

Manual de Protocolos de Medición de

Organismos Genéticamente Modificados

Organismos métodos me

diciones plantas

trazabilidad μL

Genéticamente

matriz **SONDAS**

PCR

iniciadores LOD dilución

amplificación $^{\circ}\text{C}$

Modificados nanolitros

cuantitativo digital

Materiales de Referencia

curvas de calibración especificidad

MANUAL DE PROTOCOLOS DE MEDICION

Elaborado con fondos del Proyecto Sectorial SAGARPA-CONACyT 2011-09-172352:

Centro Nacional de Metrología

Responsable Técnico: Dr. Yoshito Mitani Nakanishi

Responsable Administrativo: C.P. Guillermo Salomón Villalobos Castrejón

Director General del CENAM: Dr. Héctor Nava Jaimes

CENAM

km 4.5 Carretera a los Cués,

Municipio El Marqués, Querétaro.

C.P. 76246 México Tel. (442) 2110500 al 04

Correo electrónico: meperez@cenam.mx

2

Compilado y escrito por:

Dr. Melina Pérez Urquiza. Coordinador Científico. Líder de la Demanda Específica 4. CENAM

M.C. Judith Rivera Mellado e I.B.Q. Edna Alejandra Matus Cundapi. Contratadas por CENAM con fondos del proyecto.

Esta publicación ha sido revisada por:

M.C. Abraham Itzcoatl Acatzi Silva. CNRDOGM-SENASICA-SAGARPA

M.C. Maria Guadalupe Barrera Andrade. CNRDOGM-SENASICA-SAGARPA

©2013 por el Centro Nacional de Metrología
Secretaría de Economía

Primera Edición consta de 1000 ejemplares

Reservado todos los derechos

ISBN: 978-607-96162-4-3

Ninguna parte de esta publicación puede ser reproducida, almacenada en un sistema o transmitida, en ninguna forma o en ningún medio, electrónico, mecánico, fotocopia, grabado, sin el permiso de los copropietarios. Para simplificar la información, se han utilizado los nombres de los productos comerciales. Este manual no pretende recomendar productos nombrados o ilustrados, como tampoco existe una crítica implícita de productos similares que no se mencionan o ilustran.



FOTO DEL EDIFICIO DE
LABORATORIOS ESPECIALES "ELE"
CENAM. MÉXICO.



Presentación

Marco legal

LBOGM

Las plantas genéticamente modificadas (como el tomate resistente a insectos) tuvieron su penetración formal en el campo mexicano en el año de 1988. Y desde entonces, la Secretaría de Agricultura, actualmente denominada SAGARPA siendo una dependencia del poder ejecutivo federal; ha sido la responsable en todo lo que a Organismos Genéticamente Modificados en vegetales, animales, insumos fitozoosanitarios y especies pesqueras y acuícolas compete. De tal forma, que con las facultades y atribuciones que se le confieren, delegó en el director en Jefe del SENASICA la responsabilidad de formular, revisar y proponer la expedición de los acuerdos, avisos, normas oficiales mexicanas y demás instrumentos que en materia de OGMs se trate. A los titulares de las Direcciones Generales de Salud Animal y de Inocuidad Agroalimentaria, Acuícola y Pesquera, les corresponde resolver sobre las solicitudes y, en su caso, emitir los permisos correspondientes de liberación en programas piloto, experimentales, comerciales, y a la importación de OGMs; así como aplicar las medidas de seguridad y de urgente aplicación, en los casos previstos por la LBOGM y su Reglamento.

La Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM) en México fue publicada en el DOF en el año 2005. Esta Ley tiene por objeto regular las actividades de utilización confinada, liberación experimental, liberación en programa piloto, liberación comercial, comercialización, importación y exportación de organismos genéticamente modificados, con el fin de prevenir, evitar o reducir los posibles riesgos que estas actividades pudieran ocasionar a la salud humana o al medio ambiente y a la diversidad biológica o a la sanidad animal, vegetal y acuícola (Primer Artículo). En su artículo 19 establece que la CIBIOGEM es una Comisión Intersecretarial que tiene por objeto formular y coordinar las políticas de la Administración Pública Federal relativas a la bioseguridad de los OGMs. Derivado de las reuniones de la CIBIOGEM junto con el comité de establecimiento de la red nacional de laboratorios de detección de OGMs celebradas durante el 2008, fueron generados los siguientes acuerdos:

....El establecimiento y mantenimiento de un Laboratorio Nacional de Referencia que coadyuve a promover el desarrollo de metodologías armonizadas y protocolos para la identificación, detección y cuantificación de OGMs.

.....El establecimiento de una Red de Laboratorios de Detección, Identificación y cuantificación de Eventos de Transformación de OGMs.



Continuación de la presentación

Marco legal

LFMN

La Ley Federal de Metrología y Normalización fue publicada en el DOF en el año de 1992. Esta Ley tiene por objeto en aspectos de metrología (Artículo 2):

- Establecer el Sistema General de Unidades de Medida.
- Precisar los conceptos fundamentales sobre metrología.
- Crear el Centro Nacional de Metrología, como organismo de alto nivel técnico en la materia; y
- Regular, en lo general, las demás materias relativas a la metrología.

Del Artículo 29: El CENAM es un organismo descentralizado con personalidad jurídica y patrimonio propio, con objeto de llevar a cabo funciones de alto nivel técnico en materia de metrología.

Dentro de las funciones del CENAM se encuentran (Artículo 30):

- Promover y realizar actividades de investigación y desarrollo tecnológico en los diferentes campos de la metrología, así como coadyuvar a la formación de recursos humanos para el mismo objetivo.
- Asesorar a los sectores industriales, técnicos y científicos en relación con los problemas de medición y certificar materiales patrón de referencia.
- Participar en el intercambio del desarrollo tecnológico con organismos nacionales e internacionales y en la intercomparación de los patrones de medida.
- Organizar y participar, en su caso, en congresos, seminarios, conferencias, cursos o en cualquier otro tipo de eventos relacionados con la metrología.
- Celebrar convenios de colaboración e investigación metrológica con instituciones, organismos y empresas tanto nacionales como extranjeras.

Bajo este marco legal, el CENAM presenta el **Manual de protocolos de medición de organismos genéticamente modificados** en cumplimiento de las actividades derivadas del Proyecto 2011-9-12352 del Fondo Sectorial de Investigación en Materias Agrícola, Pecuaria, Acuicultura, Agrobiotecnología y Recursos Fitogenéticos. (Fondo Sectorial SAGARPA-CONACyT 2011-9-172352) denominado "Desarrollo de materiales de referencia certificados, validación de métodos y fortalecimiento de la infraestructura de soporte de las redes de laboratorios para la inocuidad y calidad alimentaria".

Agradecimientos:

A los asistentes de proyecto que participaron en los trabajos de validación de metodología por PCR tiempo real y digital, desarrollo y certificación de materiales de referencia, realizando sus respectivas tesis de licenciatura: I.B.Q. Ana Cristell Gómez de la Cruz, I.B.Q. Brenda Paola Navarrete Ruiz, I.B.Q. Alejandra del Carmen Ibarra Díaz e I.B.Q. Anabell Salazar Macareno. Así mismo por el apoyo recibido en la revisión de este manual a Q.A. Blanca Estela Gómez Castelo, Q.F.B. Karina Montes Rodríguez, Q.F.B. José Luis Juárez Vargas y M.C. Felipe de Jesus Arguijo Pérez del CNRDOGM.



Introducción

Los protocolos de medición incluidos en este manual, son los protocolos generales desarrollados por el Centro Nacional de Referencia en Detección de Organismos Genéticamente Modificados (CNRDOGM) en sus versiones corregidas por los integrantes de la red mexicana de laboratorios de detección de OGMs (RNLD-OGM) y que fueron empleados durante los ejercicios de comparación para la medición de OGMs en maíz, trigo y soya. Los métodos seleccionados para la medición del promotor 35S y evento MON en soya son los previamente utilizados y publicados por el JRC de la comisión Europea, y están basados en la cuantificación del ADN.

Los laboratorios participantes de la red mexicana para la detección de OGM; cubren los requisitos de inclusión marcados por el comité integrador de la red, entre los que se destacan:

1. Implementación de un sistema de gestión de la calidad con base en la norma ISO-IEC 17025:2005.
2. Contar con un laboratorio diseñado de acuerdo a las indicaciones de la Guía ISO 24276.
3. Aportar métodos o protocolos para la detección de OGM.

En este manual, el glosario de términos ha sido integrado por los conceptos fundamentales y generales del Vocabulario Internacional de Metrología (VIM), se han incluido las definiciones al castellano de la norma Española UNE-EN ISO 24276 y definiciones del glosario de la CIBIOGEM, México. En el Capítulo 1, se mencionan los principios de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR); sin embargo, no se profundiza en los aspectos elementales de esta técnica, únicamente se enfoca en los protocolos de medición validados para las matrices de maíz, soya y trigo. En el Capítulo 2, se describen los requisitos generales para la organización de un laboratorio que realice análisis de OGM por medio de la técnica de PCR. El Capítulo 3, contiene información para la selección de los métodos de análisis de OGM. El capítulo 4, contempla diferentes métodos de extracción de ADN. Los Capítulos 5, 6 y 7, describen las generalidades de los métodos de análisis de OGM como: detección de proteínas, métodos cualitativos y cuantitativos. En el Capítulo 8, se describen los cinco protocolos validados en los ejercicios de comparación realizados dentro de la RNLD-OGM. El Capítulo 9, enlista los documentos y las normas que fueron revisadas y estudiadas para la escritura de los capítulos del manual. Finalmente, en el capítulo 10, se presenta el Glosario y el Vocabulario Internacional de Metrología (VIM).



INSTITUTOS PARTICIPANTES

CCAYAC-SALUD. Centro de Control Analítico y Ampliación de Cobertura.
 CENAM. Centro Nacional de Metrología. Área Metrología de Materiales. División Materiales Orgánicos. Laboratorios Q10 y BIO.

CIATEJ. Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. Unidad de Servicios Analíticos y Metrológicos.

CIBIOGEM. Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados.

CICY. Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán. Laboratorio GemBio. Grupo de Estudios Moleculares Aplicados a la Biología.

CINVESTAV. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. Unidad Irapuato. Departamento de Ingeniería Genética.

CINVESTAV. Unidad Zacatenco. Departamento de Biotecnología.

CIRCE-INIFAP. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Unidad de Biotecnología. Laboratorio de Cultivo de Tejidos.

CNRDOGM. Centro Nacional de Referencia en Detección de Organismos Genéticamente Modificados. SENASICA-SAGARPA.

IPN. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Biotecnología Genómica.

PUAL-UNAM. Programa Universitario de Alimentos.

UACH. Universidad Autónoma de Chihuahua. Facultad de Ciencias Químicas.

UANL. Universidad Autónoma de Nuevo León. Instituto de Biotecnología.

UCOL. Universidad de Colima. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Laboratorio de Biotecnología.

UANL. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas.

INE- SEMARNAT. Instituto Nacional de Ecología. Centro de Investigación y Capacitación Ambiental.



Figura 1. Red Mexicana de Laboratorios de Detección de OGMs.

Todas estas instituciones conforman la Red Mexicana de laboratorios de detección de OGM (Fig. 1) (RNLD-OGM) la cual fue presentada de manera oficial por la CIBIOGEM en octubre de 2012 (Figura 2).



Figura 2: Representantes de la RNLD-OGM (www.cibiogem.gob.mx).



CALIDAD

Los resultados emitidos por los laboratorios que realicen pruebas y/o análisis de detección de OGM deben ser precisos, exactos y confiables, ya que si fueran erróneos las consecuencias económicas y legales para los clientes pueden ser de gran importancia. A continuación, se ejemplifican algunas problemáticas derivado de ello:

a) Emisión de un resultado **falso-negativo**, este resultado puede causarle problemas al cliente, en caso de que las autoridades competentes o laboratorios oficiales detecten resultados positivos.

b) Emisión de un resultado **falso-positivo**, le representará al cliente una posible pérdida de ingresos.

Debido a lo anterior, la confiabilidad de los resultados en la detección de OGM emitidos por un laboratorio es **esencial** para las industrias y productores.

A causa de las innumerables fuentes de variación que hay durante el proceso, el laboratorio necesita contar con un Programa de Aseguramiento de la Calidad (PAC).

Al respecto, existen Normas Internacionales que contienen los requisitos que los laboratorios de prueba deben cumplir. Tal es el caso de la Norma ISO/IEC 17025:2005, la cual es aplicable a los laboratorios que realizan pruebas de ensayo y calibración. Esta norma establece los requisitos de calidad referentes a la gestión y técnicos del laboratorio. A continuación, se enlistan algunos de los requisitos técnicos que a su vez involucran la exactitud y confiabilidad de los ensayos para detección, identificación y cuantificación de OGM:

- Competencia del personal:
Requisito para desarrollar las pruebas, evaluar resultados, firmar informes, etc.

- Condiciones ambientales adecuadas, esto es; que exista una separación efectiva entre las diferentes áreas de las etapas del análisis y de esta forma evitar que sean afectados los resultados de la medición.
- Uso de métodos validados y apropiados para el propósito del uso, significa que el laboratorio ha desarrollado procedimientos y pruebas específicos que satisfacen las necesidades del cliente.
- Que los métodos validados y usados por el laboratorio sean los publicados en normas oficiales y preferentemente en su última versión.
- El laboratorio cuenta con el equipo requerido para un desarrollo correcto de las pruebas.
- Que el equipo es operado por personal capacitado y el laboratorio cuenta con un programa de mantenimiento para asegurar una función apropiada de los instrumentos y/o equipos.

Sin embargo, para armonizar los resultados generados entre los laboratorios que realicen la detección de OGM, los requisitos técnicos de la norma ISO/IEC 17025:2005 no son suficientes. Por lo que fueron desarrolladas las normas internacionales del CODEX e ISO que son específicas para la detección de OGM, las cuales son tituladas (en inglés) -“Foodstuffs-Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products”- y se dividen en:

ISO 21568: 2003 Sampling

ISO 21569: 2005 Qualitative nucleic acid based methods.

ISO 21570: 2005 Quantitative nucleic acid base methods

ISO 21571: 2005 Nucleic acid extraction



ISO 21572: 2004 Protein based methods
ISO 24276: 2006 General requirements and definitions.

A la fecha, estas normas técnicas internacionales cubren los métodos de análisis para la detección de OGM en matrices alimenticias, pero pueden ser de utilidad también para muestras como: semillas, alimento de ganado y plantas.

ACREDITACIÓN

La acreditación de los laboratorios es un medio que determina la competencia técnica para desarrollar ciertos tipos específicos de pruebas, mediciones y/o calibraciones.

La acreditación otorga al laboratorio un reconocimiento oficial (formal) como laboratorio competente; consecuentemente los usuarios del laboratorio o clientes pueden identificar y seleccionar los servicios de éste, confiando en la satisfacción de sus necesidades, así como en la calidad y confiabilidad de los resultados.

