS-40-3-2 en extractos de ADN procedente de harina de soja (18/07/14-2).

	Endogeno		Transgén				Endogeno	
	1	2	3	4	5	6	7	8
a	27,3870621	27,2093029	28,25204849	28,161932	34,4691086	35,0342102	27,377903	27,24365616
b	27,9629879	27,9650593	29,16880226	29,2927017	34,6917725	34,4974823	27,3682365	27,35409927
c	29,3440437	29,3459435	30,50992012	30,5751743	31,8590794	31,8239613	27,2761936	27,2564621
d	31,3070946	31,1870213	32,66783524	32,5899162	31,9894714	31,9608269	27,2888165	27,40303421
e	33,7613182	33,7246704	35,16937256	34,8647919	28,3687534	28,374239	27,3987942	27,4305706
f	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	28,4882355	28,3405972	27,3588486	27,44828033

18/07/2014 (3)

Tabla 35: Valores de Ct obtenidos en la cuantificación de la construcción GTS-40-3-2 en extractos de ADN procedente de harina de soja (18/07/14-3).

	Endogeno		Transgén				Endogeno	
	1	2	3	4	5	6	7	8
a	26,75202751	26,89518738	28,28383255	28,2042141	35,58322144	34,95636368	27,1004467	27,15224075
b	27,69218254	27,65882683	29,15224648	29,16651917	34,69298553	35,41327667	27,05824661	26,97702789
c	28,92140961	28,93913651	30,40171432	30,37303162	31,93188858	31,92314911	26,94261742	26,99962044
d	30,98250198	30,93946457	32,59043503	32,6345787	31,90573692	31,95390511	26,96398544	26,99735641
e	33,44745636	33,33773041	34,80124664	35,22702026	28,26135635	28,30783844	26,93159676	27,07301331
f	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	28,2698307	28,19476891	26,96858406	27,02459908

a) Rango lineal, Eficiencia, Pendiente y R². Cálculos en 7.2.2

Transgén

Tabla 36: Rango lineal, Eficiencia, Pendiente y R² para la construcción Soja GTS-40-3-2.

Fecha	b	a	E	R ²
16/07/2014	-3,42670841	31,21411362	95,81	1,00
18/07/2014	-3,410463114	31,42333535	96,43	0,99
18/07/2014 (2)	-3,406705102	31,60148642	96,58	1,00
18/07/2014 (3)	-3,415450828	31,56094342	96,24	1,00
Media	-3,414831863	31,4499697	96,26	0,9975
s	0,008690334	0,174747402	0,336177708	0,005

Se verifica que tanto la pendiente, como la eficiencia y el coeficiente R², cumplen los requerimientos exigidos.

Endógeno:

Tabla 37: Rango lineal, Eficiencia, Pendiente y R² para el gen de la Lectina.

Fecha	b	a	E	R ²
16/07/2014	-3,436623917	33,41092951	95,43	0,99
18/07/2014	-3,238201025	33,19106864	103,62	0,99
18/07/2014 (2)	-3,259679871	33,63481394	102,66	1,00
18/07/2014 (3)	-3,302812027	33,3211177	100,80	1,00
Media	-3,30932921	33,38948245	100,63	0,995
s	0,089014403	0,186805866	3,659191088	0,005773503

Se verifica que tanto la pendiente, como la eficiencia y el coeficiente R², cumplen los requerimientos exigidos.

b) Exactitud (veracidad y precisión). Cálculos en 7.1.1

MRC 0,1 %

Tabla 38: Resultados y cálculo de la precisión para el nivel 1 de Soja GTS-40-3-2 (0,1 %).

Fecha	Cod ADN	% Transgén	% Endógeno	% OMG
16/07/2014(3)	14/0757	0,14	82,23	0,17
	14/0758	0,12	79,65	0,15
18/07/2014	14/0757	0,12	82,69	0,14
	14/0758	0,10	80,89	0,12
18/07/2014(2)	14/0757	0,12	86,69	0,14
	14/0758	0,13	83,58	0,16
18/07/2014(3)	14/0757	0,09	74,93	0,12
	14/0758	0,10	80,84	0,12
Media		0,11	81,44	0,14
s		0,0178	3,3915	0,0186
RSDr		15,62%	4,16%	13,29%

La RSDr es menor del 25 %, por lo que se verifica que el método cumple con los requerimientos respecto a la precisión.

Tabla 39: Medias diarias en el nivel 1 de Soja GTS-40-3-2 (%)

	16/07/2014	18/07/2014
14/0757	0,170	0,132
14/0758	0,145	0,136

Estos datos se utilizarán en el cálculo de la incertidumbre.

Tabla 40: Cálculo del sesgo para el nivel 1 de Soja GTS-40-3-2 (0,1 %).

Media = c	s	Valor certificado				c-c _{MRC}	u _M	u _Δ	U _Δ	U _Δ -u _M	-25%	+25%
		c _{MRC} (%)	U (%)	k	u (%)							
0,1399	0,0186	0,10	0,05	2	0,025	0,0399	0,0093	0,0750	0,1250	0,0135	0,075	0,125

El sesgo no es significativo en este nivel de MG ya que $U_{\Delta}-u_M$ es mayor de 0, pero el valor medio no cumple el criterio $c_{MRC} * 0,75 < c < c_{MRC} * 1,25$.

MRC 1,0 %

Tabla 41: Resultados y cálculo de la precisión para el nivel 2 de Soja GTS-40-3-2 (1,0 %).

Fecha	Cod ADN	% Transgén	% Endógeno	% OMG
16/07/2014(3)	14/0759	0,89	85,22	1,05
	14/0760	0,84	80,33	1,05
18/07/2014	14/0759	0,87	92,43	0,94
	14/0760	0,81	89,90	0,90
18/07/2014(2)	14/0759	0,85	89,35	0,95
	14/0760	0,78	84,55	0,92
18/07/2014(3)	14/0759	0,77	83,49	0,92
	14/0760	0,77	82,92	0,93
Media		0,82	86,02	0,96
s		0,0473	4,1119	0,0578
RSDr		5,76%	4,78%	6,04%

La RSDr es menor del 25 %, por lo que se verifica que el método cumple con los requerimientos respecto a la precisión.

Tabla 42: Medias diarias en el nivel 2 de Soja GTS-40-3-2

	16/07/2014	18/07/2014
14/0759	1,046	0,937
14/0760	1,049	0,916

Estos datos se utilizarán en el cálculo de la incertidumbre.

Tabla 43: Cálculo del sesgo para el nivel 2 de Soja GTS-40-3-2 (1,0 %).

Media = c	s	Valor certificado				c-c _{MRC}	u _M	u _Δ	U _Δ	U _Δ -u _M	-25%	+25%
		c _{MRC} (%)	U (%)	k	u (%)							
0,9568	0,0578	1,0	0,1	2	0,05	0,0432	0,0289	0,075	0,125	0,0723	0,75	1,25

El sesgo no es significativo ya que U_Δ-u_M es mayor de 0, y el valor medido está entre ± 25% de c_{MRC}.

MRC 10,0 %

Tabla 44: Resultados y cálculo de la precisión para el nivel 3 de Soja GTS-40-3-2 (10,0 %).

Fecha	Cod ADN	% Transgén	% Endógeno	% OMG
16/07/2014(3)	14/0762	8,83	79,51	11,11
	14/0763	8,76	74,65	11,73
18/07/2014	14/0762	8,96	83,82	10,69
	14/0763	8,46	77,55	10,91
18/07/2014(2)	14/0762	8,86	80,49	11,00
	14/0763	8,61	81,16	10,61
18/07/2014(3)	14/0762	8,51	81,78	10,41
	14/0763	8,81	82,02	10,75
Media		8,73	80,12	10,90
s		0,1770	2,8829	0,4029
RSDr		2,03%	3,60%	3,70%

La RSDr es menor del 25 %, por lo que se verifica que el método cumple con los requerimientos respecto a la precisión.

Tabla 45: Medias diarias en el nivel 3 de Soja GTS-40-3-2

	16/07/2014	18/07/2014
14/0762	11,109	10,701
14/0763	11,732	10,758

Estos datos se utilizarán en el cálculo de la incertidumbre.

Tabla 46: Cálculo del sesgo para el nivel 3 de Soja GTS-40-3-2 (10,0 %).

Media = c	s	Valor certificado				c-CMRC	u _M	u _Δ	U _Δ	U _{Δ-u_M}	-25 %	+25 %
		c _{MRC} (%)	U (%)	k	u (%)							
10,9023	0,4029	10,0	0,7	2	0,35	0,9023	0,1645	0,3867	0,7734	-0,1289	7,50	12,50

El sesgo es significativo ya que $U_{\Delta-u_M}$ es menor de 0, sin embargo el método cumple con el requisito de veracidad exigido para la verificación, es decir $c_{MRC} * 0,75 < c < c_{MRC} * 1,25$.

c) LOQ

Se verifica que el LOQ es menor o igual al 0,1 % (1 g/Kg), ya que el rango es lineal y la precisión y la exactitud están dentro de los límites correctos.

d) Incertidumbre

Tabla 47: Cálculo de la Incertidumbre de medida de cuantificación de la construcción GTS-40-3-2 en extractos de ADN procedente de harina de soja

Datos del CRM		ERM-BF410dk		Soja RR			
Valor certificado		10	g/kg				
Incertidumbre U		1	g/kg		k=	2	
núm análisis	$x_{i,1}$	$x_{i,2}$	media x_i	d_i	media d_i	rad_i	media rad_i
	(g/kg)	(g/kg)	g/kg	g/kg	g/kg	%	%
1	1,704	1,322	1,513	0,382	5,622	25,23%	
2	1,451	1,356	1,403	0,095		6,74%	
3	1,704	1,356	1,530	0,348		22,72%	
4	1,451	1,322	1,386	0,129		9,29%	
5	10,464	9,368	9,916	1,096		11,05%	
6	10,487	9,162	9,825	1,325		13,49%	
7	10,464	9,162	9,813	1,302		13,26%	8,23%
8	10,487	9,368	9,928	1,119		11,28%	
9							
10							
11							
12	111,094	107,013	109,054	4,081		3,74%	
13	117,320	107,578	112,449	9,742		8,66%	
14	111,094	107,578	109,336	3,516		3,22%	
15	117,320	107,013	112,166	10,307		9,19%	

u_0

$d_2 = 1,128$

$u_0 = s_R = 0,498444366 \text{ g/kg}$

RSU

$d_2 = 1,128$

$RSD_R = 7,291669578 \%$

$n_t = 2$ n° de replicados de extracción para estimar la incertidumbre

$u_{CRM} = 0,5 \text{ g/kg}$

$x_{CRM} = 10 \text{ g/kg}$

$u_{biasr} = 7,1822157 \%$

$RSU = 10,2348751 \%$

Por tanto:

$u = [u_0^2 + (c * RSU)^2]^{1/2}$ (Ecuación 17) = $[0,498^2 + (c \times 10,2349/100)^2]^{1/2}$, que en el límite legal de etiquetado (9 g/kg) supone: $U = \pm 2,1 \text{ g/Kg}$

e) Gráfico de control

Tabla 48: Datos de partida para el establecimiento de grafica de control en el nivel 2 de soja GTS-40-3-2

Fecha	Cod ADN	Resultados (g/kg)			
16/07/2014	14/0759	1	10,5	media	9,6
	14/0760	2	10,5	s	0,6
18/07/2014	14/0759	3	9,4	u_m	0,2
	14/0760	4	9,0	ccrm	10,0
8/07/2014(2)	14/0759	5	9,5	U_{CRM}	1,0
	14/0760	6	9,2	k	2,00
8/07/2014(3)	14/0759	7	9,2	u_{CRM}	0,5
	14/0760	8	9,3	u_c	0,8

Una vez calculado u_c , se establecen los límites aviso en $\pm 2 u_c$ y el de control en $\pm 3 u_c$

Tabla 49: Límites de aviso y control

media	- 2 s	- 3 s	+ 2 s	+3 s
10,0	8,5	7,7	11,5	12,3

El gráfico de Shewhart se muestra a continuación:

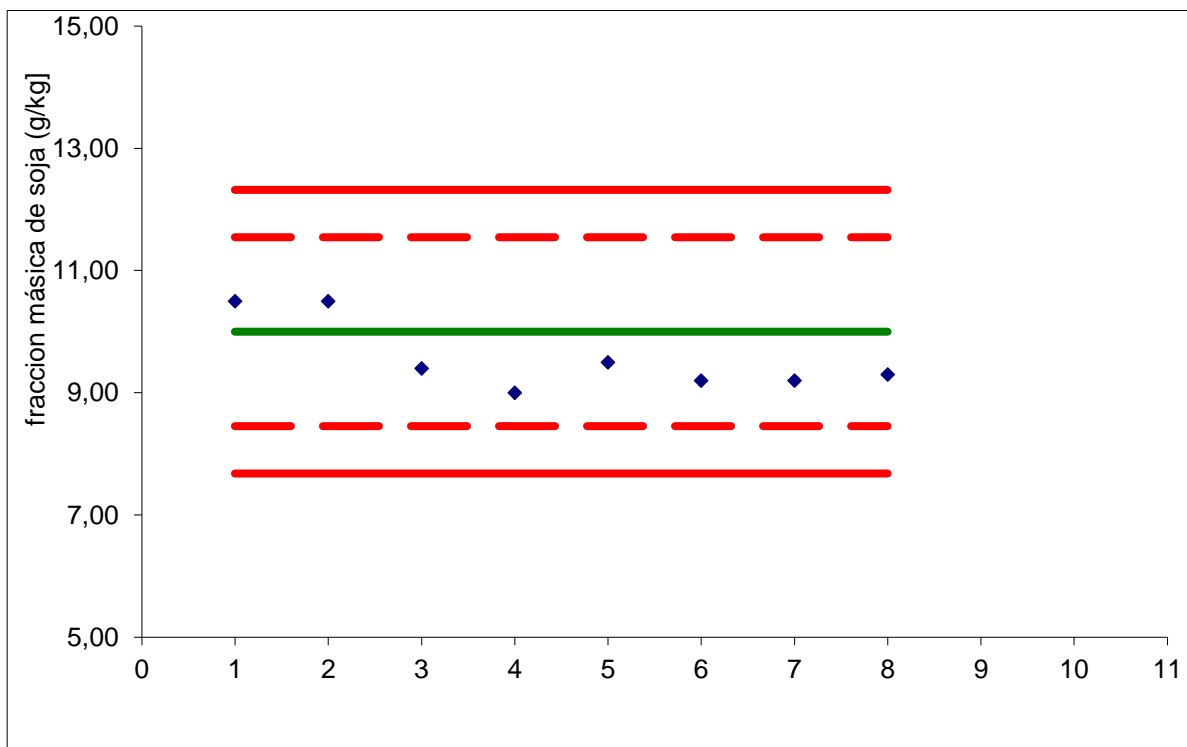


Figura 5: Gráfico de control para la soja GTS-40-3-2 en el nivel 2 (1,0 %)

4.3.2. Evento MON810

Los cuatro ensayos se realizaron en 2 jornadas, ya que en una no da tiempo material, por el mismo operario (1), empleando el mismo patrón y los mismos reactivos.