Los requisitos para evaluar a los laboratorios se basan en normas de referencia internacionales: ISO/IEC 17025 o ISO 15189 (para laboratorios clínicos), por lo que si existen acuerdos de reconocimiento mutuo, los laboratorios serán también competentes a nivel internacional.

En la acreditación, se evalúan factores relevantes como:

- Competencia técnica del personal de laboratorio
- Métodos de prueba válidos y apropiados

- Trazabilidad de las mediciones y calibraciones hacia patrones nacionales
- Mantenimiento y calibración de los equipos de prueba
- Pruebas de medio ambiente
- Muestreo, manejo y transporte de muestras
- Aseguramiento de la calidad de los datos de calibración y de prueba

En México, la evaluación de la conformidad se realiza por las dependencias competentes o por los Organismos de Certificación (OC), los Laboratorios de Pruebas (LP) o de Calibración (LC) y por las Unidades de Verificación (UV) acreditados y, en su caso, aprobados.

La acreditación de estos organismos, laboratorios y unidades es realizada por las Entidades de Acreditación (EA) autorizadas, conforme lo establecen los artículos 68 y 69 de la Ley Federal de Metrología y Normalización (LFMN), siendo la Entidad Mexicana de Acreditación (EMA) la única a nivel nacional (Corral, 2007).

Los laboratorios de la Unión Europea (UE) utilizan tecnología moderna en las mediciones OGM, en su mayoría son laboratorios acreditados en ISO/IEC 17025:2005. Sus metodologías han sido adaptadas y validadas en México por la Red Nacional de Laboratorios de detección, identificación y cuantificación de OGM (RNLD-OGM) y forman la base para la elaboración de los protocolos de medición armonizados que son descritos en este manual.

En México es de interés, que se logren alcanzar y cumplir los estándares internacionales establecidos para la competitividad y el comercio internacional, en particular los laboratorios de Biología Molecular destinados al análisis de OGM deben de mostrar competencia técnica para



MANUAL DE PROTOCOLOS DE MEDICION

asegurar confiabilidad y garantizar certeza en la emisión de resultados. Lo anterior se logra cuando el laboratorio adopta una cultura de calidad para ser reconocido en su competencia técnica por una Entidad de Acreditación.

Actualmente, a través del CENAM, la CIBIOGEM y la RNLD-OGM; se desarrollan las bases técnicas que sustentarán la normatividad mexicana

referente al uso de metodologías y protocolos para la detección, identificación y cuantificación de OGM, en maíz, soya y trigo mediante protocolos de PCR validados, como son las variantes de punto final, tiempo real y digital; esta última actualmente implementada en el CENAM y en el CNRDOGM.



ÍNDICE

| | | |
|------------|---|----|
| 1. | Generalidades de la técnica de PCR | 12 |
| 2. | Requisitos Generales para la organización de un laboratorio que desarrolle métodos para la detección de OGM | 13 |
| 3. | Guía para la selección de métodos | 19 |
| 4. | Descripción de las Buenas Prácticas para la Extracción del ADN | 21 |
| 5. | Métodos para la detección de OGM basados en ensayos inmunológicos | 30 |
| 6. | Métodos cualitativos para el análisis de OGM | 34 |
| 7. | Métodos para cuantificar OGM | 36 |
| 8. | Protocolos de medición | 37 |
| 8.1 | Maíz | |
| i. | Método cuantitativo del evento MON 810 | 38 |
| ii. | Método cuantitativo para el promotor P35S | 41 |



8.2 Soya

- i. Método cuantitativo para el promotor P35S 45
- ii. Método cuantitativo para MON 04032-6 48

8.3 Trigo

- i. Método cuantitativo para Dreb-1 52

9. BIBLIOGRAFÍA 56

10. ANEXOS 58

I Glosario de términos comúnmente usados en el área

II Glosario de los términos y definiciones de ISO 24276

III Vocabulario Internacional de Metrología (VIM)

IV Lista de abreviaturas

V Controles de amplificación de ADN en PCR

VI Reactivos, disoluciones y matrices alimenticias validadas por el método CTAB

VII Reactivos, disoluciones y matrices alimenticias validadas por el método del fenol/cloroformo



Capítulo 1

PCR

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa o conocida como PCR (por sus siglas en inglés: *Polymerase Chain Reaction*) es una técnica molecular empleada para la amplificación de fragmentos de ADN que utiliza una enzima ADN polimerasa para su síntesis. Usualmente se emplea la polimerasa de la bacteria *Thermus aquaticus*.

Basándose en las regiones a amplificar, la técnica de PCR se puede dividir en dos categorías:

- Amplificación de un solo sitio del genoma (locus). En este tipo de PCR se requiere conocer la secuencia que se trabaja.
- En los que no es necesario conocer la región que se está amplificando. En este tipo de técnica de PCR no se sabe el tamaño del(os) fragmento(s).

OGM

La ley de bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados define como un Organismo Genéticamente Modificado, a cualquier organismo vivo, con excepción de los seres humanos, que ha adquirido una combinación genética novedosa, generada a través del uso específico de técnicas de la biotecnología moderna.



Capítulo 2

Requisitos Generales para la organización de un laboratorio que desarrolle métodos para la detección de OGM

Aseguramiento de la calidad

El laboratorio debe cubrir: los requerimientos aplicables en relación con los reglamentos y normas de seguridad vigentes; las recomendaciones de seguridad de los fabricantes y concordar con las directrices indicadas en la Norma NMX-EC-17025-IMNC-2006 (ISO/IEC 17025:2005).

Diseño de laboratorio

El diseño del laboratorio debe evitar la contaminación accidental de ADN debida a la posible formación y la dispersión de aerosoles y del polvo del medio ambiente del laboratorio. Por lo que, **obligatoriamente** el trabajo del laboratorio que desarrolle métodos para la detección de organismos genéticamente modificados debe estar organizado y contenido en etapas metodológicas y siguiendo un flujo “hacia adelante” (*forward flow*, en inglés) para el manejo de las muestras.

En los laboratorios en los que se utilicen **métodos de detección basados en ADN** y la reacción en cadena de la polimerasa PCR, el diseño del laboratorio debe contar al menos con cuatro áreas

de trabajo clasificadas como a continuación se indica:

- Área de molienda y homogenización;
- Área de extracción de ácidos nucleicos del material de prueba;
- Área de trabajo para las reacciones de amplificación con PCR;
- Área dedicada a los procesos subsecuentes, tales como: el análisis y la caracterización de las secuencias de ADN amplificado; según aplique.

En el caso de que las técnicas de molienda para la preparación de la muestra produzcan partículas de polvo, considerar que este trabajo se debe realizar en un área de trabajo adicional.

Se ha observado, que resulta más efectivo el empleo de cuartos separados físicamente para la instalación de las diferentes áreas de trabajo (Fig. 3); sin embargo, el laboratorio podrá utilizar otras estrategias para evitar una contaminación cruzada al máximo. Lo cual deberá ser demostrado y comprobado por el laboratorio en cuestión.



Figura 3. Ejemplo del diseño de un laboratorio de 390 m² aproximadamente, con áreas de trabajo separadas para el análisis de OGM. Las áreas y las medidas de superficie de cada una son: 1. Gene Lab 24 m², 2. Secuenciación 24 m², 3. Esterilización con una área de 4 m², 4. Molienda 32 m², 5.



MANUAL DE PROTOCOLOS DE MEDICION

Sanitarios 4 m², 6. Almacén frío 9 m², 7. Biología Molecular 36 m², 8. Preservación de ADN 20 m², 9. Esclusas 36 m², 10. Acondicionamiento de muestras 60 m², 11. Pasillos 59 m² y 12. Almacén 36 m². Cortesía del CNRDOG 2012.

Del personal

Todo el personal que realice mediciones y desarrolle la metodología para la detección, identificación y cuantificación de OGM debe estar capacitado en las técnicas y/o métodos apropiados.

El personal debe usar diferentes batas de laboratorio en las diferentes áreas de trabajo. Por ejemplo, en el área de molienda o en el área de post-PCR. Así mismo, debe usar guantes desechables. Si es posible, debe evitarse la utilización de guantes con talco (polvo); ya que puede inhibir o contaminar las reacciones de PCR. Ver Figura 4.

Hasta donde sea posible todas las reacciones de PCR deben llevarse a cabo bajo condiciones de esterilidad (no contaminantes).

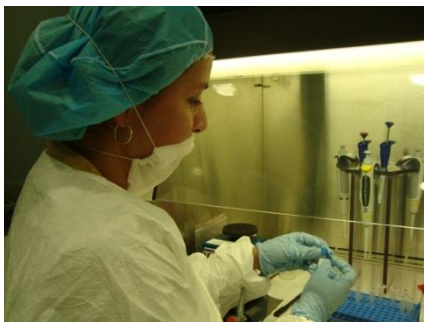


Figura 4. Uso de equipo personal desechable: cofia, guantes, cubrebocas.

Equipos

El responsable del laboratorio debe considerar que el equipo sea:

- Adecuado para su propósito.
- Mantenido en las mejores condiciones de funcionamiento y calibración del mismo.

- Operado de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Las siguientes imágenes (Fig. 5, 6, 7, 8 y 9) muestran algunos equipos que se emplean en laboratorios donde se desarrollan métodos de detección de OGM's:



Figura 5. Balanza analítica de alta precisión (por ejemplo: 230 g ± 0,01 mg) para preparación gravimétrica; pesado de muestras y/o reactivos.



Figura 6. Centrífuga refrigerada para precipitación de analitos.



MANUAL DE PROTOCOLOS DE MEDICION



Figura 7. Juego de micropipetas-autoclaveables.



Figura 8. Microcentrífuga de 6,000 g.



Figura 9. Agitador para homogenización y/o rompimiento celular

Materiales y Reactivos

Especificaciones técnicas y Buenas Prácticas

- Todos los reactivos empleados en la técnica de PCR deben ser grado biología molecular; libre de ADN y ADNasas.
- Los reactivos deben almacenarse a temperatura ambiente; a menos de que se especifique lo contrario.
- Los reactivos de PCR deben almacenarse en pequeñas alícuotas en la medida de lo posible para evitar riesgos de contaminación.
- Preparar las disoluciones disolviendo las cantidades apropiadas de reactivos en agua grado biología molecular y esterilizarlas. También pueden filtrarse las disoluciones empleando para ello un filtro de diámetro de poro igual a $0,22\ \mu\text{m}$; en caso de no contar con un esterilizador apropiado.
- Con el fin de prevenir contaminaciones, deben adoptarse técnicas estériles en el área de preparación de la técnica de PCR; por ejemplo: Usar en la medida de lo posible material de plástico estéril; material desechable, guantes libres de polvos, puntas de micropipetas con filtros para aerosoles.
- El personal del laboratorio debe seguir las recomendaciones de los fabricantes para la utilización de los reactivos.
- Emplear controles apropiados para asegurar la integridad de los reactivos y la ausencia de ADNasas.
- Durante la preparación, no deben estar presentes, enzimas con actividad no deseada (por ejemplo: las enzimas exonucleasas) que puedan interferir con la reacción de PCR.
- Se recomienda emplear un *buffer* de reacción adecuado para el tipo



de polimerasa que va a ser utilizada.

Interpretación y expresión de los resultados

General

Para los métodos cuantitativos que utilicen la PCR, la expresión de resultados se basa en la Guía ISO 21570 e ISO 21572.

No deben reportarse resultados que resulten ambiguos.

Interpretación de los controles

Cada control tiene un valor que es válido y, si el resultado observado para alguno de los controles es diferente del valor válido, el análisis debe ser repetido. Los **controles ambientales** pueden ser positivos (detección del producto de amplificación del tamaño esperado) o negativos (no detección del producto amplificable), pero un resultado positivo siempre debe dar origen a medidas para eliminar y prevenir la contaminación del ambiente del laboratorio.

Si se obtiene repetidamente un resultado no válido para alguno de los otros controles, deben tomarse medidas para localizar y eliminar o reemplazar la(s) fuentes(s) responsables del error, y debe entonces repetir los análisis.

Los resultados analíticos deben ser emitidos sólo cuando todos los controles ofrezcan resultados válidos. Los valores válidos para los controles se enlistan a continuación:

- Los controles positivos de extracción **siempre** deben ser positivos
- Los controles blanco de extracción **siempre** deben ser negativos

- Los controles positivos del ADN diana **siempre** deben ser positivos
- Los controles negativos del ADN diana **siempre** deben ser negativos
- Los controles de reactivo (Not Template Control, NTP; siglas en inglés) **siempre** deben ser negativos.

Ver Tabla No.1. Interpretación de los controles de PCR para informe de resultados de la muestra.

Expresión de un resultado negativo

Un resultado negativo nunca debe ser expresado como cero o “OGM no presente”

En el informe de análisis debe aparecer la siguiente frase:

“Para el analito diana X, no se detecta material derivado de OGM”.

Además, el informe del análisis debe incluir información sobre:

- Límite de detección (LD) del método validado en una matriz específica, y el
- Límite de detección práctico para la matriz, basado en la experiencia del laboratorio o en la muestra analizada (o una declaración en una norma nacional ó internacional).

El límite de detección práctico debe ser mayor o igual que el LD del método validado.



Expresión de un resultado positivo

En el informe de análisis debe aparecer la siguiente frase o una equivalente:

“Para el analito diana X, se ha detectado la presencia de material derivado de (consignar la secuencia diana específica).”

Debe incluirse la identidad del OGM, si se conoce.

Expresión de resultados ambiguos

Los resultados de todas las porciones deben ser consistentes. Cuando al menos una de las etapas del análisis da un resultado positivo y al menos una da un resultado negativo, el análisis debe repetirse.

Si al menos dos repeticiones del procedimiento (empezando con la extracción de ácidos nucleicos) da resultados ambiguos como un resultado positivo y el otro negativo, el informe debe establecer que la muestra es negativa al límite de detección como se indica en las Normas ISO 21569 e ISO 21570.

Informe del análisis

El informe del análisis debe contener al menos la siguiente información:

- a) Toda la información necesaria para identificar la muestra de laboratorio;
- b) Cualquier información particular relacionada con la muestra de laboratorio (por ejemplo, tamaño insuficiente, estado degradado):

- c) Referencia a la norma nacional o internacional utilizada como referencia y del(los) respectivo(s) anexo(s)
- d) Información sobre la fecha y tipo(s) de procedimiento(s) de muestreo utilizado;
- e) Fecha de recepción de la muestra
- f) Condiciones de almacenamiento, si procede;
- g) Inicio y fin de análisis, si procede,
- h) Persona responsable del análisis,
- i) Tamaño de la muestra de laboratorio y de la muestra para análisis,
- j) Resultados de acuerdo a los requisitos del método específico y de las unidades utilizadas para referir los resultados de las calibraciones así como el método de cálculo utilizado;
- k) Cualquier observación particular realizada durante el análisis;
- l) Cualquier desviación, adiciones a, o exclusiones de la especificación del análisis;
- m) Requisitos como se especifica en el capítulo del informe del análisis de las Normas ISO 21569 o ISO 21570;
- n) Cualquier declaración requerida como se especifica en el apartado de interpretación y expresión de los resultados.



MANUAL DE PROTOCOLOS DE MEDICION

Los dos últimos incisos (m y n), se refieren a las particularidades de cada método descrito en ambas normas (ISO 21569 y 21570).

La información debe proporcionarse considerando **las unidades de medida**. **La incertidumbre de medición y sus niveles de confianza** deben estar disponibles para el usuario de los resultados, si los solicita.

Tabla No. 1 Interpretación de los controles de PCR para informe de resultados de la muestra.

| Muestra analizada | Control positivo de extracción | Control blanco de extracción | Control negativo ADN diana | Control positivo ADN diana | Interpretación de resultados |
|-------------------|--------------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------|
| + ^a | + | -- | - ^b | + | Positivo |
| - | + | - | - | + | Positivo |
| + | + | + | - | + | No concluyente ^c |
| - | - | + | - | - | No concluyente ^c |
| - | - | - | - | - | No concluyente ^d |

^aEl producto de PCR es detectable.
^bEl producto de PCR no es detectable.
^cEl proceso se repite, comenzando con el paso de extracción (posible contaminación).
^dEl proceso se repite, utilizando otro método de extracción o un paso posterior de purificación (posible inhibición).

* Tabla adaptada de ISO 24276:2006



Capítulo 3

Guía

para la selección de métodos

Tanto la especificidad del analito diana como los métodos de detección varían considerablemente. Por ello, es importante, asegurar que el (los) método(s) seleccionado(s) proporcione(n) la especificidad requerida. A continuación, se proporcionan las características de los métodos existentes a consideración del usuario.

I Métodos basados en la detección de proteínas

Las proteínas pueden ser detectadas empleando anticuerpos particulares. En este caso, un anticuerpo en particular se produce usualmente para detectar una proteína única. El grado de afinidad para la proteína depende de la conformación de la proteína después de su extracción. Es necesario demostrar la especificidad del anticuerpo utilizado (por ejemplo, que no exista reactividad cruzada). La detección del OGM mediante el método evento específico por la cuantificación de proteínas no podrá ser efectuada de forma exacta, si es que hay más de un evento de OGM que exprese la misma proteína.

Los métodos de tamiz son útiles para evaluar si un producto contiene o no material derivado de OGM, basándose en la presencia de la proteína expresada. Algunos métodos de tamiz son los

inmunoensayos o ELISAs cualitativos y el formato de tiras de detección de flujo lateral (Lateral flow/dipstickformat, en inglés).

Como se comentó con anterioridad, en ciertas matrices la cuantificación de OGM puede efectuarse mediante pruebas de ELISA. Para lo cual el método debe ser validado por matriz y deben estar disponibles los patrones (*standards*, en inglés) para establecer la curva de calibración, a partir de la cual se pueda realizar el cálculo del contenido de proteínas en las muestras de interés.

II Métodos basados en la cuantificación de ADN

La especificidad de los métodos de cuantificación de ADN para determinar la presencia de material derivado de OGM depende de **las propiedades específicas** de la secuencia de ADN a detectar. A continuación, se describen los métodos clasificados de acuerdo a su especificidad, así como sus diferentes aplicaciones.

A) Métodos específicos del taxón

Detectan secuencias de ADN que se encuentran en un único taxón, generalmente especie pero posiblemente de inferior o superior rango taxonómico. Los métodos específicos del taxón son útiles para evaluar la presencia, la calidad y la cantidad de ADN derivado del taxón, y en ocasiones pueden utilizarse como punto de referencia para la cuantificación relativa de material derivado de OGM.



La especificidad necesita ser establecida mediante datos experimentales.

B) Métodos de tamiz

Detectan secuencias de ADN que se encuentran en varios pero no necesariamente en todos los eventos de transformación. Estas secuencias pueden encontrarse también en material no modificado genéticamente; por ejemplo, debido a la presencia natural de virus y bacterias. Los métodos de tamiz son útiles para evaluar si es probable que un producto contenga o no material derivado de OGM. Un ejemplo de método de tamiz es la reacción en cadena de la polimerasa cualitativa para detectar el promotor CaMV 35S.

C) Métodos específicos de la construcción.

Detectan secuencias de ADN que se encuentran solamente en el material derivado de organismos genéticamente modificados, como por ejemplo: las combinaciones de elementos de secuencias de ADN realizadas por medio de la ingeniería genética. La detección

de una construcción génica particular, es suficiente para la identificación del evento de transformación del cual ha derivado el ADN, pero la misma construcción génica puede haber sido utilizada en más de un evento de transformación, y el número de copias insertadas o la construcción génica completa o truncada puede variar entre eventos.

D) Métodos específicos del evento.

Detectan secuencias de ADN que se encuentran solamente en el material derivado de un único evento de transformación, generalmente una secuencia de ADN que abarca la unión entre el ADN insertado y el genoma del huésped (región del borde de integración). El número de copias de la secuencia del ADN específico del evento siempre es uno por genoma modificado genéticamente haploide. Los métodos específicos del evento son útiles particularmente para la identificación de un evento específico y cuando se usan en un método de PCR en tiempo real validado, pueden también cuantificar la cantidad de ADN derivado de un OGM en particular.



Capítulo 4

Descripción de las Buenas Prácticas para la Extracción del ADN

En principio, la extracción de ADN (ácido desoxirribonucleico) consiste en liberar el ADN de la matriz en la que está contenido; mediante diferentes métodos de extracción, con lo cual se obtiene ADN de pureza e integridad óptima para utilizarlo en los ensayos correspondientes, previo a ello debe ser purificado y finalmente cuantificado.

Más adelante, serán descritos algunos de los métodos de extracción/purificación de ADN. Mientras, se describen algunas de las consideraciones que *a priori* a la extracción deben efectuarse.

Preparación de la muestra para el análisis

Se debe asegurar que la porción de la muestra sea representativa de la muestra de laboratorio. Esto significa que contenga una cantidad suficiente de número de partículas (por ejemplo: 3 000 partículas en un límite de detección (LD) de 0.1%) para efectuar conclusiones válidas sobre una base estadística.

Sin embargo, por razones prácticas y técnicas no se recomienda que la muestra sea mayor a 2 g.

Se recomienda que las extracciones del ADN sean efectuadas al menos en dos porciones distintas de muestra.

Homogenización de las muestras

Las muestras de laboratorio deben ser homogenizadas, previo a la toma de las fracciones correspondientes.

Muestras líquidas

Se recomienda agitar el contenedor de la muestra para mejorar la homogenización del producto.

En el caso de productos líquidos no homogéneos, por ejemplo, aceites de materia prima, asegurarse de desprender los sedimentos pegados a las paredes del contenedor.

Matrices sólidas

Para matrices sólidas, es necesario realizar su molienda hasta reducir el tamaño de la partícula y de esta forma facilitar la extracción de ADN. Considerar también el número de partículas dentro de la porción de muestra. Por otro lado tampoco se recomienda reducir en demasía el tamaño de partícula ya que estas muestras son difíciles de manejar por la estática que presentan.

Productos alimenticios terminados

Con frecuencia, no resulta fácil lograr un tamaño de partícula en un solo paso del proceso de homogenización; sobre todo en algunos de los alimentos sólidos o en pasta que contienen alto contenido de lípidos. Así que, en ciertas ocasiones podrán adicionarse pasos al procedimiento de homogenización tales como: extracción de lípidos con hexano después de una molienda intermedia;



así como congelar o liofilizar la muestra antes de su molienda.

Existen, también ciertos tratamientos para facilitar la molienda en productos viscosos o en pasta como los descritos a continuación:

- Calentar la muestra a una temperatura máxima de 40 °C;
- Disolver la muestra en disolventes apropiados tales como el agua;
- Congelar la muestra a una temperatura menor o igual a -20 °C.

Cuidar que durante la molienda o el pulverizado; el calentamiento de la muestra se mantenga en un mínimo ya que este procedimiento puede provocar un impacto negativo sobre la calidad e integridad del ADN extraído.

Para el tratamiento previo de la muestra, se recomienda usar la totalidad de la misma para posteriormente acondicionar, homogenizar y obtener dos fracciones de ésta.

Se debe evitar en la medida de lo posible las técnicas de cernido/molienda que empleen la combinación de nitrógeno líquido y el uso de un mortero; ya que se podría ocasionar muy fácilmente una contaminación cruzada pues se generan polvos dentro del laboratorio. Por lo que, dichos tratamientos deberán realizarse exclusivamente en el área designada para la molienda y de esta forma evitar una contaminación cruzada.

Puede suceder que algunos procesos de purificación (preliminares) deban ser considerados en muestras con altos contenidos de sal, especies, azúcar en

polvo y/o sustancias que potencialmente puedan interferir con la extracción o el método analítico. Tal es el caso de las barritas de pescado empanizadas, que está considerada como una matriz compleja, y si el analito de interés (blanco) se encuentra en la capa del pan, entonces habrá que aislar dicha capa para la extracción del ADN.

Extracción/Purificación de ADN

Quando sea apropiado los procesos de extracción y la purificación de ADN podrán realizarse en un solo paso.

Al elegir una metodología de extracción de ADN, el analista deberá considerar que la calidad y el rendimiento del ADN sea siempre repetible y reproducible para la matriz en cuestión y para el método seleccionado.

Para obtener una calidad aceptable de ADN para los ensayos se debe eliminar:

- POLISACARIDOS (pectinas, celulosa, hemi-celulosa, almidón, adelgazadores (thickeners), etc.

Esto se consigue usando tratamientos enzimáticos apropiados: (pectinasas, celulasas, hemicelulasas, α amilasas); o bien empleando una extracción de tipo orgánica como (CTAB/cloroformo);

- RNA y/o PROTEÍNAS
Usar tratamientos enzimáticos con ribonucleasas y proteinasas respectivamente.

- FRACCIONES LIPÍDICAS
Usar para ello enzimas o disolventes como el hexano.



• SALES

Las sales contenidas tanto en los *buffers* de extracción y lisis empleadas en la precipitación de analitos no deseables; pueden interferir en el posterior análisis del ADN. Por lo que se recomienda, ajustar el volumen de los *buffers* de precipitación/lisis con el fin de asegurar la disolución del ADN.

Purificación de ADN

Este procedimiento puede llevarse a cabo mediante:

- Una precipitación fraccionada, usando disolventes como: fenol, cloroformo, etanol, isopropanol, etc. y,
- La adsorción del ADN sobre matrices sólidas tales como: resinas de intercambio aniónico, sílica o silicagel, tierras diatomeas, membranas, etc.

Todos estos medios, pueden combinarse durante la purificación.

El glicógeno, el polietilenglicol (PEG) y el RNA de transferencia (tRNA) (ambos co-precipitantes del ADN) pueden usarse para mejorar la recuperación del ADN durante las etapas de precipitación. Sin embargo, considerar que estos compuestos deben estar libres de actividad de nucleasas o no contener inhibidores/competidores de la técnica de PCR.

En caso de usar una liofilizadora para el secado de los *pellets* de ADN obtenidos, considerar que es una fuente potencial de contaminación.

Se recomienda que la re-suspensión del ADN, sea en agua o en una disolución *buffer* para prevenir su degradación.

Uso de controles

Al llevar a cabo estos procedimientos es recomendable incluir al menos un control de extracción blanco y un control de extracción positivo. Aunque también puede incluirse un control de ambiente (ver la Tabla No.2 del uso de controles del Anexo IV).

Control interno de PCR

Cada vez que se implemente en el laboratorio, un nuevo tipo de extracción de ADN, se puede estimar la presencia de inhibidores en el ADN extraído usando “*spikes*” de ADN.

La cantidad de ADN añadida no deberá exceder el nivel máximo de capacidad del equipo de PCR y deberá contener un número definido de copias de la secuencia blanco.

Es deseable que el ADN que conforma a los controles positivos sea lo más parecido al ADN de las muestras a ser analizadas.

Estabilidad del ADN extraído

Asegurar la estabilidad del ADN extraído almacenándolo bajo condiciones apropiadas. Se recomienda mantener la disolución a -20 °C.

Evitar al máximo el congelamiento y descongelamiento repetido de las muestras de ADN puro.



Métodos de extracción de ácidos nucleicos

A continuación, se describen tres métodos comúnmente usados para la extracción de ácidos nucleicos para ser utilizados en las diferentes técnicas de PCR tales como: punto final, y las cuantitativas: PCR tiempo real y PCR digital.

Método básico de CTAB

Es un método que puede ser empleado en la extracción de ADN en plantas y en las matrices derivadas de éstas, ya que este método tiene la habilidad de remover compuestos polifenólicos y polisacáridos que pueden afectar la calidad del ADN. La aplicación de este método es útil también para otras matrices (ver listado en Tabla No. 5 del Anexo VI).

Validación del método

El método CTAB ha sido validado mediante estudios colaborativos en Alemania.

Principio del método

El método consiste en la lisis térmica en presencia de CTAB (cetiltrimetil amonio), seguida de varias etapas de extracción para eliminar restos

celulares tales como polisacáridos y proteínas. Para algunas matrices será necesario el empleo de reacciones enzimáticas; por ejemplo: la enzima alfa amilasa se añade al buffer de lisis para la digestión de los almidones en matrices amiláceas.

La proteinasa-K se usa en una gran variedad de matrices para eliminar a las proteínas. También se recomienda el tratamiento con enzimas ribonucleasas, para las matrices en donde la coprecipitación del ARN puede interferir en la subsecuente prueba analítica. La concentración de la sal en los procesos de extracción de ADN también es muy importante para la eliminación de contaminantes. Un incremento en la concentración de sal (por ejemplo, el uso de cloruro de sodio) eliminará proteínas y polisacáridos al unirse con el CTAB, mientras que los ácidos nucleicos son solubilizados. Finalmente, los ácidos nucleicos son purificados mediante la precipitación con isopropanol y lavados con etanol.

A) Reactivos: Ver Anexo VI

B) Disoluciones: Ver Anexo VI

C) Equipos

- Horno o incubadora con agitador (de preferencia).
- Centrífuga, (por ejemplo: microcentrífuga de 12 000 g). En algunos pasos del procedimiento se requiere de una centrífuga refrigerada.
- Mezclador
- Secador de vacío (opcional)



Procedimiento

Extracción de la muestra

- i. Pesar de (200-300) mg de la muestra dentro de un microtubo de 2 mL.
- ii. Adicionar 1.5 mL de Buffer de extracción CTAB (previamente solubilizado). En algunos casos podrá requerirse una mayor cantidad de *buffer* para re-suspender la muestra.
- iii. Adicionar 10 μ L de disolución de α -amilasa (puede ser opcional), 10 μ L de disolución de ribonucleasa y mezclar suavemente.
- iv. Incubar por 30 min a 65 °C con agitación.
- v. Adicionar 10 μ L de disolución de proteínasa-K, (esta adición es opcional) agitar con un mezclador los microtubos de 2 mL e incubar por 30 min a 65 °C con agitación cada 15 minutos.
- vi. Centrifugar por 10 min a 12 000 g aprox. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo, adicionar de 0.7 a 1 volumen de cloroformo y mezclar completamente.
- vii. Centrifugar por 15 min a 12 000 g aprox., transferir la fase superior (acuosa) a un tubo nuevo.
- i. Adicionar 2 volúmenes de *buffer* de precipitación CTAB. Incubar durante 60 min a temperatura ambiente sin agitación.
- ii. Centrifugar por 15 min a 12 000 g. Desechar el sobrenadante.
- iii. Disolver el precipitado de ADN agregando 350 μ L de disolución de NaCl.
- iv. Adicionar 350 μ L de cloroformo y mezclar completamente.
- v. Centrifugar por 10 min a 12 000 g.
- vi. Transferir la fase acuosa a un microtubo de 2 mL nuevo.