Se utilizaron nuevos extractos de ADN procedentes de MRC ERM-BF-410ak (< 0,9 %), mezcla de extractos MRC ERM-BF-410ek (1,98 ± 0,15 %) y MRC ERM-BF-410gk (9,9 ± 0,5 %) y extracto de mezcla de harinas MRC ERM-BF-410ak (< 0,9 %) y MRC ERM-BF-410ck (4,9 ± 1,0 %) (ver apartado 3.2.1)

Tabla 50: Diseño de la placa para la cuantificación del evento MON810 en extractos de ADN procedente de harina de maíz.

	ADH		Maíz MON810		Maíz MON810		ADH	
	1	2	3	4	5	6	7	8
a	P10	P10	P10	P10	14/0446	14/0446	14/0446	14/0446
b	P10/2	P10/2	P10/2	P10/2	14/0447	14/0447	14/0447	14/0447
c	P10/5	P10/5	P10/5	P10/5	RFIP-004-001	RFIP-004-001	RFIP-004-001	RFIP-004-001
d	P10/20	P10/20	P10/20	P10/20	RFIP-004-002	RFIP-004-002	RFIP-004-002	RFIP-004-002
e	P10/200	P10/200	P10/200	P10/200	14/0662	14/0662	14/0662	14/0662
f	C(-)	C(-)	C(-)	C(-)	14/0663	14/0663	14/0663	14/0663
				Total Muestras:	6			

P10: Patrón de calibración (ADN extraído de MRC maíz MON810 10 %)

P10/2: Dilución 1:2 de P10 (5 % maíz MON810 y 50 % ADH)

P10/5: Dilución 1:5 de P10 (2 % maíz MON810 y 20 % ADH)

P10/20: Dilución 1:20 de P10 (0,5 % maíz MON810 y 5 % ADH)

P10/200: Dilución 1:200 de P10 (0,05 % maíz MON810 y 0.05 % ADH)

C (-): control negativo de amplificación

14/0446 y 14/0447: ADN extraído de mezcla de harinas de maíz MON810 0,05 %

RFIP-004-001 y RFIP-004-002: ADN mezclado de extractos de MRC maíz MON810 1.98 y 0 %

14/0662 y 14/0663: ADN extraído de MRC maíz MON810 10,0 %

Resultados (Ct)

05/08/2014

Tabla 51: Valores de Ct obtenidos en la cuantificación del evento MON810 en extractos de ADN procedente de harina de maíz. (05/08/14).

	Endogeno		Transgén				Endogeno	
	1	2	3	4	5	6	7	8
a	23,96867371	24,0209713	30,10297966	30,07102776	37,89268494	37,37928391	24,0779953	24,01503372
b	24,76062965	24,73088646	31,0202179	31,0496769	37,73744965	37,26139069	23,98807907	24,05558586
c	25,96554756	25,88322258	32,39388275	32,27229691	33,44714355	33,47013855	23,93777657	24,12689209
d	27,9535923	27,82606316	34,27865601	34,3972435	33,47203827	33,47714615	23,98276329	24,03752327
e	31,11622429	31,00729942	38,31968307	38,29552841	30,2098217	30,14968491	24,00336838	24,06220055
f	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	29,98997498	30,13673019	23,96372604	23,96817017

Verificación de un procedimiento de ensayo para la detección y cuantificación de Organismos Manipulados Genéticamente.

05/08/2014(2)

Tabla 52: Valores de Ct obtenidos en la cuantificación del evento MON810 en extractos de ADN procedente de harina de maíz. (05/08/14-2).

	Endogeno		Transgén				Endogeno	
	1	2	3	4	5	6	7	8
a	23,61297226	23,60725975	29,97688675	29,98420143	36,75608826	37,7122879	23,80276108	23,80154991
b	24,28644371	24,35924339	30,98446846	30,97539139	37,36212158	37,06752014	23,54892159	23,78726196
c	25,6046257	25,59256554	32,3694725	32,27230453	33,38557053	33,45075226	23,54276848	23,7703228
d	27,88277817	27,6319046	34,19511795	34,30101395	33,55333328	33,2325058	23,75368118	23,66601753
e	30,95498085	30,77528954	37,39163208	38,17670822	29,94925499	30,04066467	23,56317329	23,68543243
f	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	29,98735428	29,92984962	23,48367119	23,55221176

11/08/14

Tabla 53: Valores de Ct obtenidos en la cuantificación del evento MON810 en extractos de ADN procedente de harina de maíz. (11/08/14).

	Endogeno		Transgén				Endogeno	
	1	2	3	4	5	6	7	8
a	23,81208992	23,91716766	30,39108086	30,4005127	37,90171432	37,5484848	23,98893547	23,93561935
b	24,58663368	24,69184113	31,312603	31,46332932	38,1693306	37,23843384	23,90939903	23,97653961
c	25,94755936	25,94244957	32,52926254	32,50262451	34,16623688	33,89738464	23,92813683	23,81165314
d	27,89572525	27,84167671	34,82605743	34,82197571	33,94982147	33,92326355	23,9947834	23,78121567
e	31,65780449	31,29640388	38,23626709	38,26665497	30,56830978	30,42339516	23,88616753	23,82812309
f	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	30,28800964	30,42268372	23,75224304	23,86716652

11/08/14 (2)

Tabla 54: Valores de Ct obtenidos en la cuantificación del evento MON810 en extractos de ADN procedente de harina de maíz. (11/08/14-2).

	Endogeno		Transgén				Endogeno	
	1	2	3	4	5	6	7	8
a	23,98592949	24,09838676	30,36574364	30,34398842	38,44248199	36,99424744	24,17626762	24,29900742
b	24,74277878	24,77847862	31,25158691	31,30865097	36,92289352	36,86018753	23,94699097	24,24293137
c	26,1033268	25,9433136	32,61202621	32,52700806	33,74356842	33,76192474	24,01469612	24,23099709
d	28,11282921	28,06846809	34,41244507	34,43157196	33,70544434	33,68916321	24,16858101	24,12067604
e	31,58109283	31,41521454	37,97057343	38,9133873	30,37249565	30,42055321	24,00436783	24,13036346
f	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined	30,43966675	30,3819294	23,98872757	23,97533226

a) Rango lineal, Eficiencia, Pendiente y R². Cálculos en 7.2.3

Transgén

Tabla 55: Rango lineal, Eficiencia, Pendiente y R² para la construcción Maíz MON810.

Fecha	b	a	E	R ²
05/08/2014	-3,567600235	33,50405746	90,68	1,00
05/08/2014(2)	-3,380825395	33,33179286	97,60	1,00
11/08/2014	-3,43673985	33,74856007	95,42	1,00
11/08/2014(2)	-3,497575368	33,69206323	93,16	0,99
Media	-3,470685212	33,56911841	94,21	0,9975
s	0,080296693	0,189623381	2,974320106	0,005

Se verifica que tanto la pendiente, como la eficiencia y el coeficiente R², cumplen los requerimientos exigidos.

Endógeno:

Tabla 56: Rango lineal, Eficiencia, Pendiente y R² para el gen de la ADH.

Fecha	b	a	E	R ²
05/08/2014	-3,106411408	30,07695553	109,85	1,00
05/08/2014(2)	-3,216380193	29,90317182	104,60	1,00
11/08/2014	-3,330570646	30,35457927	99,64	1,00
11/08/2014(2)	-3,287820766	30,43247372	101,44	1,00
Media	-3,235295753	30,19179509	103,88	1
s	0,097988358	0,245571724	4,476056276	0

Se verifica que tanto la pendiente, como la eficiencia y el coeficiente R², cumplen los requerimientos exigidos.

b) Exactitud (veracidad y precisión). Cálculos en 7.1.2

MRC 0,05 %

Tabla 57: Resultados y cálculo de la precisión para el nivel 1 de Maíz MON810 (0,05 %).

Fecha	Cod ADN	% Transgén	% Endógeno	% OMG
05/08/2014	14/0446	0,07	87,14	0,08
	14/0447	0,08	88,75	0,09
05/08/2014(2)	14/0446	0,07	78,50	0,10
	14/0447	0,07	86,71	0,08
11/08/2014	14/0446	0,07	82,55	0,09
	14/0447	0,07	83,66	0,09
11/08/2014(2)	14/0446	0,08	76,33	0,11
	14/0447	0,12	84,71	0,15
Media		0,08	83,54	0,10
s		0,0180	4,3059	0,0217
RSDr		22,31%	5,15%	22,42%

La RSDr es menor del 25 %, por lo que se verifica que el método cumple con los requerimientos respecto a la precisión.

Tabla 58: Medias diarias en el nivel 1 de maíz MON810 (%)

	05/08/14	11/08/14
14/0446	0,088	0,096
14/0447	0,085	0,118

Estos datos se utilizarán en el cálculo de la incertidumbre.

Tabla 59: Cálculo del sesgo para el nivel 1 de Maíz MON810 (0,05 %).

Media = c	s	Valor certificado				c-CMRC	u _M	u _Δ	U _Δ	U _Δ -u _M	-25 %	+25 %
		CMRC (%)	U (%)	k	u (%)							
0,0968	0,0217	0,0492	0,0549	2,0000	0,0275	0,0476	0,0077	0,0285	0,0570	0,0094	0,0369	0,0615

El sesgo no es significativo en este nivel de MG ya que U_Δ-u_M es mayor de 0, pero está muy próximo al límite, ya que todos los resultados están por encima del valor certificado y por encima del intervalo de ± 25 % de CMRC.

MRC 1,0 %

Tabla 60: Resultados y cálculo de la precisión para el nivel 2 de Maíz MON810 (1,0 %).

Fecha	Cod ADN	% Transgén	% Endógeno	% OMG
05/08/2014	RFIP-004-001	1,03	88,25	1,17
	RFIP-004-002	1,02	89,51	1,14
05/08/2014(2)	RFIP-004-001	0,94	87,40	1,08
	RFIP-004-002	0,97	83,90	1,15
11/08/2014	RFIP-004-001	0,83	88,03	0,94
	RFIP-004-002	0,88	87,11	1,01
11/08/2014(2)	RFIP-004-001	0,96	82,87	1,16
	RFIP-004-002	1,00	81,39	1,23
Media		0,95	86,06	1,11
s		0,0684	2,9310	0,0927
RSDr		7,17%	3,41%	8,34%

La RSDr es menor del 25 %, por lo que se verifica que el método cumple con los requerimientos respecto a la precisión.

Tabla 61: Medias diarias en el nivel 2 de maíz MON810 (%)

	05/08/14	11/08/14
RFIP-004-001	1,124	1,053
RFIP-004-002	1,145	1,120

Estos datos se utilizarán en el cálculo de la incertidumbre.

Tabla 62: Cálculo del sesgo para el nivel 2 de Maíz MON810 (1,0 %).

Media = c	s	Valor certificado				c-CMRC	u _M	u _Δ	U _Δ	U _{Δ-u_M}	-25 %	+25 %
		^c MRC (%)	U (%)	k	u (%)							
1,1104	0,0927	1,0000	0,1300	2,0000	0,0650	0,1104	0,0328	0,0728	0,1456	0,0351	0,75	1,25

El sesgo no es significativo ya que $U_{\Delta-u_M}$ es mayor de 0, y se cumple el requerimiento de estar en $\pm 25 \%$ ^cMRC.

MRC 10,0 %

Tabla 63: Resultados y cálculo de la precisión para el nivel 3 de Maíz MON810 (10,0 %).

Fecha	Cod ADN	% Transgén	% Endógeno	% OMG
05/08/2014	14/0662	8,50	88,03	9,66
	14/0663	9,17	92,47	9,92
05/08/2014(2)	14/0662	9,62	89,22	10,78
	14/0663	9,86	96,20	10,24
11/08/2014	14/0662	8,82	88,76	9,94
	14/0663	9,69	91,76	10,56
11/08/2014(2)	14/0662	8,59	85,98	9,99
	14/0663	8,51	91,17	9,33
Media		9,09	90,45	10,05
s		0,5660	3,1537	0,4687
RSDr		6,22%	3,49%	4,66%

La RSDr es menor del 25 %, por lo que se verifica que el método cumple con los requerimientos respecto a la precisión.