NOTA: Como fue mencionado con anterioridad, la precipitación con CTAB no es para toda clase de matrices, solamente para las matrices ricas en proteínas y polisacáridos. Como alternativa, la purificación del ADN en fase sólida (mediante el uso de spin columnas) puede ser empleada ya que produce resultados equivalentes.

2. Precipitación de ADN

- i. Adicionar 0.6 volúmenes de isopropanol, mezclar suavemente invirtiendo el tubo de reacción y mantener a temperatura ambiente durante 20 min. Centrifugar por 15 min a 12 000 g.
- ii. Desechar el sobrenadante. Añadir 500 μ L de etanol al tubo e invertir el tubo varias veces. Este paso es crítico ya que asegura la completa eliminación del CTAB.



Centrifugar por 10 min a 12 000 g. Descartar el sobrenadante. Secar el *pellet* de ADN y nuevamente disolver en 100 µL de agua o *buffer* apropiado (por ejemplo: *buffer* TE).

Finalmente, se obtiene la disolución *stock* de ADN.

Método de extracción de ADN usando fenol /cloroformo

Es un método de rutina que puede ser empleado en un amplio rango de matrices (ver listado en Tabla No. 8 del Anexo VII).

El fenol es un compuesto muy útil tanto para la destrucción de nucleasas y la desnaturalización de proteínas. Sin embargo, se deberán tener en cuenta las propiedades corrosivas del fenol.

Validación del método

El método ha sido utilizado en todas las áreas de la biología, la medicina y la agronomía en los últimos 40 años. Pero no ha sido evaluado a través de ejercicios de comparación inter-laboratorio en la detección de OGM en productos comestibles.

Principio del método

El método consiste en la lisis térmica en presencia de dodecilsulfato de sodio y un alto contenido de EDTA, seguido de la separación (eliminación) de ciertos contaminantes tales como: moléculas lipofílicas, polisacáridos y

proteínas; así como la separación de nucleasas empleando para ello fenol y cloroformo. Al final se lleva a cabo la precipitación de ADN con etanol, para eliminar sales y el exceso de cloroformo. En este método, el paso crítico es la lisis celular.

A) Reactivos: Ver Anexo VII

B) Disoluciones: Ver Anexo VII

C) Equipos

- Baño de agua o incubadora con un intervalo de temperatura de trabajo de (60 a 70) °C.

- Centrífuga, de 10 000 g. En algunos pasos del procedimiento se requiere de una centrífuga refrigerada.

- Liofilizadora (opcional)

- Mezclador,

- Secador de vacío (opcional)

-Vasos de reacción con capacidad de congelamiento usando nitrógeno líquido.

Procedimiento

1. Extracción de la muestra

- i. Pesar 0.25 g de la muestra dentro de un microtubo de 2 mL.
- ii. Adicionar 1.6 mL de *Buffer* de lisis/extracción. (En matrices ricas en proteínas, adicionar 50 µl de disolución de proteinasa K).
- iii. Incubar de (60 a 70) °C de 30 min a 2 h (también puede ser toda la noche).



- iv. Adicionar disolución de ARNasa hasta una concentración final de 0.1 µg/mL. durante 5 min o por 1 h a -80 °C o a -20 °C durante la noche.
- v. Centrifugar por 30 min a 5 000 g. Recuperar el sobrenadante en un microtubo de 2 mL nuevo. Adicionar volumen 1:1 de fenol y mezclar suavemente. xi. Centrifugar al menos durante 15 min a 10 000 g (o hasta 13 000 g) a 4 °C. Cuidadosamente, descartar el sobrenadante.
- vi. Centrifugar por 10 min a 5 000 g. Recuperar la fase acuosa dentro de un microtubo nuevo de 2 mL. Adicionar un volumen 1:1 de la disolución de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) al sobrenadante y mezclar. xii. Con cuidado, lavar el *pellet* de ADN con 2 volúmenes de disolución de etanol al 70 %. Centrifugar al menos durante 15 min a 10 000 g a 13 000 g) a 4 °C. Cuidadosamente, descartar el sobrenadante. Este paso es esencial para remover las sales precipitantes que pudieran interferir con el siguiente análisis (por ejemplo: la amplificación del ADN mediante PCR).
- vii. Centrifugar por 15 min a 5 000 g. Recuperar la fase acuosa dentro de un microtubo de 2 mL nuevo. Este paso deberá repetirse una o más veces (depende de la matriz) hasta notar la interfase limpia. xiii. Secar el *pellet* de ADN y disolver en 100 µL de agua o *buffer* apropiado (por ejemplo: *buffer* TE). Esta constituirá la disolución *stock* de ADN.
- viii. Adicionar un volumen de disolución de cloroformo-alcohol isoamílico al sobrenadante y mezclar. Centrifugar por 10 min a 5 000 g. Recuperar la fase acuosa dentro de un microtubo de 2 mL nuevo. Este paso deberá repetirse una o más veces (depende de la matriz) hasta que note que la inter-fase entre las dos fases se observe limpia.
- ix. Mezclar el sobrenadante con 0.1 volúmenes de disolución de acetato de potasio y 2.5 volúmenes de disolución de etanol al 96 %, mezclar por inversión del microtubo.
- x. Incubar bajo atmósfera de nitrógeno líquido al menos

Otros protocolos de extracción con fenol/cloroformo

En la Guía ISO 21571-2005 se describen tres protocolos adicionales que emplean este método de extracción de fenol/cloroformo, cuyos títulos son los siguientes:

Protocolo para cultivos iniciadores de la fermentación de embutidos.

Protocolo para cultivos iniciadores de yogurt.



Protocolo para levaduras y/o hongos de tipo filamentosos cultivados en productos alimenticios.

Se recomienda revisar la Guía ISO 21571-2005 “Extracción de ADN” en caso de requerir su implementación en el laboratorio.

Extracción de ADN empleando un *kit* comercial

Validación del método

Este método ha sido validado por el CENAM.

A) Reactivos

- Columnas para ADN
- Enzima proteinasa K.
- Disolución TE 1 X (10 mM Tris-HCl, 1 mM Na-EDTA pH 8.0)
- Buffer de lisis.
- Buffer de unión
- Buffer de lavado
- Agua GBM

B) Equipos

- Incubadora con un intervalo de temperatura de trabajo de (60 a 70) °C.

- Centrífuga refrigerada, de 12 000 g. En algunos pasos del procedimiento se requiere de una centrífuga refrigerada.

- Microcentrífuga (con capacidad para tubos de microcentrífuga de 1.5 mL y 2 mL).

- Mezclador.

- Juego de micropipetas (10-1000) µL

- Pipetas Pasteur

- Frasco de reactivos

Procedimiento

1. Extracción de la muestra

- Pesar (100 ± 0.1) mg de la harina de la semilla en un tubo de (1.5 ó 2.0) mL.
- Agregar 400 µL del *buffer* de lisis y 10 µL de la enzima proteinasa K.
- Agitar vigorosamente durante 30 s. No dejar muestra pegada a la pared del vial.
- Incubar a una temperatura de 60 °C durante 30 min.
- Transcurridos 15 min agitar el vial con el dedo índice aprox. durante 30 s.
- Centrifugar a 10 000 rpm durante 10 min, usar una centrífuga refrigerada.
- Tomar el sobrenadante con ayuda de una pipeta Pasteur.



MANUAL DE PROTOCOLOS DE MEDICION

- Evitar tocar el material precipitado con la pipeta.
- viii. Colocar el sobrenadante en un tubo nuevo.
- ix. Agregar al sobrenadante 400 μ L de buffer de unión.
- x. Agitar vigorosamente durante 5 s.
- xi. Centrifugar a 6 000 rpm durante 30 s, usando una micro-centrífuga.
- xii. Colocar el sobrenadante dentro de la columna Fast ID.
- xiii. Centrifugar a 10 000 rpm durante 5 min.
- xiv. Colocar la columna dentro de un tubo nuevo e introducir este dispositivo a la centrífuga refrigerada.
- xv. Lavar la columna con 400 μ L de la disolución de etanol al 75 %.
- xvi. Centrifugar a 5 000 rpm durante 1 min.
- xvii. Desechar el líquido eluido de la columna en el frasco de residuos.
- xviii. Repetir dos veces los pasos 13 y 14.
- xix. Colocar el filtro de la columna dentro de un tubo nuevo.
- xx. Agregar 100 μ L de *buffer* 1X TE.
- xxi. Incubar a 65° C durante 10 min.
- xxii. Centrifugar a 5 000 rpm durante 2 min.
- xxiii. Desechar con precaución la columna de filtración.
- xxiv. Tapar el tubo. En este punto la disolución *stock* de
- ADN está lista para ser analizada y/o cuantificada.



Capítulo 5

Métodos para la detección de OGM basados en ensayos inmunológicos

Introducción

Los análisis para **detectar** OGM así como productos derivados de ellos, se han desarrollado para su monitoreo o identificación en una matriz dada. El fundamento de estos métodos, se resume en lo siguiente:

- Tomar una muestra representativa de la matriz a analizar;
- Extraer las proteínas;
- Detectar la proteína específica derivada del OGM bajo estudio.

Principio del método

La extracción de la proteína “blanco” se realiza de acuerdo a la matriz a estudiar. Se emplea un anticuerpo específico para detectar o medir de manera semi-cuantitativa la concentración de la proteína en la muestra.

Procedimiento general:

A) Reactivos

Se recomienda que para el análisis de OGM se usen solamente reactivos grado analítico reconocido; así como también agua desionizada, agua destilada, agua purificada o su equivalente.



Los reactivos tales como: anticuerpos, conjugados, sustratos, disoluciones de paro (stop) y los compuestos de las disoluciones buffer son compuestos **método-específicos**. Por lo que de acuerdo a la metodología a emplear deberán considerarse.

Todos los componentes del kit de detección deberán ser almacenados a una temperatura por debajo de 8 °C. Se recomienda verificar la fecha de caducidad de estos componentes antes de ser utilizados.

B) Disoluciones

Disolución de metanol al 70 % o etanol al 95 %.

Detergente para baño ultrasónico (opcional).

C) Equipos y materiales

De preferencia usar material de laboratorio con baja capacidad de enlace a proteínas (por ejemplo: tubos de propileno) con la finalidad de prevenir la adsorción de éstas durante su análisis.

Se recomiendan los equipos y materiales enlistados a continuación:

-Refrigerador con temperatura de trabajo de 4°C

-Tubos cónicos sellables para centrifuga de polipropileno (por ejemplo: tubos cónicos de 15 mL de capacidad)

-Papel aluminio o plástico para envolver

-Cinta plástica (para evitar el movimiento de las tiras durante el lavado de las placas)

-Botellas de lavado (por ejemplo: de 500 mL)

MANUAL DE PROTOCOLOS DE MEDICION

-Micropipetas de alta precisión, por ejemplo: juego de micropipetas de (20 – 500) μ L.

-Mezclador

-Balanza (capacidad de 0.01 g)

-Centrífuga de 5 000 g (mínima aceleración centrífuga)

-Lector de microplacas, con capacidad de lectura de absorbancia a 450 nm

-Horno incubador o baño de agua, con capacidad de mantener la temperatura a 37 °C

-Cernidor con número de malla de 450 μ m, o equivalente

-Cernidor con número de malla de 150 μ m, (malla 100) o equivalente

-Pipeta multicanal, por ejemplo: de (50 a 300) μ L (opcional).

-Contenedor de reactivos para dispensador multicanal (opcional)

-Lavador de placas automático (opcional)

-Gradilla para tubos de centrífuga de 15 mL (opcional)

-Baño ultrasónico (opcional)

Preparación de la muestra en disolución

Obtener una muestra representativa y revisar el procedimiento de preparación de muestra que corresponda a la matriz en estudio. Pesar la cantidad de muestra de acuerdo al protocolo a emplear.

Adicionar la disolución de extracción y homogenizar.

Extracción

Se recomienda elegir procedimientos de extracción validados en la matriz que será sujeta al análisis.

Preparación de las curvas de calibración

Para la preparación de una curva de calibración, se recomienda usar materiales de referencia de la misma matriz o bien materiales de referencia que hayan sido verificados, preferentemente certificados para la matriz en cuestión.

Análisis

Por cada lote de muestras, calcular el número de pruebas/tiras. Incluir los blancos, las disoluciones de referencia, las disoluciones patrón, así como los controles.

Se recomienda analizar al menos por duplicado la muestra y diluirla adecuadamente de acuerdo al protocolo seleccionado.

Mezclar cuidadosamente los reactivos y permitir que la reacción transcurra de acuerdo a los tiempos y temperaturas indicadas. Si es necesario, el protocolo le indicará si la reacción debe detenerse.

Es importante, leer los resultados en tiempo, debido a que la estabilidad de la señal del equipo puede variar.



Interpretación de los resultados

La interpretación de los resultados será de acuerdo al tipo de análisis realizado: Cualitativo o semi-cuantitativo.

- **Análisis cualitativo**

Los resultados deben ser reportados como: **Detectado** o **No detectado** y debe incluirse el límite de detección (LD).

- **Análisis semi-cuantitativo**

Los resultados finales deben ser reportados incluyendo la incertidumbre de medida (la cual debe establecerse con anterioridad durante la validación del método de medición).

El coeficiente de variación de los valores de densidad óptica entre réplicas, no debe ser mayor del 15 %.

El coeficiente de variación (CV) del valor de concentración calculado a partir de las réplicas de una misma muestra, no debe ser mayor al 20 %.

En caso de que el CV resulte mayor al valor anteriormente mencionado (valor límite), el análisis debe repetirse empleando para ello una disolución de muestra recién preparada. Y para establecer un CV en este caso, deberán llevarse a cabo al menos tres mediciones (por ejemplo: tomar los valores de 3 pozos de microtitulación).

Los resultados cuantitativos no deben obtenerse extrapolando los valores superiores o inferiores de la curva de calibración.

Los resultados positivos por debajo del límite de cuantificación deben ser reportados como sigue:

“Positivo hacia el límite superior de detección, pero por debajo del límite de cuantificación”.