Tabla 64: Medias diarias en el nivel 3 de maíz MON810 (%)

	05/08/14	11/08/14
14/0662	10,218	9,966
14/0663	10,080	9,948

Estos datos se utilizarán en el cálculo de la incertidumbre.

Tabla 65: Cálculo del sesgo para el nivel 3 de Maíz MON810 (10,0 %).

Media = c	s	Valor certificado				c-CMRC	u _M	u _Δ	U _Δ	U _{Δ-u_M}	-25 %	+25 %
		^c MRC (%)	U (%)	k	u (%)							
10,0529	0,4687	9,9000	0,5000	2,0000	0,2500	0,1529	0,1657	7,50	12,50	0,4470	7,425	12,375

El sesgo no es significativo ya que U_{Δ-u_M} es mayor de 0 y todos los valores están en el intervalo de ± 25 % ^cMRC.

c) LOQ

Se verifica que el LOQ es menor o igual al 0,05 % (0,5 g/kg), ya que el rango es lineal y la precisión y la exactitud están dentro de los límites correctos.

d) Incertidumbre

Tabla 66: Cálculo de la Incertidumbre de medida MON810

Datos del CRM			RFIP-004			Maíz MON810	
Valor certificado			10	g/kg			
Incertidumbre U			1,3	g/kg		k=	2
núm análisis	$x_{i,1}$	$x_{i,2}$	media x_i	d_i	media d_i	rad_i	media rad_i
	(g/kg)	(g/kg)	g/kg	g/kg	g/kg	%	%
1	0,884	0,956	0,920	0,072	0,2937	7,86%	2,73%
2	0,853	1,179	1,016	0,326		32,11%	
3	0,884	1,179	1,032	0,296		28,65%	
4	0,853	0,956	0,904	0,103		11,39%	
5	11,239	10,530	10,884	0,709		6,51%	
6	11,452	11,196	11,324	0,256		2,26%	
7	11,239	11,196	11,217	0,042		0,38%	
8	11,452	10,530	10,991	0,923		8,39%	
9							
10							
11							
12	102,177	99,657	100,917	2,520		2,50%	
13	100,801	99,481	100,141	1,320		1,32%	
14	102,177	99,481	100,829	2,696		2,67%	
15	100,801	99,657	100,229	1,144		1,14%	

u_0

$d_2 = 1,128$

$u_0 = s_R = 0,26032976$

RSU

$d_2 = 1,128$

$RSD_R = 2,423176805$

$s_t =$

$n_t = 2$

$u_{CRM} = 0,65$

$x_{CRM} = 10$

$u_{biasr} = 6,722045293$

$RSU = 7,145465607$

Por tanto:

$u = [u_0^2 + (c * RSU)^2]^{1/2}$ (Ecuación 17) = $[0,26033^2 + (c * 7,145466/100)^2]^{1/2}$, que en el valor del límite legal (9 g/kg) supone: $U = \pm 1,4$ g/kg

e) Gráfico de control

Tabla 67: Datos de partida para el establecimiento de grafica de control en el nivel 2 de maíz MON810

Fecha	Cod ADN	Resultados			
05/08/2014	RFIP-004-001	1	11,7	media	11,1
	RFIP-004-002	2	11,4	s	0,9
05/08/2014(2)	RFIP-004-001	3	10,8	u _m	0,3
	RFIP-004-002	4	11,5	c _{CRM}	10,0
11/08/2014	RFIP-004-001	5	9,4	U _{CRM}	1,3
	RFIP-004-002	6	10,1	k	2,00
1/08/2014(2)	RFIP-004-001	7	11,6	u _{CRM}	0,7
	RFIP-004-002	8	12,3	u _c	1,13

Una vez calculado u_c, se establecen los límites aviso en $\pm 2 u_c$ y el de control en $\pm 3 u_c$

Tabla 68: Límites de aviso y control

media	- 2 s	- 3 s	+ 2 s	+3 s
10,00	7,7	6,6	12,3	13,4

El gráfico de Shewhart se muestra a continuación:

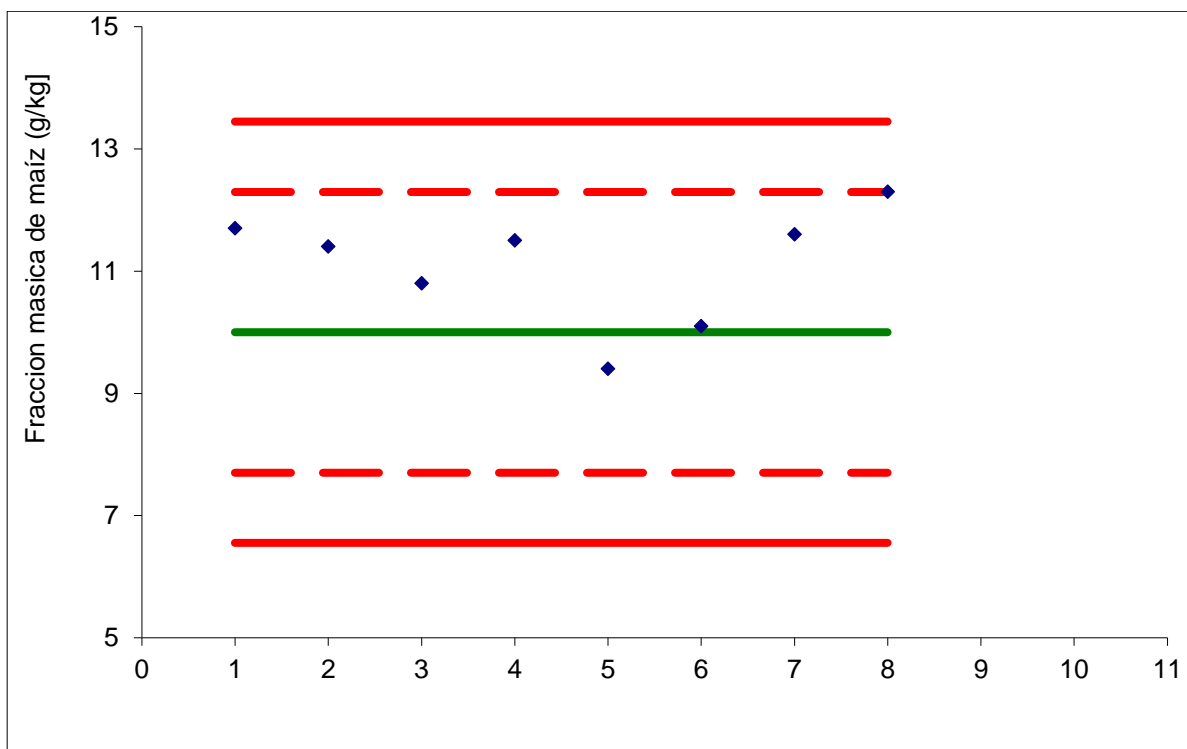


Figura 6: Gráfico de control para el maíz en el nivel 2 (1,0 %)

5. Conclusiones.

1.- La metodología de extracción y purificación de ADN mediante el kit DNAsy Mericon Food de Qiagen cumple con los criterios de cantidad de ADN y ausencia de inhibidores, en las siguientes matrices:

- Granos de maíz y sus harinas.
- Habas de soja y sus harinas.

2.- Se verifica que los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección y cuantificación de determinados OMG, en extractos de ADN procedentes de las matrices anteriormente citadas cumplen los siguientes requisitos:

- Métodos cualitativos:

- Detección del Promotor P35S: Límite de detección: 0,5 g/kg
- Detección del Terminador T-NOS: Límite de detección: 0,5 g/kg
- Detección de la construcción GTS-40-3-2: Límite de detección: 0,5 g/kg
- Detección del evento MON810: Límite de detección: 0,5 g/kg

- Métodos cuantitativos:

- Cuantificación relativa de la construcción GTS-40-3-2: Rango dinámico de 1-100 g/kg
- Cuantificación relativa del evento MON810: Rango dinámico de 0,5-100 g/kg

3.- La incertidumbre de medida en los métodos cuantitativos queda establecida provisionalmente para el límite legal de etiquetado (9 g/kg) en:

- Cuantificación relativa de la construcción GTS-40-3-2: $\pm 2,1$ g/kg
- Cuantificación relativa del evento MON810: $\pm 1,4$ g/kg

4.- El control de calidad en base a gráficas de control se establece provisionalmente como sigue:

- Cuantificación relativa de la construcción GTS-40-3-2:
 - Límites de aviso: 8,5-11,5 g/kg.
 - Límites de aceptación: 7,7-12,3 g/kg
- Cuantificación relativa del evento MON810: $\pm 1,4$ g/kg
 - Límites de aviso: 7,7-12,3 g/kg.
 - Límites de aceptación: 6,6-13,4 g/kg

6. Bibliografía.

- AECOSAN, & MAGRAMA. (2014). PLAN NACIONAL DE CONTROL OFICIAL DE LA CADENA ALIMENTARIA (Versión 4-2014) 2011 – 2015. Recuperado el 10 de Agosto de 2014, de http://www.magrama.gob.es/es/ministerio/planes-estrategias/plan-nacional-de-control-de-la-cadena-alimentaria/PNCOCA-2011-2015_V_4_2014_Def_tcm7-318510.pdf
- AgBIO. (2006). EVALUACIÓN DE RIESGO DE LOS CULTIVOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS. Parte III: Descripción de 12 eventos seleccionados. (C. A. ArgenBio, Trad.) Buenos Aires, Argentina. Recuperado el 14 de julio de 2014, de <http://www.argenbio.org/ad/uploads/pdf/12%20events.pdf>
- BIOAL. (2013). Como evaluar la presencia de OGM de forma fiable. Perú: Laboratorio de Análisis Biomoleculares.
- BVL. (2014). screening_tabelle_gvoNachweis.xlsx. Alemania: Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. Recuperado el junio de 2014, de http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/09_Untersuchungen/screening_tabelle_gvoNachweis.xls?__blob=publicationFile
- CAC/GL 74-2010. (2010). 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. *Codex Alimentarius*. Recuperado el 2 de Agosto de 2014, de http://www.codexalimentarius.org/download/standards/11667/CXG_074f.pdf
- Didenko, V. (2001). DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *Biotechniques*, 31(5):1106-16, 1118, 1120-1.
- ENAC. (Julio de 2005). Guía para la expresión de la incertidumbre en los ensayos cuantitativos. *G-ENAC-09 Rev. 1*. Recuperado el 4 de Agosto de 2014, de <https://www.enac.es/documents/7020/7a74c65a-199b-463e-adbf-b23f941c2a38>
- ENAC. (Octubre de 2009). Criterios generales para la acreditación de laboratorios de ensayo y calibración según norma UNE-EN ISO/IEC 17025. *CGA-ENAC-LEC Rev. 5*. Recuperado el 17 de Julio de 2014, de <http://www.enac.es/documents/7020/b7e24234-daba-4a62-9652-76eb7e96db30>
- ENAC. (Febrero de 2011). Laboratorios de referencia en el sector agroalimentario: Política sobre participación en el sistema de acreditación. *NT-55 Rev. 1*. ENAC. Recuperado el 17 de Julio de 2014, de <https://www.enac.es/documents/enac/Documentos/Notas/NT%2055.pdf>
- ENGL. (2008). Definition of minimum performance requirements (MPR) for analytical methods of GMO testing. Recuperado el 14 de Julio de 2014, de http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/Min_Perf_Requirements_Analytical_methods.pdf
- ENGL. (2010). *CONSORTIUM AGREEMENT N. CA31364*. Recuperado el 9 de Agosto de 2014, de http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/engl/docs/2009-12-05%20Annex%20to%20CAII%20ENGL%20Article%209.3%20List_V4.pdf
- ERM, & Corbisier, P. (2007). ERM Application Note 5. Uso de materiales de referencia certificados para la cuantificación de OMG respecto al cociente del número de copias de ADN. Recuperado el 4 de Agosto de 2014, de http://www.erm-crm.org/ERM_products/application_notes/application_note_5/Documents/application_note_5_spanish.pdf
- ERM, & Linsinger, T. (2005). Application Note 1. Comparación del resultado de una medida con el valor certificado. Recuperado el 3 de Agosto de 2014, de <http://www.erm->

Verificación de un procedimiento de ensayo para la detección y cuantificación de Organismos Manipulados Genéticamente.