Los resultados negativos deben reportarse como:

“Negativo al límite de detección” o

“Menor al límite de detección”

Recomendaciones especiales:

Especificidad: La especificidad del ensayo analítico debe ser demostrada para cada proteína a ser evaluada, así como en cada matriz a ser probada.

Para probar la ausencia de la proteína en una muestra que no contenga un OGM, debe también realizarse el análisis en una muestra que la contenga (control positivo); hacer diluciones adecuadas y finalmente comparar los resultados entre ambos. Generalmente, este procedimiento se lleva a cabo durante la etapa de la validación del método, por lo que no debe considerarse como un procedimiento de rutina.

Eficiencia de la extracción: Esta debe ser validada por matriz y demostrar ser reproducible. Considerar dentro del método de calibración la posibilidad de tener un proceso de extracción incompleto.

La eficiencia de la extracción de la proteína debe ser lo más alta posible, con la finalidad de obtener una gran sensibilidad del inmunoensayo.

Efectos de matriz: El inmunoensayo seleccionado deberá definir y especificar claramente el alcance de su aplicación,



esto significa que deberá indicar en qué matrices puede ser empleado.

El uso de materiales de referencia (MR) de la misma matriz, permite una comparación directa entre los MR y la muestra. Sin embargo, si las muestras y los MR no son del mismo origen, los efectos debidos a la matriz deberán ser evaluados.

A continuación, se describe un procedimiento para esto:

-Preparar un extracto negativo por cada tipo de matriz y un control positivo de concentración conocida.

-Preparar una serie de diluciones del control positivo en el extracto negativo y comparar la curva dosis-respuesta resultante contra la curva de calibración empleada por el método en uso. Si ambas curvas resultan diferentes, se deduce que existe un efecto de matriz.

Se recomienda también incluir como una referencia, una curva de dilución con un control positivo de concentración conocida. La forma de la curva de calibración no deberá cambiar debido a efectos de matriz.

Paralelismo/Linealidad: En los análisis cuantitativos, el intervalo lineal esperado del inmunoensayo debe ser establecido dentro del alcance de su aplicación para todas las matrices que incluya.

El número de puntos de la curva de calibración evaluados debe reflejar la porción lineal de la curva. En caso contrario (obtención de una curva no-lineal) deben generarse puntos de calibración adicionales.

Si las curvas de calibración no se observan “paralelas” o presentan la misma pendiente cuando son graficadas una al lado de la otra, los datos deben

ser analizados estadísticamente como prueba de comparabilidad de la dilución.

Límites de detección: Los resultados no deben interpretarse cuando resulten por debajo del límite de detección. Debiendo informar en el reporte, que los resultados se encuentran “dentro” o “son menor” que el límite de detección.

Límites de cuantificación: Se requiere establecer los límites de cuantificación por cada serie de disoluciones calibrantes.

El cálculo de la concentración en las muestras, debe ser interpolada no extrapolada.

Los resultados no deben interpretarse cuando estén por debajo del límite de cuantificación o queden fuera del intervalo dinámico.

Confirmación del método

Se deben implementar otras técnicas que permitan confirmar el método como: *western blot*, HPLC o análisis funcional para medir el desplazamiento (*Split, en inglés*) de las muestras analíticas de concentración conocida. De esta manera, los resultados de ambos métodos son comparados cualitativa y semi-cuantitativa. Esto es de importancia para los ensayos inmunológicos, ya que los anticuerpos empleados pueden presentar reacciones cruzadas con otros analitos presentes en la matriz.

En la norma ISO 21572:2004 se encuentra descrito el siguiente método: “Detección de soya genéticamente modificada (Roundup Ready® tolerante a herbicidas)” para su consulta.



Capítulo 6

Métodos cualitativos para análisis de OGM

El análisis **cualitativo** de OGM se realiza para determinar la presencia o ausencia de modificaciones genéticas en la muestra de ensayo.

Se debe seleccionar el protocolo adecuado para el ensayo y contemplar el uso de controles correspondientes y trabajar dentro de los parámetros establecidos.

La identidad de la secuencia detectada, puede ser verificada mediante el uso de técnicas apropiadas tales como: el análisis de restricción con enzimas, hibridación del ADN y análisis de secuenciación.

En el caso de la técnica de PCR punto final, la detección de los productos obtenidos se puede llevar a cabo mediante electroforesis en gel o alguna técnica alternativa.

Cabe mencionar, que en caso de usar qPCR; la amplificación y la detección se llevan a cabo de manera simultánea.

La Norma Internacional ISO 21569, clasifica a los métodos cualitativos para análisis de ADN en OGM en:

A) Métodos específicos del taxón

A.1 Método específico del taxón para la detección de componentes derivados de la soya.

A.2 Método específico del taxón para la detección de multicopias de secuencias de ADN generalmente presentes en los cloroplastos.

A.3 Método específico del taxón y método de tamiz de OGM para la detección de ADN derivado de jitomates y/o jitomates genéticamente modificados Zeneca®.

A.4 Método específico del taxón para la detección de componentes derivados del maíz.

B) Métodos de tamiz o *screening*

B.1 Método de tamiz para detección de ADN modificado en plantas (promotor CaMV P35S).

B.2 Método tamiz alternativo para la detección de ADN modificado en plantas: promotor (CaMV P35S).

B.3 Método de tamiz para la detección de ADN modificado en plantas (*Agrobacterium tumefaciens* terminador - NOS).

B.4 Método de tamiz para la detección de ADN modificado en plantas (gene *npt II*).

B.5 Método de tamiz para la detección de ADN derivado de jitomates genéticamente modificados Zeneca® F282.

C) Métodos específicos de la construcción

C.1 Método específico de la construcción para la detección de las secuencias de ADN modificadas de la soya genéticamente modificada GTS 40-3-2 (Roundup Ready® soya beans).



C.2 Método específico de la construcción para detección de las secuencias de ADN modificadas del jitomate genéticamente modificado (Zeneca® F282).

C.3 Método específico de la construcción para detección de las secuencias de ADN modificadas del maíz genéticamente modificado Bt-11.

C.4 Método específico de la construcción para detección de las secuencias de ADN modificadas del evento genéticamente modificado: Evento 176 de Maíz (Maíz Bt-176).

C.5 Método específico de la construcción para detección de las secuencias de ADN modificadas del Maíz T25 modificado.

D) Método evento-específico

D.1 Método específico del evento para detección de las secuencias de ADN modificadas del maíz genéticamente modificado MON 810

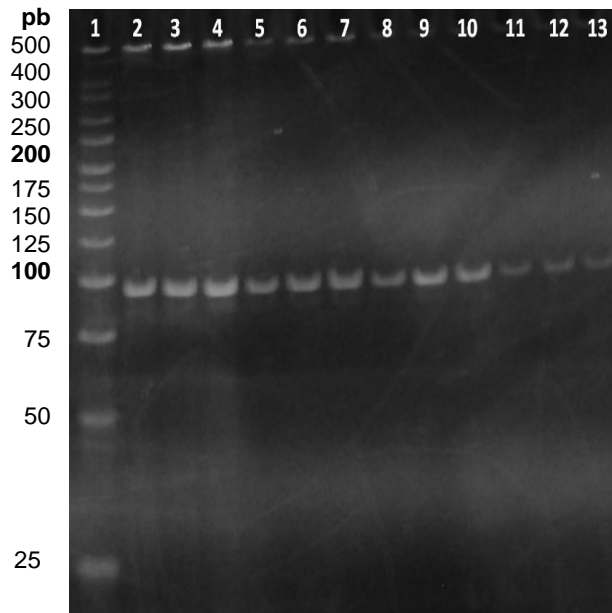


Figura 10. Visualización del producto de PCR del gen endógeno de trigo, usando diferentes concentraciones de ADN. Carriles: **1**, Marcador; **2-4**, 100 ng; **5-7**, 10 ng; **8-10**, 1 ng; **11-13**, 0.1 ng (PCR 300612-1). Foto cortesía del Dr. B. Pereyra. UANL.



Capítulo 7

Métodos para cuantificar OGM

Una vez que se ha comprobado la presencia de una o más modificaciones genéticas, el paso siguiente consiste en cuantificar la cantidad de OGM presente, para lo cual pueden emplearse diferentes métodos como a continuación se señalan:

Tipos de Métodos

- a) Físicos: Medición de la absorbancia a una longitud de onda específica.
- b) Físico-químicos: Uso de agentes intercalantes o de unión capaces de emitir fluorescencia.
- c) Enzimáticos: Detección por bioluminiscencia.
- d) PCR cuantitativo (PCR tiempo real (qPCR) o PCR digital (dPCR)). Este método es recomendable para aquellas matrices complejas o bien para muestras con bajo contenido de ADN o aquel que se encuentre degradado.

La Unión Europea ha generado un compendio de métodos de referencia validados para la detección de Organismos Genéticamente Modificados (ISBN 978-92-79-15627-4).

La dPCR es una técnica de reciente aplicación para la cuantificación de OGM. En donde el número de copias obtenido con ésta técnica de medición es igual al

número de moléculas cuantificadas, considerándose un método de medición potencialmente primario, por reproducir la unidad de cantidad de sustancia, en el que se obtiene el número de copias ó moléculas del evento transgénico de interés respecto al número de copias ó moléculas del gen de referencia, reportándose finalmente como la razón del número de copias en porcentaje. (Fig.11). Esta técnica de medición fue utilizada por el Centro Nacional de Metrología para asignar los valores de referencia certificados a los materiales de referencia utilizados para el estudio nacional colaborativo en el que se validaron los métodos de medición que se informan en este manual, así mismo los resultados de medición utilizando PCR digital proporcionados en su momento por el CNRDOGM, tuvieron una aportación significativa para la conducción de los estudios de comparación nacional, realizados exitosamente en el Proyecto Sectorial SAGARPA CONACyT 2011-09-172352, ya que los resultados por éste obtenidos comparados con los del CENAM, aplicando análisis de varianza ANOVA, no muestran diferencias estadísticamente significativas.

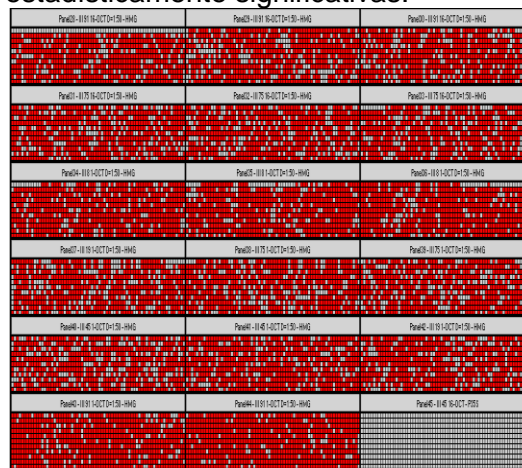


Figura 11. Visualización de panel de amplificación con dPCR. Ensayo realizado con el gen endógeno de Maíz (hmg) (CENAM 2012).



Capítulo 8

PROTOCOLOS DE MEDICIÓN

ABREVIATURAS ENCONTRADAS EN LOS PROTOCOLOS:

cp: Copias.

Cq: Ciclo de cuantificación.

GM: Genéticamente Modificado.

LD: Límite de Detección.

LC: Límite de Cuantificación.

L: Litro.

MRC: Material de Referencia Certificado.

μ M: microMolar.

ng: nanogramo.

qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (*quantitative Polymerase Chain Reaction, en inglés*)

INFORMACIÓN GENERAL

A continuación, se describen las diferencias entre detección, identificación y cuantificación.

DETECCIÓN: Determinar si existe la presencia o ausencia de material genéticamente modificado en una muestra a partir de secuencias reguladoras.

IDENTIFICACIÓN: Conocer la característica introducida al material (resistencia a insectos, tolerancia a herbicidas, resistencia a sequía, etc.), inclusive en eventos apilados o “*stacks*”. Puede identificar variedades de OGM no permitidas para su liberación al ambiente.

CUANTIFICACIÓN: Definir el porcentaje de material genéticamente modificado (GM) de una muestra en % masa y/o en número de copias.



8.1 Maíz

i. Método cuantitativo del evento MON-00810-6

1. OBJETIVO GENERAL

Que el laboratorio emplee la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR) para la cuantificación de MON-00810-6 en muestras de maíz (Fig. 12)

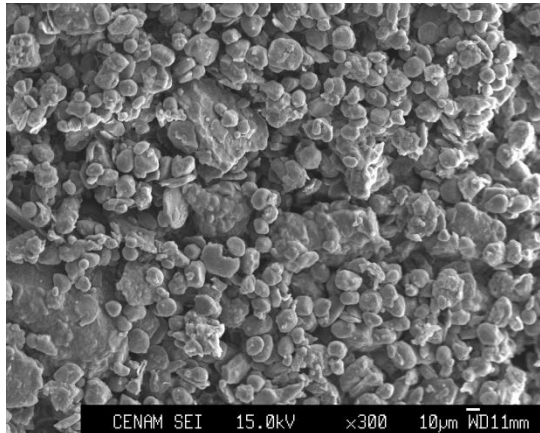


Figura 12. Fotografía de microscopía electrónica de la harina de maíz. CENAM 2012, división de Materiales Cerámicos.

2. Desarrollo del Método

2.1.1 Datos de las muestras

Todos los laboratorios recibieron tres muestras ciegas de maíz con el evento MON-00810-6 y dos MR empleados como controles: DMR-436IIa como positivo y el DMR-482a como control negativo.

2.1.2 Método de extracción de la muestra

Cada muestra se extrajo por duplicado con el kit y/o reactivos disponibles y utilizados por el laboratorio, considerando sus propios parámetros de calidad (concentración, pureza e integridad, etc.). El ADN obtenido de cada muestra se estandarizó a una concentración de 50 ng/µL.

2.1.3 Diseño del método

2.1.3.1 Secuencias de iniciadores y sondas



MANUAL DE PROTOCOLOS DE MEDICION

En la Tabla 2 se muestran las secuencias de sondas e iniciadores del gen de referencia y de la secuencia blanco que se emplearon durante el ensayo colaborativo.

2.1.3.2 Mezcla de reacción

Las mezclas de reacción fueron preparadas empleando los reactivos y las concentraciones que se muestran en la Tabla 3. Se realizaron reacciones de qPCR por duplicado para el gen de referencia y por triplicado para el gen de la secuencia blanco por cada extracción de muestra analítica.

Se consideró por cada ensayo reacciones por duplicado para:

- Control positivo (C+): Mezcla de reacción más ADN de la secuencia blanco.
- Control negativo (C-): Mezcla de reacción más ADN de una secuencia NO blanco.
- Control de Reacción (NTC-Not Template Control): Mezcla de reacción más agua estéril o grado BM.