- crm.org/ERM_products/application_notes/application_note_1/Documents/erm_application_note_1_spanish_rev3.pdf
- ERM, & Trapmann, S. (2006). ERM Application Note 4. Uso de materiales de referencia certificados para la cuantificación de OMG en alimentos y piensos. Recuperado el 3 de Agosto de 2014, de http://www.erm-crm.org/ERM_products/application_notes/application_note_4/Documents/application_note_4_spanish.pdf
- ERM, Broothaerts, W., & et al. (2009). Certification of Reference Materials of Maize Seed Powder containing Genetically Modified MON 810 Maize. *CERTIFICATION REPORT*. Recuperado el 3 de Agosto de 2014, de https://irmm.jrc.ec.europa.eu/refmat_pdf/ERM-BF413k_report.pdf
- ERM, Trapmann, S., & et al. (2008). Certification of reference materials of soya seed powder with different mass fractions of genetically modified Roundup Ready® soya. *CERTIFICATION REPORT*. Recuperado el 3 de Agosto de 2014, de https://irmm.jrc.ec.europa.eu/refmat_pdf/ERM-BF410k_report.pdf
- ESPAÑA. (2003). LEY 9/2003, de 25 de abril, por la que se establece el régimen jurídico de la utilización confinada, liberación voluntaria y comercialización de organismos modificados genéticamente. *B.O.E.(100)*, 16214-16223.
- ESPAÑA. (2004). Real Decreto 178/2004, de 30 de enero, por el que se aprueba el Reglamento general para el desarrollo y ejecución de la Ley 9/2003, de 25 de abril, por la que se establece el régimen jurídico de la utilización confinada, liberación voluntaria y comerciali. *B.O.E. (TEXTO CONSOLIDADO Última modificación: 28 de marzo de 2013)(27)*, 4171-4216.
- ESPAÑA. (2011). Ley 17/2011, de 5 de julio, de seguridad alimentaria y nutrición. *B.O.E.(160)*, 71283-71319.
- ESPAÑA. (2011). Resolución de la Dirección General de Recursos Agrícolas y Ganaderos por la que se establece el protocolo del Plan de Control, Muestreo y Análisis de Maíz, Algodón y Soja para la detección de la presencia de OGM.
- FVO. (2012). INFORME FINAL DE UNA AUDITORÍA EFECTUADA EN ESPAÑA DEL 21 AL 30 DE NOVIEMBRE DE 2011 CON EL FIN DE EVALUAR LOS CONTROLES OFICIALES DE LOS ORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE, INCLUIDA SU LIBERACIÓN INTENCIONAL EN EL MEDIO AMBIENTE. COMISIÓN EUROPEA, DIRECCIÓN GENERAL DE SALUD Y CONSUMIDORES, Dirección F. Oficina Alimentaria y Veterinaria. Recuperado el 10 de Agosto de 2014, de http://ec.europa.eu/food/fvo/act_getPDF.cfm?PDF_ID=9949
- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., Gelfand, D. H., & Cetus corporation. (15 de AGOSTO de 1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 88(16), 7276-7280. Recuperado el 10 de Agosto de 2014, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC52277/pdf/pnas01066-0386.pdf>
- Instituto de Salud Pública. (2010). Guía Técnica de Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: Aspectos generales sobre la validación de métodos. Santiago, Chile. Recuperado el 3 de Agosto de 2014, de <http://www.ispch.cl/content/guia-tecnica-de-validacion-de-metodos-y-determinacion-de-la-incertidumbre-de-la-medicion>
- JCGM 100:. (2008). Evaluación de datos de medición. Guía para la Expresión de la Incertidumbre de Medida. *JCGM 100:2008. GUM 1995 con ligeras correcciones*. (C. E. Metrología, Trad.)

- Recuperado el 4 de Agosto de 2014, de <http://www.cem.es/sites/default/files/gum20digital1202010.pdf>
- JRC. (2002). Review of GMO Detection and Quantification Techniques. Recuperado el 4 de Agosto de 2014, de https://www.google.es/url?sa=t&rct=j&q=&src=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CCcQFjAA&url=http%3A%2F%2Fbookshop.europa.eu%2Fel%2Freview-of-gmo-detection-and-quantification-techniques-pbEUNA20384%2Fdownloads%2FEU-NA-20-384-EN-C%2FEUNA20384ENC_001.pdf
- JRC. (2004a). Validation of the GMO specific detection method developed by NVI/INRA for Bt11 in sweet maize. Recuperado el 4 de Agosto de 2014, de <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/CRL%20Bt11%20Sweet%20maize%20validation%20report.pdf>
- JRC. (2004b). GMO specific real-time PCR system - Protocol for event-specific quantitation of Bt11 in maize. Recuperado el 4 de Agosto de 2014, de <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/Bt11-protocol.pdf>
- JRC. (2005). Validation of the GMO specific detection method developed by NVI/INRA for Bt11 in sweet corn maize. Recuperado el 4 de Agosto de 2014, de http://bookshop.europa.eu/is-bin/INTERSHOP.enfinity/WFS/EU-Bookshop-Site/en_GB/-/EUR/ViewPublication-Start?PublicationKey=LBNA21829
- JRC. (2006). CRL assessment on the validation of an event specific method for the relative quantitation of maize line MON 810 DNA using real-time PCR as carried out by Federal Institute for Risk Assessment (BfR). Recuperado el 4 de Agosto de 2014, de http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/Mon810_validation_report.pdf
- JRC. (2007a). Event-specific Method for the Quantification of Soybean Line 40-3-2 Using Real-time PCR - Validation Report. Recuperado el 4 de Agosto de 2014, de http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/40-3-2_val_report.pdf
- JRC. (2007b). Report on the Validation of a DNA Extraction Method for Soybean Seeds. Recuperado el 4 de Agosto de 2014, de http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/40-3-2_DNAExtr_report.pdf
- JRC. (2007c). Maize Seeds Sampling and DNA Extraction Report on the Validation of a DNA Extraction Method from Maize Seeds. Recuperado el 4 de Agosto de 2014, de http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/MON810_CRLVL_25_04_verification_report_.pdf
- JRC. (2009a). Event-specific Method for the Quantification of Soybean Line 40-3-2 Using Real-time PCR - Protocol. Recuperado el 4 de Agosto de 2014, de http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/40-3-2_validated_Method.pdf
- JRC. (2009b). Report on the Verification of the Performance of a MON 810 Event-specific Method on Maize Line MON 810 Using Real-time PCR. Recuperado el 3 de Agosto de 2014, de http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/MON810_CRLVL_25_04_verification_report_.pdf
- JRC. (2011). Compendium of reference methods for GMO analysis. *JRC Reference Reports*. Luxemburgo. Recuperado el 30 de Julio de 2014, de http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/docs/GMO-JRC_Reference_Report_2011.pdf
- JRC, Bonfimi, L., & et al. (2007). Analytes and related PCR primers used for GMO detection and quantification. *JRC Scientifics and Technicals Reports*. Luxemburgo. Recuperado el 4 de Agosto de 2014, de <http://bookshop.europa.eu/es/analytes-and-related-pcr-primers-used-for-gmo-detection-and-quantification-pbLBNA23059/>

Verificación de un procedimiento de ensayo para la detección y cuantificación de Organismos Manipulados Genéticamente.

- JRC, Trapman, S., & et al. (2009). Guidance document on measurement uncertainty for GMO testing laboratories. *JRC Scientific and Technical reports*. Luxemburgo. Recuperado el 14 de Julio de 2014, de <https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/eur22756en.pdf>
- JRC, Trapman, S., & et al. (2011). Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods. *JRC Scientific and Technical reports*. Luxemburgo. Recuperado el 14 de Julio de 2014, de <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/ENGL%20MV%20WG%20Report%20July%202011.pdf>
- JRC, Trapman, S., & et al. (2014). European technical guidance document for the flexible scope accreditation of laboratories quantifying GMOs. *JRC Technical Reports*. Geel. Recuperado el 14 de Julio de 2014, de <http://www.european-accreditation.org/publication/jrc-scientific-and-policy-reports-guidance-iso-iec-17025-2013>
- MAPA, AESAN, & FIAB. (2004). Guía de aplicación de las exigencias de etiquetado y trazabilidad de alimentos y piensos modificados genéticamente. Federación Española de Industrias de Alimentación y Bebidas. Recuperado el 10 de Agosto de 2014, de http://www.fiab.es/es/zonadescargas/da/GUIA_OGMs.pdf
- Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. (s.f.). Lista de Laboratorios Oficiales Autorizados para el Análisis de Piensos e Ingredientes para Alimentación Animal. Recuperado el 9 de Agosto de 2014, de <http://cexgan.magrama.es/Documentos/laboPiensosArgelia.pdf>
- MOENS, W. e. (2005). *SCIENTIFIC SUPPORT PLAN FOR A SUSTAINABLE DEVELOPMENT POLICY (SPSD II). Part 1: Sustainable production and consumption patterns. Tracing and authentication of GMOs and derived products in the food-processing area CP/32*. Brussels: Belgian Science Policy.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., & Cetus corporation. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, 263-73. Recuperado el 10 de Agosto de 2014, de <http://www.labtrade.com.br/blog/wp-content/uploads/2012/04/mullis86.pdf>
- NAVARRA. (1998). DECRETO FORAL 204/1998, de 22 de junio, por el que se asignan al Departamento de Medio Ambiente, Ordenación del Territorio y Vivienda las funciones relacionadas con la utilización confinada y liberación voluntaria de organismos modificados genéticamente. *B.O.N.(87)*, 5170.
- Navarra. (9 de Agosto de 2014). www.navarra.es. Obtenido de http://www.navarra.es/home_es/Navarra/Instituciones/Otras+Instituciones+y+entidades/Laboratorios+publicos/Villava/
- Nordtest project 1589-02. (2012). Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories. *NT TECHN REPORT 537*. Recuperado el 4 de Agosto de 2014, de <http://www.nordtest.info/index.php/technical-reports/item/handbook-for-calculation-of-measurement-uncertainty-in-environmental-laboratories-nt-tr-537-edition-3.html>
- OGT. (2011). Understanding and measuring variations in DNA sample quality. Oxford Gene Technology. Recuperado el 10 de Agosto de 2014, de http://www.ogt.co.uk/resources/literature/483_understanding_and_measuring_variations_in_dna_sample_quality
- Papazova, N., Roosens, N., & Taverniers, I. (2013). Harmonised approaches for validation of methods for GMO detection in the NRL according to the last EU guidelines. *Labinfo, Newsletter for the approved food safety laboratories*, 13-17. Bruselas: FASFC, Belgian Federal Agency Safety of

Verificación de un procedimiento de ensayo para la detección y cuantificación de Organismos Manipulados Genéticamente.

- Food Chain . Recuperado el 17 de Julio de 2014, de http://www.afsca.be/laboratories/labinfo/_documents/2013-07_labinfo10-p13_en.pdf
- Reiting, R., & et al. (Mayo de 2007). Collaborative Study of a T-nos Real-Time PCR Method for Screening of Genetically Modified Organisms in Food Products. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 2(2), 116-121. doi:10.1007/s00003-007-0189-4
- Sundquist, T. (2005). Your Key to Real-Time Quantitative PCR. *Promega Corporation Web site*. Recuperado el 10 de Agosto de 2014, de <http://www.promega.es/resources/pubhub/enotes/your-key-to-real-time-quantitative-pcr/>
- Terrón, M. (Junio de 2008). TÉCNICAS MOLECULARES EN LA DETECCIÓN DE ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS EN LOS ALIMENTOS. Aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa. *Curso de Experto Universitario en "Biotecnología aplicada a los alimentos"*. España: UNED. Recuperado el 2 de 2014, de <http://www.uned.es/experto-biotecnologia-alimentos/TrabajosSelecc/MartaTerron.pdf>
- Thermo Scientific. (2010). Assessment of Nucleic Acid Purity. *T042-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers*. Recuperado el 3 de Agosto de 2014, de <http://www.nanodrop.com/Library/T042-NanoDrop-Spectrophotometers-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>
- UNE 66.006.74. (1974). Manual del control de calidad durante la fabricación basado en el sistema del gráfico de control. Madrid: IRANOR.
- UNE 82009-1. (1998). Exactitud (veracidad y precisión) de resultados y métodos de medición. Parte 1: Principios generales y definiciones. Madrid: AENOR.
- UNE 82009-2. (1999). Exactitud (veracidad y precisión) de resultados y métodos de medición. Parte 2: Método básico para la determinación de la repetibilidad y la reproducibilidad de un método de medición normalizado. Madrid: AENOR.
- UNE 82009-3. (1999). Exactitud (veracidad y precisión) de resultados y métodos de medición. Parte 3: Medidas intermedias de la precisión de un método de medición normalizado. Madrid: AENOR.
- UNE 82009-4. (1999). Exactitud (veracidad y precisión) de resultados y métodos de medición. Parte 4: Métodos básicos para la determinación de la veracidad de un método de medición normalizado . Madrid: AENOR.
- UNE 82009-5. (1999). Exactitud (veracidad y precisión) de resultados y métodos de medición. Parte 5: Métodos alternativos para la determinación de la precisión de un método de medida normalizado . Madrid: AENOR.
- UNE 82009-6. (1999). Exactitud (veracidad y precisión) de resultados y métodos de medición. Parte 6: Utilización en la práctica de los valores de exactitud . Madrid: AENOR.
- UNE-CEN GUÍA 13 IN. (2010). Validación de métodos de ensayo ambientales. Madrid: AENOR.
- UNE-EN ISO 21569. (2006). Productos alimenticios. Métodos de análisis para la detección de organismos genéticamente manipulados y productos derivados. Métodos cualitativos basados en ácidos nucleicos. Madrid: AENOR.
- UNE-EN ISO 21569:2006/A1. (2013). Productos alimenticios. Métodos de análisis para la detección de organismos genéticamente manipulados y productos derivados. Métodos cualitativos basados en ácidos nucleicos. Modificación 1. Madrid: AENOR.

Verificación de un procedimiento de ensayo para la detección y cuantificación de Organismos Manipulados Genéticamente.

- UNE-EN ISO 21570. (2005). Productos alimenticios. Métodos de análisis para la detección de organismos genéticamente manipulados y productos derivados. Métodos cuantitativos basados en ácidos nucleicos. Madrid: AENOR.
- UNE-EN ISO 21570:2005/A1. (2013). Productos alimenticios. Métodos de análisis para la detección de organismos genéticamente manipulados y productos derivados. Métodos cuantitativos basados en ácidos nucleicos. Modificación 1. Madrid: AENOR.
- UNE-EN ISO 21571. (2005). Productos alimenticios. Métodos de análisis para la detección de organismos genéticamente manipulados y productos derivados. Extracción de ácidos nucleicos. Madrid: AENOR.
- UNE-EN ISO 21571:2005 /A1. (2013). Productos alimenticios. Métodos de análisis para la detección de organismos genéticamente manipulados y productos derivados. Extracción de ácidos nucleicos. Modificación 1. Madrid: AENOR.
- UNE-EN ISO 24276. (2007). Productos alimenticios. Métodos de análisis para la detección de organismos genéticamente manipulados y productos derivados. Requisitos generales y definiciones. Madrid: AENOR.
- UNE-EN ISO 24276:2007/A1. (2013). Productos alimenticios. Métodos de análisis para la detección de organismos genéticamente manipulados y productos derivados. Requisitos generales y definiciones. Modificación 1. Madrid: AENOR.
- UNE-EN ISO 9000. (2005). Sistemas de gestión de calidad. Fundamentos y vocabulario. Madrid: AENOR.
- UNE-EN ISO/IEC 17025. (2005). Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. Madrid: AENOR.
- UNE-ISO 7870-1. (2013). Gráficos de control. Parte 1: Directrices generales. Madrid: AENOR.
- UNION EUROPEA. (2001). DIRECTIVA 2001/18/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 12 de marzo de 2001 sobre la liberación intencional en el medio ambiente de organismos modificados genéticamente y por la que se deroga la Directiva 90/220/CEE del Consejo. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L 106/1-38.
- UNION EUROPEA. (2003). REGLAMENTO (CE) N° 1829/2003 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 22 de septiembre de 2003 sobre alimentos y piensos modificados genéticamente. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 268/1-23.
- UNION EUROPEA. (2003). REGLAMENTO (CE) N° 1830/2003 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 22 de septiembre de 2003 relativo a la trazabilidad y al etiquetado de organismos modificados genéticamente y a la trazabilidad de los alimentos y piensos producidos a partir de éstos, y. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 268/24-28.
- UNION EUROPEA. (2003). REGLAMENTO (CE) N° 1946/2003 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 15 de julio de 2003 relativo al movimiento transfronterizo de organismos modificados genéticamente. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 287/1-10.
- UNION EUROPEA. (2004). RECOMENDACIÓN DE LA COMISIÓN de 4 de octubre de 2004 relativa a las directrices técnicas de muestreo y detección de organismos modificados genéticamente y de material producido a partir de organismos modificados genéticamente, como productos o incorporado. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 348/18-26.
- UNION EUROPEA. (2004). REGLAMENTO (CE) N° 641/2004 DE LA COMISIÓN de 6 de abril de 2004 sobre las normas de desarrollo del Reglamento (CE) no 1829/2003 del Parlamento Europeo y del

- Consejo en lo relativo a la solicitud de autorización de nuevos alimentos y piensos modificados g. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 102/14-25.
- UNION EUROPEA. (2004). REGLAMENTO (CE) N° 65/2004 DE LA COMISIÓN de 14 de enero de 2004 por el que se establece un sistema de creación y asignación de identificadores únicos a los organismos modificados genéticamente. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 10/5-10.
- UNION EUROPEA. (2006). REGLAMENTO (CE) N° 1981/2006 DE LA COMISIÓN de 22 de diciembre de 2006 sobre las normas de desarrollo del artículo 32 del Reglamento (CE) no 1829/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo al laboratorio comunitario de referencia para los or. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 368/99-109.
- UNION EUROPEA. (2008). DIRECTIVA 2008/27/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 11 de marzo de 2008 que modifica la Directiva 2001/18/CE sobre la liberación intencional en el medio ambiente de organismos modificados genéticamente, por lo que se refiere a las competencias de. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 81/45-47.
- UNION EUROPEA. (2009). DIRECTIVA 2009/41/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 6 de mayo de 2009 relativa a la utilización confinada de microorganismos modificados genéticamente (versión refundida) (Texto pertinente a efectos del EEE). *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 125/75-97.
- UNION EUROPEA. (2011). REGLAMENTO (UE) N° 619/2011 DE LA COMISIÓN de 24 de junio de 2011 por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los piensos y de la presencia en ellos de material modificado genéticamente cuyo procedimiento de aut. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 166/9-15.
- UNION EUROPEA. (2013). REGLAMENTO DE EJECUCIÓN (UE) N° 503/2013 DE LA COMISIÓN de 3 de abril de 2013 relativo a las solicitudes de autorización de alimentos y piensos modificados genéticamente de conformidad con el Reglamento (CE) n° 1829/2003 del Parlamento Europeo y del Conse. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 157/1-48.
- Waiblinger, H., & et al. (2008). Validation and collaborative study of a P35S and T-nos duplex real-time PCR screening method to detect genetically modified organisms in food products. *Eur Food Res Technol*(226), 1221–1228. doi:10.1007/s00217-007-0748-z
- Wikipedia. (s.f.). Reacción en cadena de la polimerasa. Recuperado el 20 de Julio de 2014, de http://es.wikipedia.org/wiki/Reacci%C3%B3n_en_cadena_de_la_polimerasa
- Zagon, J. (2001). Development of methods to identify foods produced by means of genetic engineering. Recuperado el 4 de Agosto de 2014, de <http://bookshop.europa.eu/mt/development-of-methods-to-identify-foods-produced-by-means-of-genetic-engineering-pbKINA19706/>

7. Anexos.

7.1. Cálculos de concentración

7.1.1. Construcción Soja GTS-40-3-2

16/07/2014

Tabla 69: Cálculos del ensayo de cuantificación de la construcción GTS-40-3-2 en extractos de ADN procedente de harina de soja (16/07/14)

Identificación	Ct transg.	Ct endog.	log conc Transgén	conc Transgén	media c Transgén	log conc Endog.	conc Endóg.	media c Endóg.	% OMG	media OMG %	RSDr
14/0757	34,27	26,74	-0,888	0,13	0,1401	1,94	86,41	82,23	0,17	0,16	11,34%
14/0757	34,04	26,89	-0,822	0,15		1,89	78,05				
14/0758	34,34	26,80	-0,907	0,12	0,1155	1,92	83,17	79,65	0,15		Válido
14/0758	34,55	26,93	-0,970	0,11		1,88	76,12				
14/0759	31,40	26,64	-0,053	0,89	0,8918	1,97	92,43	85,22	1,05	1,05	0,16%
14/0759	31,38	26,89	-0,047	0,90		1,89	78,01				
14/0760	31,33	26,76	-0,034	0,92	0,8424	1,93	85,20	80,33	1,05		Válido
14/0760	31,63	26,94	-0,119	0,76		1,88	75,46				
14/0762	27,98	26,78	0,941	8,73	8,8329	1,93	84,38	79,51	11,11	11,42	3,85%
14/0762	27,94	26,96	0,951	8,93		1,87	74,64				
14/0763	27,98	26,87	0,941	8,73	8,7580	1,90	79,30	74,65	11,73		Válido
14/0763	27,97	27,06	0,944	8,78		1,85	70,00				

18/07/2014

Tabla 70: Cálculos del ensayo de cuantificación de la construcción GTS-40-3-2 en extractos de ADN procedente de harina de soja (18/07/14)

Identificación	Ct transg.	Ct endog.	log conc Transgén	conc Transgén	media c Transgén	log conc Endog.	conc Endóg.	media c Endóg.	% OMG	media OMG %	RSDr
14/0757	34,43	26,89	-0,875	0,13	0,1164	1,94	87,27	82,69	0,14	0,13	9,39%
14/0757	34,86	27,05	-1,002	0,10		1,89	78,11				
14/0758	34,77	27,03	-0,974	0,11	0,0997	1,90	78,80	80,89	0,12		Válido
14/0758	34,96	26,96	-1,030	0,09		1,92	82,98				
14/0759	31,81	26,74	-0,113	0,77	0,8654	1,99	96,94	92,43	0,94	0,92	2,61%
14/0759	31,49	26,88	-0,018	0,96		1,94	87,92				
14/0760	31,73	26,80	-0,087	0,82	0,8112	1,97	92,84	89,90	0,90		Válido
14/0760	31,75	26,89	-0,094	0,80		1,94	86,96				
14/0762	28,15	26,94	0,955	9,01	8,9617	1,93	84,28	83,82	10,69	10,80	1,46%
14/0762	28,17	26,95	0,950	8,91		1,92	83,37				
14/0763	28,26	27,05	0,925	8,41	8,4636	1,89	77,71	77,55	10,91		Válido
14/0763	28,23	27,06	0,931	8,52		1,89	77,38				

Verificación de un procedimiento de ensayo para la detección y cuantificación de Organismos Manipulados Genéticamente.

18/07/2014 (2)

Tabla 71: Cálculos del ensayo de cuantificación de la construcción GTS-40-3-2 en extractos de ADN procedente de harina de soja (18/07/14-2)

Identificación	Ct transg.	Ct endog.	log conc Transgén	conc Transgén	media c Transgén	log conc Endog.	conc Endóg.	media c Endóg.	% OMG	media OMG %	RSDr
14/0757	34,47	27,38	-0,841	0,14	0,1214	1,92	82,60	86,69	0,14	0,15	8,94%
14/0757	35,03	27,24	-1,006	0,10		1,96	90,78				
14/0758	34,69	27,37	-0,906	0,12	0,1329	1,92	83,16	83,58	0,16		Válido
14/0758	34,50	27,35	-0,849	0,14		1,92	83,99				
14/0759	31,86	27,28	-0,075	0,84	0,8508	1,95	88,73	89,35	0,95	0,94	2,47%
14/0759	31,82	27,26	-0,065	0,86		1,95	89,97				
14/0760	31,99	27,29	-0,114	0,77	0,7773	1,94	87,94	84,55	0,92		Válido
14/0760	31,96	27,40	-0,105	0,78		1,91	81,15				
14/0762	28,37	27,40	0,948	8,87	8,8559	1,91	81,39	80,49	11,00	10,81	2,55%
14/0762	28,37	27,43	0,946	8,84		1,90	79,59				
14/0763	28,49	27,36	0,913	8,18	8,6136	1,92	83,71	81,16	10,61		Válido
14/0763	28,34	27,45	0,956	9,04		1,90	78,60				

18/07/2014 (3)

Tabla 72: Cálculos del ensayo de cuantificación de la construcción GTS-40-3-2 en extractos de ADN procedente de harina de soja (18/07/14-3)

Identificación	Ct transg.	Ct endog.	log conc Transgén	conc Transgén	media c Transgén	log conc Endog.	conc Endóg.	media c Endóg.	% OMG	media OMG %	RSDr
14/0757	35,58	27,10	-1,161	0,07	0,0867	1,88	76,28	74,93	0,12	0,12	5,21%
14/0757	34,96	27,15	-0,981	0,10		1,87	73,58				
14/0758	34,69	27,06	-0,906	0,12	0,1007	1,90	78,56	80,84	0,12		Válido
14/0758	35,41	26,98	-1,112	0,08		1,92	83,13				
14/0759	31,93	26,94	-0,115	0,77	0,7697	1,93	85,14	83,49	0,92	0,92	0,38%
14/0759	31,92	27,00	-0,112	0,77		1,91	81,83				
14/0760	31,91	26,96	-0,107	0,78	0,7686	1,92	83,89	82,92	0,93		Válido
14/0760	31,95	27,00	-0,121	0,76		1,91	81,96				
14/0762	28,26	26,93	0,937	8,64	8,5131	1,93	85,80	81,78	10,41	10,58	2,24%
14/0762	28,31	27,07	0,923	8,38		1,89	77,75				
14/0763	28,27	26,97	0,934	8,60	8,8137	1,92	83,62	82,02	10,75		Válido
14/0763	28,19	27,02	0,956	9,03		1,91	80,42				

7.1.2. Evento Maíz MON810

05/08/2014

Tabla 73: Cálculos del ensayo de cuantificación del evento MON810 en extractos de ADN procedente de harina de maíz. (05/08/14)

Identificación	Ct transg.	Ct endog.	log conc Transgén	conc Transgén	media c Transgén	log conc Endóg.	conc Endóg.	media c Endóg.	% OMG	media OMG %	RSDr
14/0446	37,89	24,08	-1,226	0,06	0,0710	1,93	85,11	87,14	0,08	0,08	4,78%
14/0446	37,38	24,02	-1,083	0,08		1,95	89,17				
14/0447	37,74	23,99	-1,183	0,07	0,0774	1,96	90,97	88,75	0,09		Válido
14/0447	37,26	24,06	-1,050	0,09		1,94	86,53				
RFIP-004-001	33,45	23,94	0,016	1,04	1,0302	1,98	94,42	88,25	1,17	1,15	1,73%
RFIP-004-001	33,47	24,13	0,010	1,02		1,91	82,08				
RFIP-004-002	33,47	23,98	0,009	1,02	1,0197	1,96	91,32	89,51	1,14		Válido
RFIP-004-002	33,48	24,04	0,008	1,02		1,94	87,70				
14/0662	30,21	24,00	0,921	8,34	8,4995	1,95	89,94	88,03	9,66	9,79	1,88%
14/0662	30,15	24,06	0,938	8,66		1,94	86,11				
14/0663	29,99	23,96	0,982	9,60	9,1691	1,97	92,62	92,47	9,92		Válido
14/0663	30,14	23,97	0,941	8,74		1,97	92,32				

05/08/14

Tabla 74: Cálculos del ensayo de cuantificación del evento MON810 en extractos de ADN procedente de harina de maíz. (05/08/14)

Identificación	Ct transg.	Ct endog.	log conc Transgén	conc Transgén	media c Transgén	log conc Endóg.	conc Endóg.	media c Endóg.	% OMG	media OMG %	RSDr
14/0446	36,76	23,80	-1,008	0,10	0,0748	1,89	78,47	78,50	0,10	0,09	9,38%
14/0446	37,71	23,80	-1,289	0,05		1,90	78,54				
14/0447	37,36	23,55	-1,186	0,07	0,0723	1,97	94,07	86,71	0,08		Válido
14/0447	37,07	23,79	-1,100	0,08		1,90	79,34				
RFIP-004-001	33,39	23,54	-0,015	0,96	0,9441	1,98	94,48	87,40	1,08	1,12	4,50%
RFIP-004-001	33,45	23,77	-0,035	0,92		1,90	80,31				
RFIP-004-002	33,55	23,75	-0,065	0,86	0,9659	1,91	81,27	83,90	1,15		Válido
RFIP-004-002	33,23	23,67	0,030	1,07		1,94	86,52				
14/0662	29,95	23,56	0,996	9,92	9,6179	1,97	93,11	89,22	10,78	10,51	3,60%
14/0662	30,04	23,69	0,969	9,32		1,93	85,33				
14/0663	29,99	23,48	0,985	9,66	9,8550	1,99	98,55	96,20	10,24		Válido
14/0663	29,93	23,55	1,002	10,05		1,97	93,85				

Verificación de un procedimiento de ensayo para la detección y cuantificación de Organismos Manipulados Genéticamente.