Tabla 2. Secuencias de sondas e iniciadores

| Descripción | Secuencia | Sentido |
|--------------------|---|----------------|
| hgm A | 5'-TTG GAC TAG AAA TCT CGT GCT GA-'3 | Directo |
| | 5'-GCT ACA TAG GGA GCC TTG TCC T-'3 | Inverso |
| | 5'-FAM - CAA TCC ACA CAA ACG CAC GCG TA - TAMRA'3 | Sonda 79 pb |
| MON-00810-6 | 5'- TCG AAG GAC GAA GGA CTC TAA CGT -'3 | Directo |
| | 5'- GCC ACC TTC CTT TTC CAC TAT CTT -'3 | Inverso |
| | 5'-FAM-AAC ATC CTT TGC CAT TGC CCA GC-TAMRA-'3 | Sonda 92 pb |

Tabla 3: Concentración de los componentes para las reacciones de qPCR.

| Reactivo | Concentración final |
|---------------|---------------------|
| Agua | cbp |
| Master Mix | 1X |
| Iniciador F | 300 nM |
| Iniciador R | 300 nM |
| Sonda | 180 nM |
| ADN | 100 ng/ µL |
| Volumen final | 20 µL |

2.1.3.3 Termocicladores y condiciones de amplificación

Se emplearon seis diferentes modelos de termocicladores de qPCR ***:

- ABI-7500 *Real-Time PCR system*,



- ABI VIIA7™ *Real-Time PCR system*;
- ABI 7900 HT *Fast Real-Time PCR system*;
- Light-Cycler 480 *Real-Time PCR system* de Roche
- dPCR Biomark (Fluidigm®)
- dPCR Open Array® (Life technologies) System

Tabla.4 Condiciones de termocicladores de qPCR (RT-PCR)

| Termociclador | Condiciones |
|-----------------------------------|--|
| ABI-7500, ABI-7900 y ViiA7 | 1 ciclo a 50 °C por 2 min, seguido de 1 ciclo a 95 °C durante 10 min y finalmente 45 ciclos de amplificación de 95 °C por 15 s; 60 °C por 1 min. |
| LC480 | 1 ciclo a 95 °C por 10 min, seguido de 45 ciclos de 95 °C durante 10 s, 60 °C durante 30 s, 72 °C de 1 s. Seguido de 1 ciclo a 40 °C por 30 s. |

***Esta información se da para conveniencia del usuario de este manual. De ninguna manera es obligatorio el uso de estos sistemas comerciales. Pueden usarse otros sistemas equivalentes y deberán mostrar los mismos resultados.

2.1.3.4 Cuantificación del evento

Para realizar la cuantificación de la secuencia genéticamente modificada, MON-00810-6, por la técnica de qPCR se elaboró una curva de calibración con el material de referencia DMR-436IIa (control positivo). A partir del stock de ADN de 50 ng/μL, se realizaron diluciones seriales con un factor de dilución 1:10, con el fin de obtener los siguientes puntos: A (50 ng/μL), B (5 ng/μL), C (0.5 ng/μL) y D (0.05 ng/μL).

Algunos parámetros de la curva de calibración que se consideraron para aprobar el ensayo fueron:

- Eficiencia de amplificación de (90 a 110) %
- Valor de la pendiente de -3.1 a -3.6
- Coeficiente de correlación (R^2) ≥ 0.98
- Valores de Cq recomendados: A) Para el gen de referencia (*hmg*) **Cq= 22-23** para una concentración de ADN de 100 ng/μL. B) Para la secuencia transgénica MON810: **Cq= 23-24** para una concentración de ADN de 100 ng/μL.

3. Resultados de la validación del método



MANUAL DE PROTOCOLOS DE MEDICION

En la Tabla 5, se muestran los datos de los resultados de la validación (porcentaje de la desviación estándar de la repetibilidad, número de copias promedio, incertidumbre expandida promedio, etc.) obtenidos para la cuantificación del evento específico MON-00810-6 para las dos muestras de maíz analizadas.

Tabla 5. Datos de validación para el evento específico MON-00810-6*.

| Muestra | MON-00 810-6 en Maíz IV | MON-00 810-6 en Maíz V |
|--|-------------------------|------------------------|
| Año del estudio colaborativo | 2011 | 2011 |
| Número de laboratorios que reportaron | 8 | 8 |
| Número de datos extremos | 2 | 3 |
| Número de laboratorios retenidos después de eliminar datos extremos | 6 | 5 |
| Valor Promedio cp/cp | 0.70 | 4.62 |
| Desviación estándar de la repetibilidad (%) | 53 | 9 |
| Incertidumbre expandida del promedio (k=2) % | 47 | 8 |

*Datos del estudio colaborativo CIBIOGEM 2011

3.1 Límite de detección (LD)

El límite de detección absoluto obtenido en el estudio colaborativo resultó en 5 cp/μL de MON810.

3.2 Límite de cuantificación (LC)

El límite de cuantificación absoluto obtenido en el estudio colaborativo resultó en (20-50) cp/μL de MON810 ó 0.1% de MON810.

ii. MÉTODO CUANTITATIVO PARA LA MEDICION DEL PROMOTOR 35S DEL VIRUS DEL MOSAICO DE LA COLIFLOR (CaMV P-35S) EN POLVO DE SEMILLA DE MAIZ.

1. INFORMACIÓN GENERAL

Objetivo general:

Que el laboratorio emplee la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR); para la cuantificación del CaMV P-35S en muestras de maíz.

Objetivos particulares.



MANUAL DE PROTOCOLOS DE MEDICION

DETECCIÓN: determinar si existe la presencia o ausencia de material genéticamente modificado en una muestra a partir de secuencias reguladoras.

Puede identificar variedades GM no permitidas para su liberación al ambiente.

CUANTIFICACIÓN: definir el porcentaje de material genéticamente modificado (GM) de una muestra en % masa y/o en número de copias.

2. DATOS DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO (Tabla 6)

| | |
|--|-----------------------|
| Coordinador de la comparación | CENAM |
| Material empleado en la comparación | MRC de harina de maíz |
| Material usado para calibración | DMR-436 II a |
| Evento o promotor analizado | CaMV P-35S |
| Tipo de PCR | Tiempo Real |

42

2.1 Descripción de la prueba de comparación

Todos los laboratorios recibieron una muestra ciega conteniendo CaMV P-35S en maíz, y dos controles: positivo y negativo. Cada laboratorio realizó 3 extracciones de ADN independientes.

2.2 Parámetros de validación del método

2.2.1 Límite de detección (LD)

El límite de detección absoluto que fue obtenido en el estudio colaborativo y es de: 5 copias de la secuencia blanco (CaMV P35S).

2.2.1 Límite de cuantificación (LC)

El límite de cuantificación absoluto que fue obtenido en el estudio colaborativo y es de: 20 copias de la secuencia blanco (CaMV P35S).

Los resultados de validación presentados a continuación en la Tabla 7 fueron obtenidos del estudio colaborativo llevado a cabo por la RNLD-OGM con el apoyo del proyecto CONACYT SAGARPA 2012 para la demanda específica 4 para el desarrollo y certificación de materiales de referencia para la medición de OGM.

Tabla 7. Datos de validación para el promotor CaMV P-35S en maíz.

| Muestra | Maíz (p35S/HMG copia/copia %) |
|---|-------------------------------|
| Año del estudio colaborativo | 2012 |
| Número de laboratorios que reportaron | 11 |
| Número de valores extremos | 2 |
| Número de laboratorios retenidos después de eliminar valores extremos | 9 |
| Valor promedio | 0.82 |
| Desviación estándar de la repetibilidad % | 43 |
| Incertidumbre expandida del promedio % | 41 |



2.3 Desarrollo del método

I Calibración y buen estado de los instrumentos de medición:

El laboratorio debe verificar el buen estado y la calibración de los instrumentos de medición involucrados: balanza(s), micropipetas, mezcladores, estufas y/o incubadoras y refrigeradores y/o congeladores.

II Método de extracción de la muestra

Extraer las muestras de maíz por triplicado con el kit y/o reactivos disponibles y utilizados por el laboratorio. Es deseable que las disoluciones del ADN obtenido sean estandarizadas a una concentración de 100 ng/μL.

III De desempeño del método

El mínimo de requisitos que el laboratorio deberá mostrar se enlista a continuación:

| | |
|---|---------------------------|
| Concentración ADN | > a 100 ng/μL |
| Eficiencia de la amplificación | (90 a 110) % |
| Valor promedio de la pendiente bajo la curva | - 3.1 ≥ pendiente ≥ - 3.6 |
| R² | ≥ 0.98 |

3. SECUENCIAS DE LOS INICIADORES Y LAS SONDAS

En la Tabla 8 se muestran las secuencias de sondas e iniciadores de secuencias de referencia y secuencias reguladoras que se emplearán para el ensayo colaborativo.

Tabla 8. Secuencias de sondas e iniciadores

| Descripción | Secuencia | Longitud del amplicón pb |
|---------------------------------------|---|--------------------------|
| Gen de referencia <i>hmg A</i> | 5'-TTG GAC TAG AAA TCT CGT GCT GA-3' | |
| Iniciador directo | | |
| Iniciador inverso | 5'-GCT ACA TAG GGA GCC TTG TCC T-3' | |
| Sonda | 5'-FAM - CAA TCC ACA CAA ACG CAC GCG TA -TAMRA-3' | 79 |
| Secuencia blanco CaMV P-35S | 5'- CGTCTTCAAAGCAAGTGGATTG -3' | |
| Iniciador directo | | |
| Iniciador inverso | 5'- TCTTGCGAAGGATAGTGGATT -3' | |
| Sonda | 5'-FAM-TCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCA-TAMRA-3' | 79 |

4. MEZCLA DE REACTIVOS

Para la cuantificación de ambos genes: *hmg A* y CaMV P-35S se emplean las concentraciones de sondas e iniciadores indicadas en la Tabla 9.



MANUAL DE PROTOCOLOS DE MEDICION

Los termocicladores empleados fueron los modelos***: ABI-7500, VIIA7, LC 480 y 7900 ht *fast real time*.

Tabla 9. Composición de la mezcla de reactivos de la qPCR (PCR-mix) para el gen de referencia *hmgA* y el promotor CaMV P-35S.

| Reactivo | *Concentración inicial o de partida | Concentración final | Volumen por muestra (µL) |
|-----------------------------|-------------------------------------|---------------------|--------------------------|
| Agua | ----- | ----- | 18.2 |
| TaqMan®Universal Master Mix | 2x | 1 X | 30 |
| Iniciador Forward | 10 µM | 300 nM | 1.8 |
| Iniciador Reverse | 10 µM | 300 nM | 1.8 |
| Sonda | 5 µM | 180 nM | 2.2 |
| ADN | 100 ng/µL | 100 ng/µL | 6 |
| Volumen final | | | 60 µL |

*Las concentraciones iniciales de las sondas e iniciadores, son las que deben prepararse para poder tomar los volúmenes indicados por muestra para llegar a la concentración final a un volumen de 60µL.

***Esta información se da para conveniencia del usuario de este manual. Y de ninguna manera es obligatorio el uso de estos sistemas comerciales. Pueden usarse otros sistemas equivalentes y deberán mostrar los mismos resultados.

® Se da por conveniencia del usuario de este manual. Sin embargo, el usuario podrá usar otro(s) reactivo(s) equivalente(s) y deberá mostrar los mismos resultados.

5. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN

Tabla 10. Condiciones de amplificación de acuerdo al tipo de termociclador***

| MODELOS: ABI-7500, ABI 7900 ViiA7 | Gen <i>hmg A</i> y CaMVP-35S | | | MODELO LC480 | Gen <i>hmg A</i> y CaMVP-35S | | |
|---|------------------------------------|--------|------------|---|---------------------------------|--------|------------|
| Etapas | Temperatura | Tiempo | No. ciclos | Etapas | Temperatura | Tiempo | No. ciclos |
| Descontaminación | 50 °C | 120 s | 1 | Descontaminación | 95 °C | 120 s | 1 |
| Activación / Desnaturalización inicial | 95 °C | 600 s | 1 | Activación / Desnaturalización inicial | 95 °C | 10 s | |
| Desnaturalización | 95 °C | 15 s | | Desnaturalización | 60 °C | 30 s | |
| Alineación, Extensión | 60 °C | 60 s | | Alineación, Extensión | 72 °C | 1 s | 45 |
| Desnaturalización, Alineación y Extensión | | | 45 | Desnaturalización, Alineación y Extensión | 40 °C | 30 s | 1 |



MANUAL DE PROTOCOLOS DE MEDICION

Los valores de Cq recomendados:

Para el gen de referencia en maíz (*hmg A*): **Cq= 22-23** para una concentración de ADN de 100 ng/μL.

Para la secuencia CaMV P-35S: **Cq= 23-24** para una concentración de ADN de 100 ng/μL.

8.2 SOYA

i. MÉTODO CUANTITATIVO PARA LA MEDICIÓN DEL PROMOTOR 35s DEL VIRUS DEL MOSAICO DE LA COLIFLOR (CaMV P-35S)

45

1. INFORMACIÓN GENERAL

Objetivo general:

Que el laboratorio utilice la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR); para la cuantificación del CaMV P-35S en muestras de soya.

Objetivo particular:

Cuantificar: Definir el porcentaje de material genéticamente modificado (GM) de una muestra en % masa y/o en número de copias.

2. DATOS DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO

| | |
|--|-----------------------|
| Coordinador de la comparación | CENAM |
| Material empleado en la comparación | MRC de harina de soya |
| Material usado para calibración | DMR-495 II a |
| Evento analizado | CaMV P-35S |
| Tipo de PCR | Tiempo Real |

2.1 Descripción de la prueba de comparación

Todos los laboratorios recibieron una muestra ciega conteniendo CaMV P-35S en soya, y dos controles: positivo y negativo. Cada laboratorio realizó 2 extracciones de ADN independientes.

2.2 Parámetros de validación del método

2.2.1 Límite de detección (LD)

El límite de detección absoluto como resultado en el estudio colaborativo fue 18 copias de la secuencia blanco (CaMV P35S).

2.2.1 Límite de cuantificación (LC)

El límite de cuantificación absoluto fue obtenido en el estudio colaborativo: 50 copias de la secuencia blanco (CaMV P35S).



MANUAL DE PROTOCOLOS DE MEDICION

Los resultados de validación presentados en la Tabla 11 fueron obtenidos del estudio colaborativo llevado a cabo por la RNLD-OGM con el apoyo del proyecto CONACYT SAGARPA 2012 para la demanda específica 4 para el desarrollo y certificación de materiales de referencia para la medición de OGM.

Tabla 11. Datos de validación para el promotor CaMV P-35S en soya

| Muestra | Soya (p35S/Lec copia/copia %) |
|---|-------------------------------|
| Año del estudio colaborativo | 2012 |
| Número de laboratorios que reportaron | 10 |
| Número de valores extremos | 2 |
| Número de laboratorios retenidos después de eliminar valores extremos | 8 |
| Valor Promedio cp/cp | 1.93 |
| Desviación estándar de la repetibilidad % | 25 |
| Incertidumbre expandida del promedio % | 17 |

2.3 Desarrollo del método

I Calibración y buen estado de los instrumentos de medición:

El laboratorio debe verificar el buen estado y la calibración de los instrumentos de medición involucrados: balanza(s), micropipetas, mezcladores, estufas y/o incubadoras y refrigeradores y/o congeladores.