11/08/14

Tabla 75: Cálculos del ensayo de cuantificación del evento MON810 en extractos de ADN procedente de harina de maíz. (11/08/14)

Identificación	Ct transg.	Ct endog.	log conc Transgén	conc Transgén	media c Transgén	log conc Endog.	conc Endóg.	media c Endóg.	% OMG	media OMG %	RSDr
14/0446	37,90	23,99	-1,207	0,06	0,0704	1,91	81,03	82,55	0,09	0,09	2,94%
14/0446	37,55	23,94	-1,104	0,08		1,92	84,07				
14/0447	38,17	23,91	-1,284	0,05	0,0744	1,93	85,60	83,66	0,09	0,09	Válido
14/0447	37,24	23,98	-1,014	0,10		1,91	81,73				
RFIP-004-001	34,17	23,93	-0,121	0,76	0,8309	1,93	84,50	88,03	0,94	0,98	4,97%
RFIP-004-001	33,90	23,81	-0,043	0,91		1,96	91,56				
RFIP-004-002	33,95	23,99	-0,058	0,87	0,8821	1,91	80,71	87,11	1,01	1,01	Válido
RFIP-004-002	33,92	23,78	-0,051	0,89		1,97	93,50				
14/0662	30,57	23,89	0,924	8,40	8,8249	1,94	86,98	88,76	9,94	10,25	4,28%
14/0662	30,42	23,83	0,966	9,25		1,96	90,53				
14/0663	30,29	23,75	1,006	10,13	9,6932	1,98	95,39	91,76	10,56	10,56	Válido
14/0663	30,42	23,87	0,966	9,26		1,95	88,13				

11/08/14 (2)

Tabla 76: Cálculos del ensayo de cuantificación del evento MON810 en extractos de ADN procedente de harina de maíz. (11/08/14-2)

Identificación	Ct transg.	Ct endog.	log conc Transgén	conc Transgén	media c Transgén	log conc Endog.	conc Endóg.	media c Endóg.	% OMG	media OMG %	RSDr
14/0446	38,44	24,18	-1,344	0,0453	0,0808	1,90	79,60	76,33	0,11	0,13	22,96%
14/0446	36,99	24,30	-0,934	0,1164		1,86	73,06				
14/0447	36,92	23,95	-0,914	0,12	0,1245	1,97	93,43	84,71	0,15	0,15	Válido
14/0447	36,86	24,24	-0,896	0,13		1,88	75,98				
RFIP-004-001	33,74	24,01	-0,014	0,97	0,9629	1,95	89,12	82,87	1,16	1,19	3,82%
RFIP-004-001	33,76	24,23	-0,019	0,96		1,88	76,62				
RFIP-004-002	33,71	24,17	-0,003	0,99	0,9984	1,90	80,03	81,39	1,23	1,23	Válido
RFIP-004-002	33,69	24,12	0,002	1,00		1,92	82,76				
14/0662	30,37	24,00	0,941	8,72	8,5879	1,95	89,76	85,98	9,99	9,66	4,80%
14/0662	30,42	24,13	0,927	8,45		1,91	82,20				
14/0663	30,44	23,99	0,922	8,35	8,5088	1,96	90,75	91,17	9,33	9,33	Válido
14/0663	30,38	23,98	0,938	8,67		1,96	91,60				

7.2. Rectas de regresión

7.2.1. ADH

Tabla 77: Recta de regresión en la cuantificación de la ADH (28/07/2014)

ADH diluciones seriadas (2,725 pg/copia)						
Dilución	Copias	Log Conc	Ct	Conc Calc.	Ex %	CV conc
1	55045,87156	4,741	25,52	43694,02	18,90	4,06%
1	55045,87156	4,741	25,52	43506,92		
1	55045,87156	4,741	25,43	46733,51	Válido	Válido
2	27522,93578	4,440	26,02	30323,34	8,36	2,06%
2	27522,93578	4,440	26,03	30013,37		
2	27522,93578	4,440	26,08	29138,32	Válido	Válido
5	11009,17431	4,042	27,32	11800,74	13,49	4,88%
5	11009,17431	4,042	27,21	12734,62		
5	11009,17431	4,042	27,19	12946,08	Válido	Válido
20	2752,293578	3,440	29,23	2934,70	8,79	3,94%
20	2752,293578	3,440	29,23	2917,80		
20	2752,293578	3,440	29,14	3130,10	Válido	Válido
200	275,2293578	2,440	32,69	235,04	7,52	6,64%
200	275,2293578	2,440	32,54	263,65		
200	275,2293578	2,440	32,53	264,94	Válido	Válido

Ecuación de la recta:

$$y = -3,14586624 X + 40,1298$$

Ecuación de la recta para los cálculos:

$$y = -0,31631624 X + 12,7125$$

Límites:	min	max
E	90	110
R ² :	0,98	

Eficiencia Endógeno: 107,91 Evaluación: Válido

R² Endógeno: 1,000 Evaluación: Válido

Exactitud	CV conc	
	0,2	<0,2
25%	25%	50%

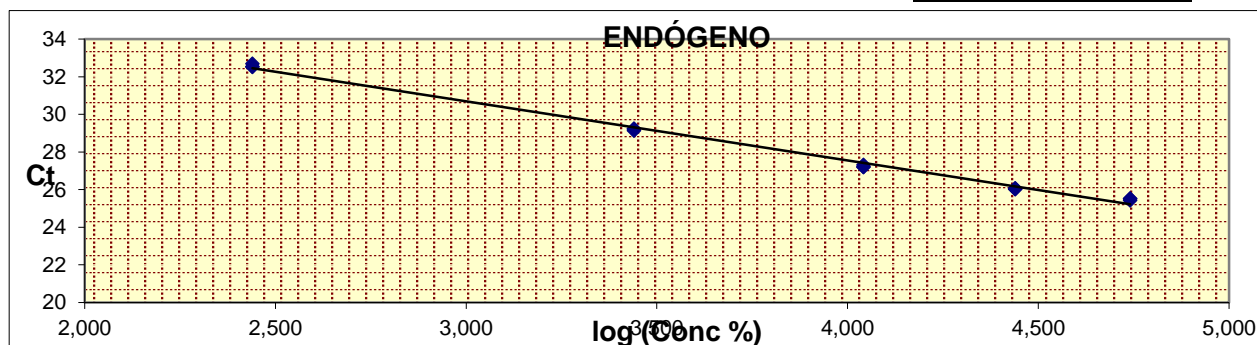


Figura 7: Recta de regresión para la ADH (28/07/2014)

7.2.2. Soja GTS-40-3-2

Tabla 78: Cálculos de regresión en el ensayo de cuantificación de la construcción GTS-40-3-2 en extractos de ADN procedente de harina de soja (16/07/2014)

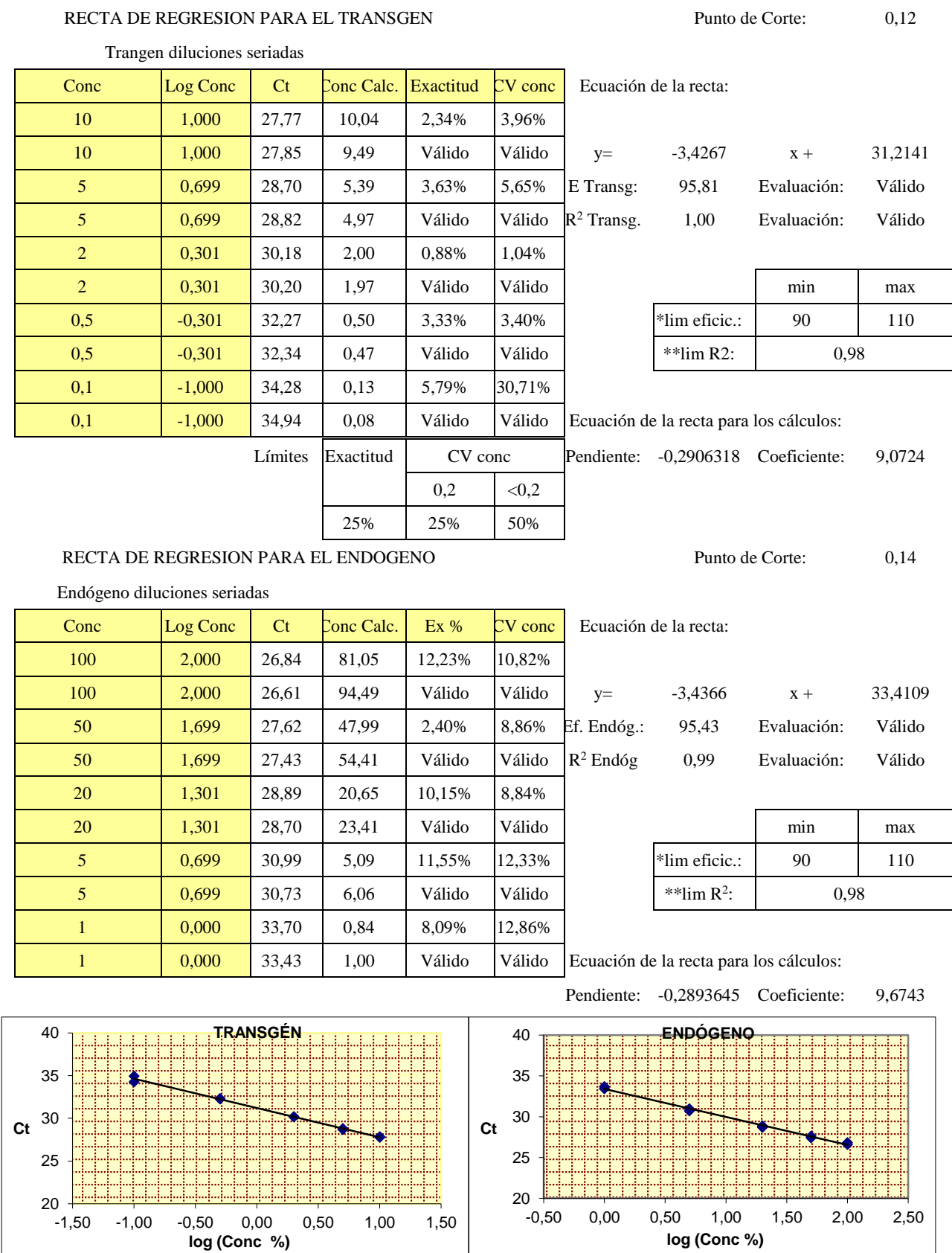


Figura 8: Rectas de regresión del ensayo de cuantificación de ADN de soja (16/07/14)

Tabla 79: Cálculos de regresión en el ensayo de cuantificación de la construcción GTS-40-3-2 en extractos de ADN procedente de harina de soja (18/07/2014)