II Método de extracción de la muestra

Extraer las 2 muestras de soya por triplicado con el kit y/o reactivos disponibles y utilizados por el laboratorio. Es preferible que las disoluciones del ADN obtenido sean estandarizadas a una concentración de 50 ng/ μ L.

Ser explícitos en los protocolos de extracción, señalar si la extracción fue manual o automática; características de los reactivos y/o kits comerciales empleados durante este procedimiento.

III Desempeño del método

El mínimo de requisitos que el laboratorio deberá mostrar se enlista a continuación:



MANUAL DE PROTOCOLOS DE MEDICION

| | |
|---|----------------------------------|
| Concentración del ADN | > a 100 ng/μL |
| Eficiencia de la amplificación | (90 a 110) % |
| Valor promedio de la pendiente bajo la curva | - 3.1 ≥ pendiente ≥ - 3.6 |
| R² | ≥ 0.98 |

3. SECUENCIAS DE LOS INICIADORES Y LAS SONDAS

En la Tabla 18 se muestran las secuencias de sondas e iniciadores de secuencias de referencia y secuencias reguladoras que se emplearon para el ensayo colaborativo.

47

Tabla 12. Secuencias de sondas e iniciadores

| Descripción Gen de referencia Lec | Secuencia | Longitud del amplicón |
|--|---|--------------------------------------|
| Iniciador directo | 5'-CCA GCT TCG CCG CTT CCT TC-3' | |
| Iniciador inverso | 5'-GAA GGC AAG CCC ATC TGC AAG CC-3' | |
| Sonda | 5'-FAM - CTT CAC CTT CTA TGC CCC TGA CAC - TAMRA-3' | 74 pb |
| Secuencia blanco:CaMV P-35S Iniciador directo | 5'- CGT CTT CAA AGC AAG TGG ATTG -3' | |
| Iniciador Inverso | 5'- TCT TGC GAA GGA TAG TGG GATT -3' | |
| Sonda | 5'- FAM-TCT CCA CTG ACG TAA GGG ATG ACG CA-TAMRA-3' | 79 pb |

4. MEZCLA DE REACTIVOS

Las reacciones de PCR en tiempo real deberán realizarse en un volumen de 20 μL. Para la cuantificación de ambos genes: Lec y CaMV P-35S se emplean las concentraciones de las sondas y de los iniciadores descritas en la Tabla 12.

Los termocicladores empleados fueron los modelos***: ABI-7500, VIIA7, LC 480 y 7900 *ht-fast real time*.

Tabla 13. Composición de la mezcla de reactivos (PCR mix) de la qPCR para el gen de referencia Lec y el promotor CaMV P-35S

| Reactivo | Concentración inicial* o de partida | Concentración final | Volumen por muestra (μL) |
|------------------------------------|--|----------------------------|---------------------------------|
| Agua | -- | ----- | 6.1 |
| TaqMan®Universal Master Mix | 2x | 1 X | 10 |



MANUAL DE PROTOCOLOS DE MEDICION

| | | | |
|--------------------------|-----------|-----------|-------|
| Iniciador Forward | 10 µM | 300 nM | 0.6 |
| Iniciador Reverse | 10 µM | 300 nM | 0.6 |
| Sonda | 5 µM | 180 nM | 0.7 |
| ADN | 100 ng/µL | 100 ng/µL | 2 |
| Volumen final | | | 20 µL |

*Las concentraciones iniciales de las sondas e iniciadores, son las que deben prepararse para poder tomar los volúmenes indicados por muestra para llegar a la concentración final a un volumen de 20µL.

***Esta información se da para conveniencia del usuario de este manual. Y de ninguna manera es obligatorio el uso de estos sistemas comerciales. Pueden usarse otros sistemas equivalentes y deberán mostrar los mismos resultados.

® Se da por conveniencia del usuario de este manual. Sin embargo, el usuario podrá usar otro(s) reactivo(s) equivalente(s) y deberá mostrar los mismos resultados.

48

5. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN

Tabla 14. Condiciones de amplificación de acuerdo al tipo de termociclador***

| MODELOS: ABI-7500, ABI-7900, ABI-ViiA7 | | | | MODELO LC480 | | | |
|---|-------------|--------|------------|---------------------|-------------|--------|------------|
| Gen Lec y CaMVP-35S | Temperatura | Tiempo | No. ciclos | Gen Lec y CaMVP-35S | Temperatura | Tiempo | No. ciclos |
| | 50°C | 120 s | 1 | | 95°C | 120 s | 1 |
| | 95°C | 600 s | 1 | | 95°C | 10 s | |
| | 95°C | 15 s | 45 | | 60°C | 30 s | |
| | 60°C | 60 s | | | 72°C | 1 s | 45 |
| | | | | | 40°C | 30 s | 1 |

Los valores de Cq recomendados:

Para el gen de referencia en soya (Lec) el Cq es aproximadamente de 22 a 23 para una concentración de ADN blanco de 50 ng/µL

Para la secuencia CaMV P-35S el Cq es aproximadamente de 21 a 23.

ii. MÉTODO CUANTITATIVO PARA LA DETERMINACION DEL EVENTO MON 04032-6 EN SOYA

1. INFORMACIÓN GENERAL

Objetivo general:

Que el laboratorio utilice la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR); para la cuantificación del evento específico MON 04032-6 en muestras de soya.



Objetivo particular:

CUANTIFICAR: Definir el porcentaje de material genéticamente modificado (GM) de cada muestra en % masa y/o en número de copias.

2 DATOS DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO

| | |
|--|-----------------------|
| Coordinador de la comparación | CENAM |
| Material empleado en la comparación | MRC de harina de soya |
| Material usado para calibración | DMR-495 II a |
| Evento analizado | MON-04032-6 |
| Tipo de PCR | Tiempo Real |

2.1 Descripción de la prueba de comparación

Todos los laboratorios recibieron una muestra conteniendo 2 % del evento específico. MON-04032-6 en soya, y dos controles: positivo y negativo. Cada laboratorio realizó 3 extracciones de ADN independientes por muestra.

2.2 Parámetros de validación del método

2.2.1 Límite de detección (LD)

El límite de detección absoluto se obtuvo en el estudio colaborativo: 0.1 % fracción masa de la secuencia blanco (MON 04032-6).

2.2.1 Límite de cuantificación (LC)

El límite de cuantificación absoluto fue obtenido en el estudio colaborativo: 1 % fracción masa de la secuencia blanco (MON 04032-6).

Los resultados de validación presentados en la Tabla 15 fueron obtenidos del estudio colaborativo llevado a cabo por la RNLD-OGM con el apoyo del proyecto CONACYT SAGARPA 2012 para la demanda específica 4 para el desarrollo y certificación de materiales de referencia para la medición de OGM.

Tabla 15. Datos de validación para el evento MON 04032-6 en soya

| Muestra | Soya (EE/Lec copia/copia %) |
|--|-----------------------------|
| Año del estudio colaborativo | 2012 |
| Número de laboratorios que reportaron | 11 |
| Número de valores extremos | 1 |
| Número de laboratorios retenidos después de eliminar valores extremos | 10 |
| Valor promedio | 1.64 |



MANUAL DE PROTOCOLOS DE MEDICION

| | |
|---|----|
| Desviación estándar de la repetibilidad % | 23 |
| Incertidumbre expandida del promedio % | 15 |

2.3 Desarrollo del método

I Calibración y buen estado de los instrumentos de medición:

El laboratorio debe verificar el buen estado y la calibración de los instrumentos de medición involucrados: balanza(s), micropipetas, mezcladores, estufas y/o incubadoras y refrigeradores y/o congeladores.

50

II Método de extracción de la muestra

Extraer las muestras de soya por triplicado con el kit y/o reactivos disponibles y utilizados por el laboratorio. Es preferible que las disoluciones del ADN obtenido sean estandarizadas a una concentración de 50 ng/μL.

Ser explícitos en los protocolos de extracción, señalar si la extracción fue manual o automática; características de los reactivos y/o kits comerciales empleados durante este procedimiento.

III Desempeño del método

El mínimo de requisitos que el laboratorio deberá mostrar se enlista a continuación:

| | |
|---|---------------------------|
| Concentración ADN | > a 50 ng/μL |
| Eficiencia de la amplificación | (90 a 110) % |
| Valor promedio de la pendiente bajo la curva | - 3.1 ≥ pendiente ≥ - 3.6 |
| R² | ≥ 0.98 |

3. SECUENCIAS DE LOS INICIADORES Y LAS SONDAS

En la Tabla 16 se muestran las secuencias de sondas e iniciadores de secuencias de referencia y secuencias reguladoras que se emplearon para el ensayo colaborativo.

Tabla 16. Secuencias de sondas e iniciadores

| Descripción | Secuencia | Longitud del amplicón |
|-------------------------------|---|-----------------------|
| Gen de referencia Lec: | | |
| Iniciador directo | 5'-CCA GCT TCG CCG CTT CCT TC-3' | |
| Iniciador inverso | 5'-GAA GGC AAG CCC ATC TGC AAG CC-3' | |
| Sonda | 5'-FAM - CTT CAC CTT CTA TGC CCC TGA CAC - TAMRA-3' | 74 pb |
| Secuencia blanco: | | |
| MON-04032-6 | | |



MANUAL DE PROTOCOLOS DE MEDICION

| | |
|--------------------------|---|
| Iniciador directo | 5'- TTC ATT CAA AAT AAG ATC ATA CAT ACA GGT T-3' |
| Iniciador inverso | 5'- GGC ATT TGT AGG AGC CAC CTT -3' |
| Sonda | 5'- FAM-CCT TTT CCA TTT GGG - 84 pb MGBNFQ -3' |

Construcción del evento específico MON-04032-6:

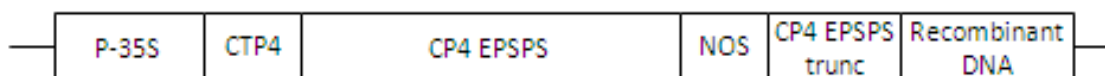


Imagen de MethodDatabase GMDD.

Característica Tolerante a herbicida.

4. MEZCLA DE REACTIVOS

Las reacciones de PCR en tiempo real, deberán realizarse en un volumen de 20 μ L. Para la cuantificación de ambos genes: Lec y MON-04032-6 se emplean las concentraciones de las sondas y de los iniciadores de la Tabla 17. Los termocicladores empleados fueron los modelos***: ABI-7500, VIIA7, LC 480 y 7900 *htfast real time*.

Tabla 17. Composición de la mezcla de reactivos (PCR-mix) de la qPCR para el gen de referencia Lec y MON 04032-6.

| Reactivo | Concentración inicial* o de partida | Concentración final | Volumen por muestra (μ L) |
|------------------------------------|-------------------------------------|---------------------|--------------------------------|
| Agua | -- | ----- | 6.1 |
| TaqMan®Universal Master Mix | 2x | 1 X | 10 |
| Iniciador Forward | 10 μ M | 300 nM | 0.6 |
| Iniciador Reverse | 10 μ M | 300 nM | 0.6 |
| Sonda | 5 μ M | 180 nM | 0.7 |
| ADN | 100 ng/ μ L | 100 ng/ μ L | 2 |
| Volumen final | | | 20 μ L |

*Las concentraciones iniciales de las sondas e iniciadores, son las que deben prepararse para poder tomar los volúmenes indicados por muestra para llegar a la concentración final a un volumen de 20 μ L.

***Esta información se da para conveniencia del usuario de este manual. Y de ninguna manera es obligatorio el uso de estos sistemas comerciales. Pueden usarse otros sistemas equivalentes y deberán mostrar los mismos resultados.

® Se da por conveniencia del usuario de este manual. Sin embargo, el usuario podrá usar otro(s) reactivo(s) equivalente(s) y deberá mostrar los mismos resultados.

5. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN

Las condiciones de amplificación se muestran en la tabla 18.



MANUAL DE PROTOCOLOS DE MEDICION

Tabla 18: Condiciones de amplificación de acuerdo al tipo de termociclador***

| MODELOS: ABI-7500, ABI- 7900, ABI- ViiA7 | Gen Lec y MON-04032- 6 | | | MODELO LC480 | Gen Lec y MON- 04032-6 | | |
|---|------------------------------|--------|---------------|---|------------------------------|--------|---------------|
| Etapa | Temperatura | Tiempo | No. ciclos | Etapa | Temperatura | Tiempo | No. ciclos |
| Descontaminación | 50 °C | 120 s | 1 | Descontaminación | 95 °C | 120 s | 1 |
| Activación / Desnaturalización inicial | 95 °C | 600 s | 1 | Activación / Desnaturalización inicial | 95 °C | 10 s | |
| Desnaturalización | 95 °C | 15 s | 45 | Desnaturalización | 60 °C | 30 s | |
| Alineación, Extensión | 60 °C | 60 s | | Alineación, Extensión | 72 °C | 1 s | 45 |
| Desnaturalización, Alineación y Extensión | | | | Desnaturalización, Alineación y Extensión | 40 °C | 30 s | 1 |

Los valores de Cq recomendados:

Para el gen de referencia en soya (Lec): el Cq es aproximadamente = 22 a 23 para una concentración de ADN de 100 ng/μL.

Para la secuencia MON-04032-6 el Cq es aproximadamente de = 21 a 22

8.3 TRIGO

i. MÉTODO CUANTITATIVO DE MEDICIÓN DE Dreb-1 EN TRIGO

1. INFORMACIÓN GENERAL

Objetivo general:

Que el laboratorio utilice la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR); para la cuantificación del Dreb-1 en muestras de trigo.

Objetivos particulares.

DETECCIÓN: determinar si existe la presencia o ausencia de material genéticamente modificado en una muestra a partir de secuencias reguladoras.

IDENTIFICACIÓN: Determinar la presencia de evento Dreb 1 en las muestras analizadas. Puede identificar variedades GM no permitidas para su liberación al ambiente.

CUANTIFICACIÓN: definir el porcentaje de material genéticamente modificado (GM) de una muestra en % masa y/o en número de copias.

2. DATOS DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO



MANUAL DE PROTOCOLOS DE MEDICION

| | |
|---|------------------------|
| Coordinador de la comparación | CENAM |
| Material empleado en la comparación | MRC de harina de trigo |
| Material usado para calibración | DMR-496 II a |
| Evento o modificación genética analizado | Dreb-1 |
| Tipo de PCR | Tiempo Real |

2.1 Descripción de la prueba de comparación

Todos los laboratorios recibieron una muestra ciega conteniendo Dreb-1 en polvo seco de trigo, y dos controles: positivo y negativo. Cada laboratorio realizó 2 extracciones de ADN independientes.

2.2 Parámetros de validación del método

2.2.1 Límite de detección (LD)

El límite de detección absoluto fue obtenido en el estudio colaborativo: 15 copias de la secuencia blanco (Dreb-1).