RECTA DE REGRESION PARA EL TRANSGEN						Punto de Corte:	0,16
Trangen diluciones seriadas							
Conc	Log Conc	Ct	Conc Calc.	Exactitud	CV conc	Ecuación de la recta:	
10	1,000	28,30	7,25	23,38%	7,57%	y=	-3,4105 x + 31,4233
10	1,000	28,13	8,07	Válido	Válido	Ef.:	96,43 Evaluación Válido
5	0,699	28,97	4,69	8,78%	4,02%	R ²	0,99 Evaluación Válido
5	0,699	29,06	4,43	Válido	Válido		
2	0,301	30,12	2,24	9,11%	3,64%		
2	0,301	30,20	2,13	Válido	Válido		
0,5	-0,301	32,20	0,58	4,95%	15,46%		
0,5	-0,301	32,54	0,47	Válido	Válido		
0,1	-1,000	34,98	0,10	3,62%	0,40%		
0,1	-1,000	34,97	0,10	Válido	Válido		
Límites:			Exactitud	CV conc		Ecuación de la recta para los cálculos:	
				0,2	<0,2	Pendiente: -0,291594115 Coeficiente: 9,1636	
			25%	25%	50%		
RECTA DE REGRESION PARA EL ENDOGENO						Punto de Corte:	0,18
Endógeno diluciones seriadas							
Conc	Log Conc	Ct	Conc Calc.	Ex %	CV conc	Ecuación de la recta:	
100	2,000	26,90	86,41	10,82	4,40%	y=	-3,2382 x + 33,1911
100	2,000	26,81	91,96	Válido	Válido	Ef.:	103,62 Evaluación Válido
50	1,699	27,59	53,25	3,48	4,14%	R ² :	0,99 Evaluación Válido
50	1,699	27,67	50,22	Válido	Válido		
20	1,301	28,84	21,94	12,93	4,03%		
20	1,301	28,76	23,23	Válido	Válido		
5	0,699	31,32	3,83	0,94	32,11%		
5	0,699	30,66	6,08	Válido	>límite		
1	0,000	33,33	0,92	0,12	10,75%		
1	0,000	33,11	1,07	Válido	Válido		
						Ecuación de la recta para los cálculos:	
						Pendiente: -0,30672656 Coeficiente: 10,1883	

	min	max
lim efíic.:	90	110
lim R ² :	0,98	

	min	max
lim efíic.:	90	110
lim R ² :	0,98	

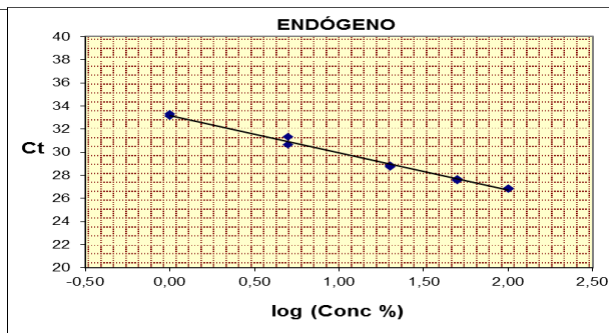
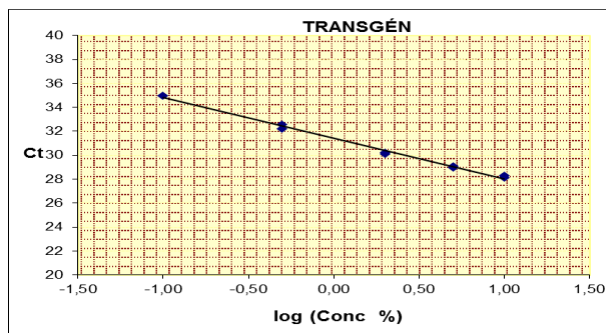


Figura 9: Rectas de regresión del ensayo de cuantificación de ADN de soja (18/07/14)

Verificación de un procedimiento de ensayo para la detección y cuantificación de Organismos Manipulados Genéticamente.

Tabla 80: Cálculos de regresión en el ensayo de cuantificación de la construcción GTS-40-3-2 en extractos de ADN procedente de harina de soja (18/07/2014-2)

RECTA DE REGRESION PARA EL TRANSGEN

Punto de Corte: 0,18

Trangen diluciones seriadas

Conc	Log Conc	Ct	Conc Calc.	Exactitud	CV conc
10	1,000	28,25	9,51	1,94%	4,29%
10	1,000	28,16	10,10	Válido	Válido
5	0,699	29,17	5,13	1,51%	5,89%
5	0,699	29,29	4,72	Válido	Válido
2	0,301	30,51	2,08	1,74%	3,11%
2	0,301	30,58	1,99	Válido	Válido
0,5	-0,301	32,67	0,49	0,09%	3,71%
0,5	-0,301	32,59	0,51	Válido	Válido
0,1	-1,000	35,17	0,09	0,56%	14,45%
0,1	-1,000	34,86	0,11	Válido	Válido

Ecuación de la recta:

$$y = -3,4067x + 31,6015$$

Ef.: 96,58 Evaluación Válido

R²: 1,00 Evaluación Válido

	min	max
lim eficic.:	90	110
lim R ² :	0,98	

Límites:

Exactitud	CV conc	
		0,2
25%	25%	50%

Ecuación de la recta para los cálculos:

Pendiente: -0,2932136 Coeficiente: 9,2661

RECTA DE REGRESION PARA EL ENDOGENO

Punto de Corte: 0,21

Endógeno diluciones seriadas

Conc	Log Conc	Ct	Conc Calc.	Ex %	CV conc
100	2,000	27,39	82,07	12,46	8,84%
100	2,000	27,21	93,01	Válido	Válido
50	1,699	27,96	54,71	9,34	0,10%
50	1,699	27,97	54,63	Válido	Válido
20	1,301	29,34	20,69	3,38	0,09%
20	1,301	29,35	20,66	Válido	Válido
5	0,699	31,31	5,19	8,46	5,97%
5	0,699	31,19	5,65	Válido	Válido
1	0,000	33,76	0,92	6,53	1,82%
1	0,000	33,72	0,95	Válido	Válido

Ecuación de la recta:

$$y = -3,2597x + 33,6348$$

Ef.: 102,66 Evaluación Válido

R²: 1,00 Evaluación Válido

	min	max
lim eficic.:	90	110
lim R ² :	0,98	

Ecuación de la recta para los cálculos:

Pendiente: -0,3057841 Coeficiente: 10,289

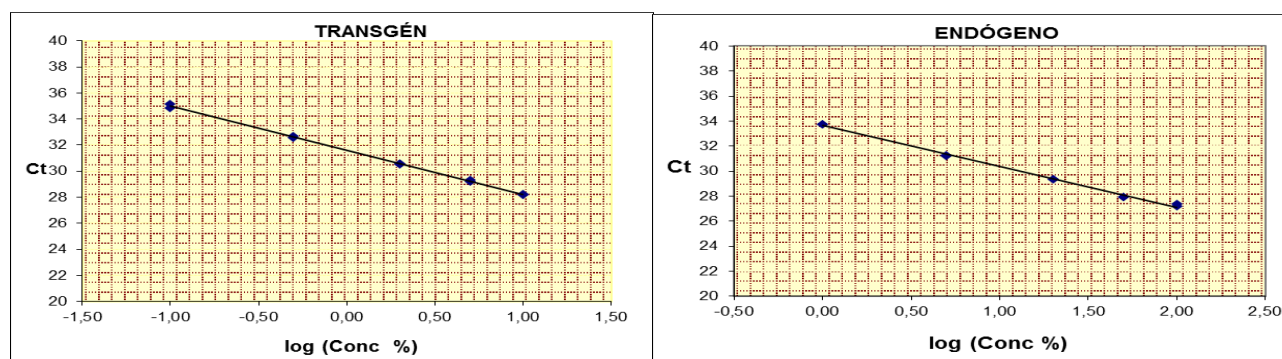


Figura 10: Rectas de regresión del ensayo de cuantificación de ADN de soja (18/07/14-2).

Tabla 81: Cálculos de regresión en el ensayo de cuantificación de la construcción GTS-40-3-2 en extractos de ADN procedente de harina de soja (18/07/2014-3)

RECTA DE REGRESION PARA EL TRANSGEN

Punto de Corte: 0,17

Trangen diluciones seriadas

Conc	Log Conc	Ct	Conc Calc.	Exactitud	CV conc
10	1,000	28,28	8,52	12,54%	3,71%
10	1,000	28,20	8,98	Válido	Válido
5	0,699	29,15	4,80	4,40%	0,67%
5	0,699	29,17	4,76	Válido	Válido
2	0,301	30,40	2,11	6,31%	1,34%
2	0,301	30,37	2,15	Válido	Válido
0,5	-0,301	32,59	0,50	2,02%	2,06%
0,5	-0,301	32,63	0,48	Válido	Válido
0,1	-1,000	34,80	0,12	1,44%	19,73%
0,1	-1,000	35,23	0,09	Válido	Válido

Ecuación de la recta:

$$y = -3,4155x + 31,5609$$

Ef.: 96,24 Evaluación Válido

R²: 1,00 Evaluación Válido

	min	max
lim eficic.:	90	110
*im R ² :	0,98	

Límites:

Exactitud	CV conc	
	0,2	<0,2
25%	25%	50%

Ecuación de la recta para los cálculos:

Pendiente: -0,2865112 Coeficiente: 9,0339

RECTA DE REGRESION PARA EL ENDOGENO

Punto de Corte: 0,21

Endógeno diluciones seriadas

Conc	Log Conc	Ct	Conc Calc.	Ex %	CV conc
100	2,000	26,75	97,23	7,39%	7,04%
100	2,000	26,90	88,00	Válido	Válido
50	1,699	27,69	50,53	2,24%	1,64%
50	1,699	27,66	51,71	Válido	Válido
20	1,301	28,92	21,47	6,70%	0,87%
20	1,301	28,94	21,21	Válido	Válido
5	0,699	30,98	5,11	3,81%	2,12%
5	0,699	30,94	5,27	Válido	Válido
1	0,000	33,45	0,92	4,44%	5,40%
1	0,000	33,34	0,99	Válido	Válido

Ecuación de la recta:

$$y = -3,3052x + 33,5170$$

Ef.: 100,70 Evaluación Válido

R²: 1,00 Evaluación Válido

	min	max
lim eficic.:	90	110
lim R ² :	0,98	

Ecuación de la recta para los cálculos:

Pendiente: -0,2865111 Coeficiente: 9,0339

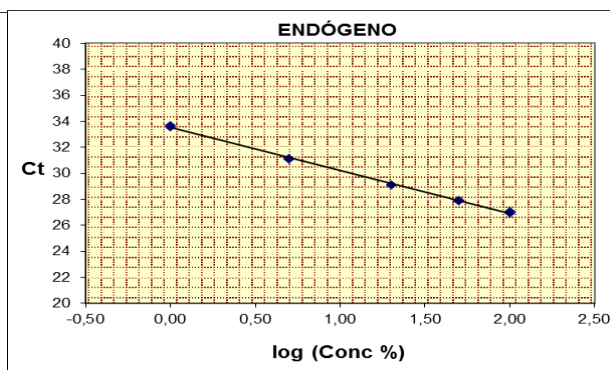
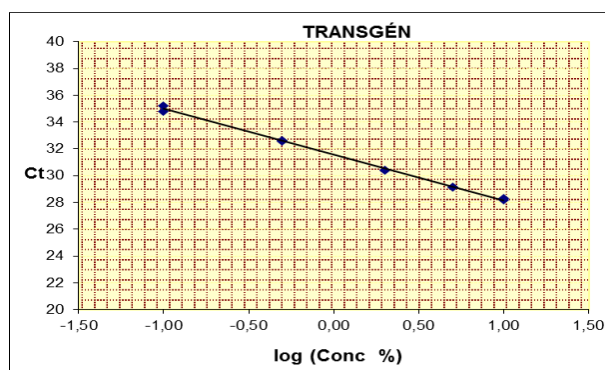


Figura 11: Rectas de regresión del ensayo de cuantificación de ADN de soja (18/07/14-3).

7.2.3. Maíz MON810

Tabla 82: Cálculos de regresión en el ensayo de cuantificación del evento MON810 en extractos de ADN procedente de harina de maíz (05/08/2014)

RECTA DE REGRESION PARA EL TRANSGEN

Punto de Corte: 0,06

Trangen diluciones seriadas

Conc	Log Conc	Ct	Conc Calc.	Exactitud	CV conc
10	1,000	30,10	8,93	9,79%	1,45%
10	1,000	30,07	9,11	Válido	Válido
5	0,699	31,02	4,95	1,97%	1,34%
5	0,699	31,05	4,85	Válido	Válido
2	0,301	32,39	2,04	6,36%	5,53%
2	0,301	32,27	2,21	Válido	Válido
0,5	-0,301	34,28	0,61	17,09%	5,39%
0,5	-0,301	34,40	0,56	Válido	Válido
0,05	-1,301	38,32	0,05	9,06%	1,10%
0,05	-1,301	38,30	0,05	Válido	Válido

Ecuación de la recta:

$$y = -3,5676x + 33,5041$$

Ef.: 90,68 Evaluación: Válido

R2: 1,00 Evaluación: Válido

	min	max
*lim eficic.:	90	110
**lim R2:	0,98	

Ecuación de la recta para los cálculos:

Pendiente: -0,2794805 Coeficiente: 9,3640

Límites:	Exactitud	CV conc	
			0,2
	25%	25%	50%

RECTA DE REGRESION PARA EL ENDOGENO

Punto de Corte: 0,27

Endógeno diluciones seriadas

Conc	Log Conc	Ct	Conc Calc.	Ex %	CV conc
100	2,000	23,97	92,28	9,47%	2,74%
100	2,000	24,02	88,78	Válido	Válido
50	1,699	24,76	51,35	3,84%	1,56%
50	1,699	24,73	52,49	Válido	Válido
20	1,301	25,97	21,05	8,54%	4,31%
20	1,301	25,88	22,37	Válido	Válido
5	0,699	27,95	4,83	1,42%	6,67%
5	0,699	27,83	5,31	Válido	Válido
0,5	-0,301	31,12	0,46	3,11%	5,70%
0,5	-0,301	31,01	0,50	Válido	Válido

Ecuación de la recta:

$$y = -3,1064x + 30,0770$$

Ef.: 109,85 Evaluación: Válido

R2: 1,00 Evaluación: Válido

	min	max
*lim eficic.:	90	110
**lim R2:	0,98	

Ecuación de la recta para los cálculos:

Pendiente: -0,32146857 Coeficiente: 9,6703

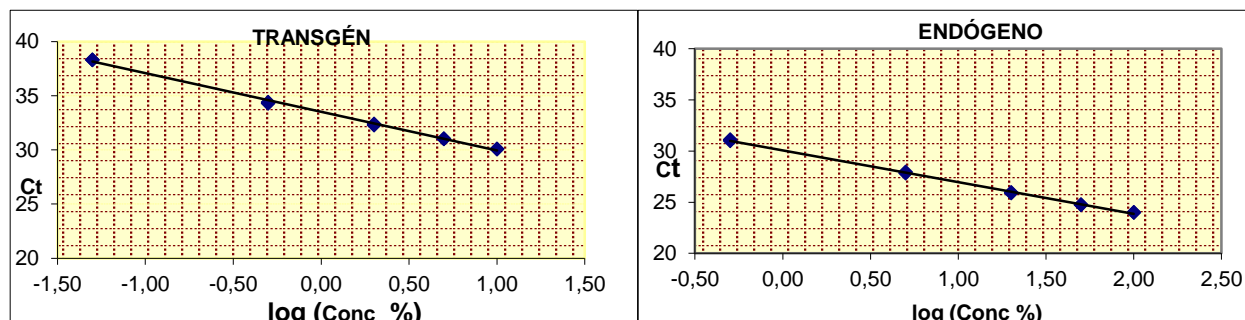


Figura 12: Rectas de regresión del ensayo de cuantificación de ADN de maíz (05/08/14)

Tabla 83: Cálculos de regresión en el ensayo de cuantificación del evento MON810 en extractos de ADN procedente de harina de maíz (05/08/2014-2)

RECTA DE REGRESION PARA EL TRANSGEN

Punto de Corte: 0,05

Trangen diluciones seriadas

Conc	Log Conc	Ct	Conc Calc.	Exactitud	CV conc
10	1,000	29,98	9,73	2,92%	0,35%
10	1,000	29,98	9,68	Válido	Válido
5	0,699	30,98	4,91	1,40%	0,44%
5	0,699	30,98	4,95	Válido	Válido
2	0,301	32,37	1,92	0,64%	4,66%
2	0,301	32,27	2,05	Válido	Válido
0,5	-0,301	34,20	0,56	7,62%	5,07%
0,5	-0,301	34,30	0,52	Válido	Válido
0,05	-1,301	37,39	0,06	1,30%	36,77%
0,05	-1,301	38,18	0,04	Válido	Válido

Ecuación de la recta:

$$y = -3,3808x + 33,3318$$

Ef.: 97,60 Evaluación: Válido

R2: 1,00 Evaluación: Válido

	min	max
*lim eficic.:	90	110
**lim R2:	0,98	

Ecuación de la recta para los cálculos:

Pendiente: -0,29444373 Coeficiente: 9,8147

Límites:	Exactitud	CV conc	
			0,2
	25%	25%	50%

RECTA DE REGRESION PARA EL ENDOGENO

Punto de Corte: 0,25

Endógeno diluciones seriadas

Conc	Log Conc	Ct	Conc Calc.	Ex %	CV conc
100	2,000	23,61	89,86	9,96%	0,29%
100	2,000	23,61	90,23	Válido	Válido
50	1,699	24,29	55,55	8,29%	3,68%
50	1,699	24,36	52,74	Válido	Válido
20	1,301	25,60	21,67	8,81%	0,61%
20	1,301	25,59	21,86	Válido	Válido
5	0,699	27,88	4,26	6,48%	12,64%
5	0,699	27,63	5,09	Válido	Válido
0,5	-0,301	30,95	0,47	1,43%	9,06%
0,5	-0,301	30,78	0,54	Válido	Válido

Ecuación de la recta:

$$y = -3,2164x + 29,9032$$

Ef.: 104,60 Evaluación: Válido

R2: 1,00 Evaluación: Válido

	min	max
*lim eficic.:	90	110
**lim R2:	0,98	

Ecuación de la recta para los cálculos:

Pendiente: -0,31016138 Coeficiente: 9,2774

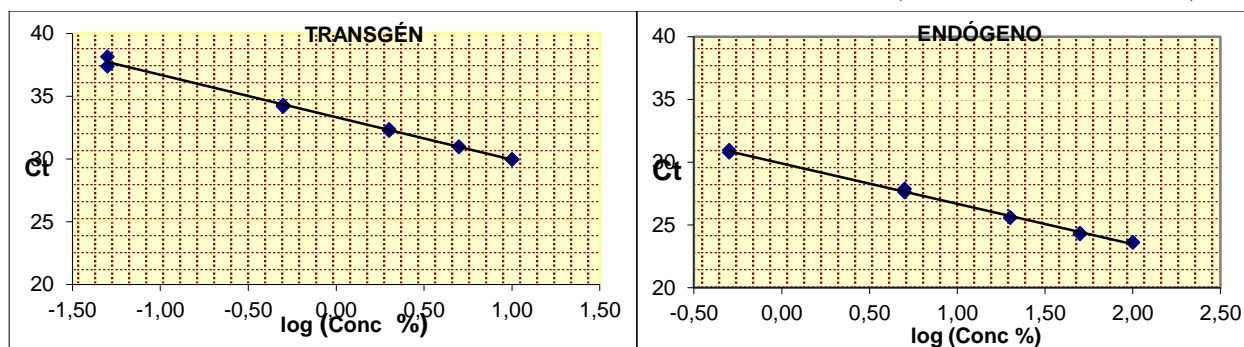


Figura 13: Rectas de regresión del ensayo de cuantificación de ADN de maíz (05/08/14-2)

Tabla 84: Cálculos de regresión en el ensayo de cuantificación del evento MON810 en extractos de ADN procedente de harina de maíz (11/08/2014)

RECTA DE REGRESION PARA EL TRANSGEN

Punto de Corte: 0,05

Trangen diluciones seriadas

Conc	Log Conc	Ct	Conc Calc.	Exactitud	CV conc
10	1,000	30,39	9,45	5,75%	0,45%
10	1,000	30,40	9,40	Válido	Válido
5	0,699	31,31	5,10	2,82%	7,12%
5	0,699	31,46	4,61	Válido	Válido
2	0,301	32,53	2,26	14,09%	1,26%
2	0,301	32,50	2,30	Válido	Válido
0,5	-0,301	34,83	0,49	2,58%	0,19%
0,5	-0,301	34,82	0,49	Válido	Válido
0,05	-1,301	38,24	0,05	1,64%	1,44%
0,05	-1,301	38,27	0,05	Válido	Válido

Ecuación de la recta:

$$y = -3,4367x + 33,7486$$

Ef.: 95,42 Evaluación: Válido

R2: 1,00 Evaluación: Válido

	min	max
*lim eficc.:	90	110
**lim R2:	0,98	

Ecuación de la recta para los cálculos:

Pendiente: -0,29055399 Coeficiente: 9,8059

Límites:	Exactitud	CV conc	
			0,2
	25%	25%	50%

RECTA DE REGRESION PARA EL ENDOGENO

Punto de Corte: 0,30

Endógeno diluciones seriadas

Conc	Log Conc	Ct	Conc Calc.	Ex %	CV conc
100	2,000	23,81	91,54	11,66%	5,12%
100	2,000	23,92	85,14	Válido	Válido
50	1,699	24,59	53,67	3,59%	5,12%
50	1,699	24,69	49,92	Válido	Válido
20	1,301	25,95	21,01	5,24%	0,25%
20	1,301	25,94	21,08	Válido	Válido
5	0,699	27,90	5,49	11,82%	2,63%
5	0,699	27,84	5,70	Válido	Válido
0,5	-0,301	31,66	0,41	6,29%	17,52%
0,5	-0,301	31,30	0,53	Válido	Válido

Ecuación de la recta:

$$y = -3,3306x + 30,3546$$

Ef.: 99,64 Evaluación: Válido

R2: 1,00 Evaluación: Válido

	min	max
*lim eficc.:	90	110
**lim R2:	0,98	

Ecuación de la recta para los cálculos:

Pendiente: -0,29930427 Coeficiente: 9,0887

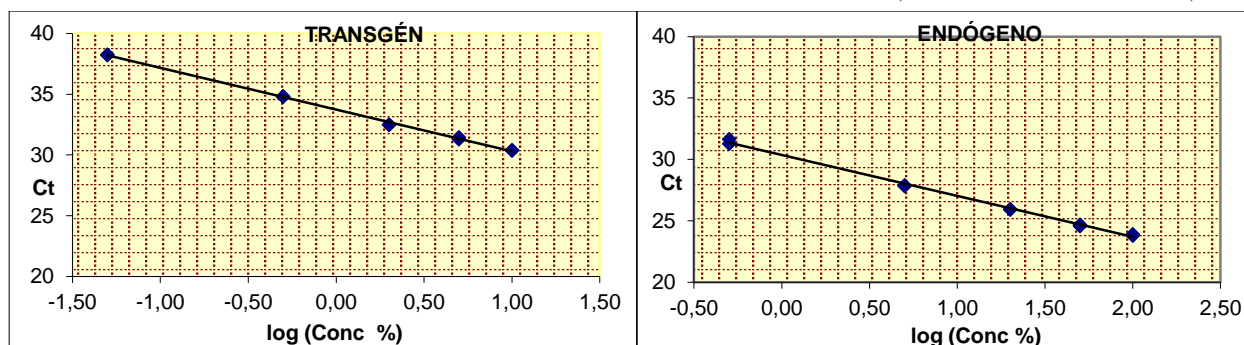


Figura 14: Rectas de regresión del ensayo de cuantificación de ADN de maíz (11/08/14).

Tabla 85: Cálculos de regresión en el ensayo de cuantificación del evento MON810 en extractos de ADN procedente de harina de maíz (11/08/2014-2)

RECTA DE REGRESION PARA EL TRANSGEN

Punto de Corte: 0,07

Trangen diluciones seriadas

Conc	Log Conc	Ct	Conc Calc.	Exactitud	CV conc
10	1,000	30,37	8,76	11,77%	1,00%
10	1,000	30,34	8,89	Válido	Válido
5	0,699	31,25	4,92	3,45%	2,63%
5	0,699	31,31	4,74	Válido	Válido
2	0,301	32,61	2,03	4,17%	3,92%
2	0,301	32,53	2,14	Válido	Válido
0,5	-0,301	34,41	0,63	24,49%	0,88%
0,5	-0,301	34,43	0,62	Válido	Válido
0,05	-1,301	37,97	0,06	5,12%	42,14%
0,05	-1,301	38,91	0,03	Válido	Válido

Ecuación de la recta:

$$y = -3,4976x + 33,6921$$

Ef.: 93,16 Evaluación: Válido

R2: 0,99 Evaluación: Válido

	min	max
*lim eficic.:	90	110
**lim R2:	0,98	

Ecuación de la recta para los cálculos:

Pendiente: -0,28312752 Coeficiente: 9,5399

Límites:	Exactitud	CV conc	
			0,2
	25%	25%	50%

RECTA DE REGRESION PARA EL ENDOGENO

Punto de Corte: 0,30

Endógeno diluciones seriadas

Conc	Log Conc	Ct	Conc Calc.	Ex %	CV conc
100	2,000	23,99	90,93	12,51%	5,55%
100	2,000	24,10	84,05	Válido	Válido
50	1,699	24,74	53,58	5,84%	1,76%
50	1,699	24,78	52,26	Válido	Válido
20	1,301	26,10	20,71	9,67%	7,90%
20	1,301	25,94	23,16	Válido	Válido
5	0,699	28,11	5,09	3,33%	2,19%
5	0,699	28,07	5,25	Válido	Válido
0,5	-0,301	31,58	0,45	4,30%	8,19%
0,5	-0,301	31,42	0,51	Válido	Válido

Ecuación de la recta:

$$y = -3,2878x + 30,4325$$

Ef.: 101,44 Evaluación: Válido

R2: 1,00 Evaluación: Válido

	min	max
*lim eficic.:	90	110
**lim R2:	0,98	

Ecuación de la recta para los cálculos:

Pendiente: -0,30344505 Coeficiente: 9,2371

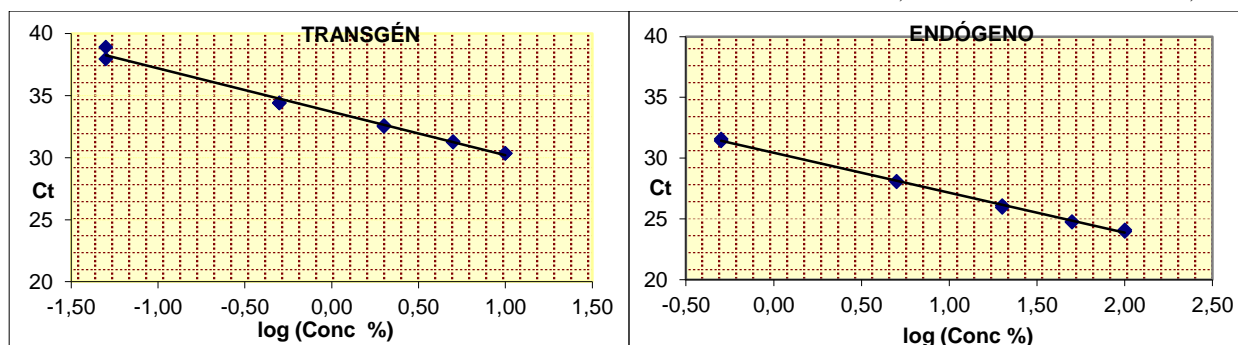


Figura 15: Rectas de regresión del ensayo de cuantificación de ADN de maíz (11/08/14-2).