2.2.1 Límite de cuantificación (LC)

El límite de cuantificación absoluto fue obtenido en el estudio colaborativo: 96 copias de la secuencia blanco (Dreb-1).

Los resultados de validación presentados en la tabla 18 fueron obtenidos del estudio colaborativo llevado a cabo por la RNLD-OGM con el apoyo del proyecto CONACYT SAGARPA 2012 para la demanda específica 4 para el desarrollo y certificación de materiales de referencia para la medición de OGM.

Tabla 18. Datos de validación para el evento específico de MG Dreb-1

| Muestra | Trigo (DREB1/ACC1 copia/copia %) |
|--|---|
| Año del estudio colaborativo | 2012 |
| Número de laboratorios que reportaron | 12 |
| Número de valores extremos | 1 |
| Número de laboratorios retenidos después de eliminar valores extremos | 11 |
| Valor promedio cp/cp | 1.49 |
| Desviación estándar de la repetibilidad % | 20 |
| Incertidumbre expandida del promedio % | 12 |

2.3 Desarrollo del método



I Calibración y buen estado de los instrumentos de medición:

El laboratorio debe verificar el buen estado y la calibración de los instrumentos de medición involucrados: balanza(s), micropipetas, mezcladores, estufas y/o incubadoras y refrigeradores y/o congeladores.

II Método de extracción de la muestra

El laboratorio deberá validar previamente los métodos de extracción. Extraer las muestras de trigo por duplicado con el kit y/o reactivos disponibles y utilizados por el laboratorio. Es deseable que las disoluciones del ADN obtenido sean estandarizadas a una concentración de 100 ng/μL.

III De desempeño del método

El mínimo de requisitos que el laboratorio deberá mostrar se enlista a continuación:

| | |
|---|---------------------------|
| Concentración ADN | > a 100 ng/μL |
| Eficiencia de la amplificación | (90 a 110) % |
| Valor promedio de la pendiente bajo la curva | - 3.1 ≥ pendiente ≥ - 3.6 |
| R² | ≥ 0.98 |

3. SECUENCIAS DE LOS INICIADORES Y LAS SONDAS

Las secuencias son confidenciales.

4. MEZCLA DE REACTIVOS

Las reacciones de PCR en tiempo real, deberán realizarse en un volumen de 20 μL. Para la cuantificación de ambos genes: Acc- y Dreb-1 se emplearán las mismas concentraciones de las sondas y de los iniciadores. Tabla 19. Los termocicladores empleados fueron los modelos***: ABI-7500, VIIA7, LC 480 y 7900 *htfast real time*.

Tabla 19. Composición de la mezcla de reactivos de la qPCR (PCR-mix) para el gen de referencia Acc y Dreb-1

| Reactivo | *Concentración inicial o de partida | Concentración final | Volumen por muestra (μL) |
|-----------------------------|-------------------------------------|---------------------|--------------------------|
| Agua | -- | ----- | 6.1 |
| TaqMan®Universal Master Mix | 2x | 1 X | 10 |
| Iniciador Forward | 10 μM | 300 nM | 0.6 |
| Iniciador Reverse | 10 μM | 300 nM | 0.6 |
| Sonda | 5 μM | 180 nM | 0.7 |
| ADN | 100 ng/μL | 100 ng/μL | 2 |
| Volumen final | | | 20 μL. |



MANUAL DE PROTOCOLOS DE MEDICION

*Las concentraciones iniciales de las sondas y primers, son las que deben prepararse para poder tomar los volúmenes indicados por muestra para llegar a la concentración final a un volumen de 20 μ L.

***Esta información se da para conveniencia del usuario de este manual. Y de ninguna manera es obligatorio el uso de estos sistemas comerciales. Pueden usarse otros sistemas equivalentes y deberán mostrar los mismos resultados.

® Se da por conveniencia del usuario de este manual. Sin embargo, el usuario podrá usar otro(s) reactivo(s) equivalente(s) y deberá mostrar los mismos resultados.

5. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN

Las condiciones de amplificación se presentan a continuación en la tabla 20.

Tabla 20. Condiciones de amplificación de acuerdo al tipo de termociclador***

| MODELOS: ABI-7500 LC480 | Gen Acc- y Dreb-1 | | | MODELO LC480 | Gen Acc- y Dreb-1 | | |
|---|----------------------|--------|--------|---|----------------------|--------|--------|
| Etapa | Temperatura | Tiempo | Ciclos | Etapa | Temperatura | Tiempo | Ciclos |
| Descontaminación | 50° C | 120 s | 1 | Descontaminación | 95 °C | 120 s | 1 |
| Activación / Desnaturalización inicial | 95° C | 600 s | 1 | Activación / Desnaturalización inicial | 95 °C | 10 s | |
| Desnaturalización | 95° C | 15 s | | Desnaturalización | 60 °C | 30 s | |
| Alineación, Extensión | 60° C | 60 s | | Alineación, Extensión | 72 °C | 1 s | 45 |
| Desnaturalización, Alineación y Extensión | | | 45 | Desnaturalización, Alineación y Extensión | 40 °C | 30 s | 1 |

Los valores de Cq recomendados:

Para el gen de referencia en trigo (Acc-): **Cq= 25-26** para una concentración de ADN de 100 ng/ μ L.

Para la secuencia Dreb-1: **Cq= 25-32** para una concentración de ADN de 100 ng/ μ L.



Capítulo 9

BIBLIOGRAFIA

Compendium of reference methods for GMO analysis, JRC Reference Reports, European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed (EURL-GMFF), European network of GMO Laboratories (ENGL), EUR-24526-EN, Luxemburg: Publications Office of the European Union; 2010, páginas: 47,54-56, 100, 103, 173 (ISBN 978-92-79-15627-4).

Corral, R. T. (2007). *¿NORMALIZACIÓN? ¡Cáspita! ¿Qué es eso?* México: publicaciones NYCE.

De Bièvre, P., Dybkaer, R., Fajgelj, A., & Hibbert, B. D. (2011). Metrological traceability of measurement results in chemistry: Concepts and implementation (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, Vol. 83, No. 10,, 1873-1935.

Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing European Network of GMO Laboratories (ENGL) (2009).

Espinosa, L. (s.f.). Guía práctica sobre la técnica de PCR. Capítulo 17.

ISO 21569:2005, *Foodstuffs –Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products– Qualitative nucleic acid based methods*

ISO 21570:2005, *Foodstuffs –Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products– Quantitative nucleic acid based methods*

ISO 21571:2005, *Foodstuffs –Methods of analysis for the detection of genetically*

modified organisms and derived products– Nucleic acid extraction

ISO 21572:2004, *Foodstuffs –Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products– Protein based methods*

ISO 24276:2006, *Foodstuffs –Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products– General requirements and definitions*

JCGM 200:2008, *Vocabulario Internacional de Metrología- Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados (VIM). Traducción al español del VIM-3º. Marzo 2009.*

Ley Federal de Metrología y Normalización. Nueva Ley publicada en el DOF 01-07-1992.

Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización. Última reforma publicada DOF 28-11-2012.

Publicación Técnica de la CIBIOGEM: **POR UN USO RESPONSABLE DE LOS ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS.** FRANCISCO GONZALO BOLÍVAR ZAPATA

UNE- EN ISO 20838:2007, *Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de patógenos en los alimentos.. Requisitos para la amplificación y la detección para los métodos cualitativos. (ISO 20838:2006)*

UNE- EN ISO 24276:2007, *Productos alimenticios. Métodos de análisis para la detección de organismos genéticamente modificados y productos derivados. Requisitos generales y definiciones. (ISO 24276:2006)*



MANUAL DE PROTOCOLOS DE MEDICION

Página web visitada
www.cibiogem.com.mx el día 18 de
septiembre del 2012.

Página web visitada [http://free-
news.org/cjohns02.htm](http://free-news.org/cjohns02.htm) el día 1 de
Octubre del 2012.



CAPITULO 10

ANEXO I

Cabina de flujo laminar: Cámara diseñada para mantener el ambiente estéril requerido para trabajar con cultivos de células o tejidos. Se consigue mediante el paso de un flujo continuo no turbulento de aire esterilizado por filtración a través de la zona de trabajo. *Sinónimo:* campana de flujo laminar.

Diagnóstico o detección: Proceso de identificación de sustancias mediante el uso de detectores específicos: anticuerpos o sondas (fragmentos específicos) de ADN para detectar proteínas o genes específicos.

Gene o gen: Segmento de ADN en el cual reside la información para sintetizar una molécula de proteína o de ARN. Además de las secuencias codificadoras llamadas exones, muchos genes también contienen secuencias no codificadoras como los intrones y las regiones reguladoras. Los genes son secuencias de cuatro tipos de nucleótidos, de tres en tres (tripletes o codones) es responsable del orden de los aminoácidos en las proteínas. Este orden de los nucleótidos se “transcribe” en una molécula de ARN mensajero y es “traducida” en una proteína en los ribosomas de la célula.

Nucleótido: Monómero de los ácidos nucleicos ADN y ARN compuesto por una base, un azúcar y un fosfato. Existen cinco bases nitrogenadas en los ácidos nucleicos de los seres vivos; tres de ellas: guanina (G), citosina (C) y adenina (A), están presentes en el ADN y ARN. Además, en el ADN existe también la

GLOSARIO

De términos comúnmente usados en el área

timina (T) y en el ARN, en vez de timina hay uracilo (U).

Oligonucleótido: Molécula de ADN de bajo número de nucleótidos (5 a 200). Los oligonucleótidos se utilizan como sondas o rastreadores en sistemas de diagnóstico y como primeros en procesos de polimerización y amplificación de ADN con técnicas de PCR. Se pueden sintetizar químicamente.

Organismo genéticamente modificado (OGM): Organismo que ha sido alterado a través de modificar su material genético, generalmente mediante la incorporación de material genético de otro origen. Es sinónimo de transgénico.

(OMG Abr. de organismo modificado genéticamente.)

PCR (Polymerase Chain Reaction): Reacción en cadena de la polimerasa. Metodología que permite la amplificación específica de fragmentos de ADN. Lo anterior se alcanza a través de varios ciclos de síntesis de ADN utilizando la enzima ADN polimerasa (ver oligonucleótido, replicación, diagnóstico).

Promotor: Secuencia pequeña de ADN que permite el inicio de la transcripción del gene que controla y que se localiza normalmente en la región anterior del gene. El promotor es reconocido por la enzima ADN polimerasa para iniciar el proceso de transcripción de los genes.

Sonda: Fragmento específico de ADN o ARN que por su asociación con la secuencia complementaria se utiliza en métodos de diagnóstico.



ANEXO II

GLOSARIO

De los términos y definiciones de ISO 24276

Generales.

Ensayo colaborativo; estudio interlaboratorios: Estudio en el que varios laboratorios detectan o determinan un analito en una o más porciones “idénticas” de materiales homogéneos y estables en condiciones documentadas. NOTA: Las líneas directrices para la realización de ensayos colaborativos se presentan en la Norma ISO 5725-2 y en los protocolos armonizados ISO/AOAC/IUPAC.

Especificidad: Es la propiedad que tiene un método, de responder exclusivamente a la característica o al analito bajo investigación.

Factibilidad: Facilidad de las operaciones, en términos de rendimiento de muestra y de los costos, para alcanzar los criterios de realización requeridos y por lo tanto cumplir con el propósito especificado.

Idoneidad para el propósito; aplicabilidad: Ámbito de aplicación del método que identifica la matriz, analito o especies que han de ser medidas, su intervalo de concentración y el tipo de estudio/esfuerzo de seguimiento para el cual el procedimiento, a juzgar por sus

características de ejecución, es adecuado.

NOTA: También describe las limitaciones conocidas del método.

Límite de cuantificación; LC: <Procedimiento analítico> mínima concentración o cantidad del analito que puede ser determinada cuantitativamente en una muestra para análisis con un nivel aceptable de precisión y exactitud, como se demuestra en un análisis colaborativo u otra validación apropiada.

Límite de detección; LD: Ver definición en glosario del VIM.

Método específico de la construcción: Método que tiene como objetivo una combinación de secuencias del ADN insertado que se encuentran sólo en el material derivado del OGM.

Método específico del evento: Método que detecta una secuencia específica que está sólo presente en dicho evento. NOTA: Generalmente está localizada en la región del borde de inserción.

Método de tamiz (*screening*): Es un método que puede eliminar de forma rápida y confiable un gran número de muestras de prueba tanto negativas (o positivas) y por lo tanto restringe el número de muestras que requieren la aplicación de un método riguroso.

Muestra de laboratorio: Muestra tal y como ha sido preparada para enviar al laboratorio y destinada a inspección o análisis. [ISO 7002:1986].

Muestra para análisis; porción para análisis: Muestra, preparada para ensayo o análisis, la cantidad total que será utilizada de una sola vez para la extracción del analito.



Intervalo de aplicabilidad; Intervalo de cuantificación / linealidad / Intervalo dinámico: Es un intervalo de cantidad dentro del cual el procedimiento analítico ha demostrado; a través de ejercicios de colaboración u otros medios de validación, tener un nivel adecuado tanto de precisión como de exactitud.

NOTA: En la norma ISO 24276:2006, este tipo de métodos detecta productos génicos (como proteínas) o elementos genéticos comunes a diversos OGMs (como es el caso de promotores, terminadores, otros elementos genéticos de interés).

Sensibilidad: Es el cambio en la respuesta dividido por el correspondiente cambio en la concentración de una curva patrón (de calibración).

Taxón diana: Es el taxón al cual el OGM pertenece. NOTA: En este contexto, taxón significa generalmente **especie**, pero podría ser de un rango taxonómico inferior o superior.

Relativos a la extracción y purificación del ADN.

ADN calidad PCR: Molde de ADN de longitud, pureza química e integridad estructural suficiente para ser amplificado mediante PCR.

Aislamiento del ADN: Separación del ADN de otros componentes en una muestra para análisis.

Purificación del ADN: Método que da como resultado un ADN más purificado. NOTA: En este contexto, pureza se refiere a la reducción de efectos observables y medibles de inhibidores de la PCR.

Relativos a la amplificación del ADN y a la técnica de PCR.

Flujo hacia adelante: Principio de manipulación de muestra/material aplicado para asegurar que la muestra de laboratorio, porción para análisis cruda y procesada (incluyendo el ADN amplificado) permanezcan físicamente separados durante el proceso completo.

Identificación de secuencias de ácidos nucleicos; identidad de secuencias de Ácidos nucleicos: Establecimiento de la identidad mediante comparación con un fragmento/secuencia de ácidos nucleicos.

NOTA: Por ejemplo, hibridación específica con una sonda, alineación de perfiles de digestión con enzimas de restricción o alineación de secuencias de ácidos nucleicos.

Región de unión: Secuencia de ADN que abarca dos elementos de secuencia consecutivos, por ejemplo un promotor y la región que codifica un gen.

Región del borde de integración: Región de unión en la que un elemento procede del organismo huésped y la otra procede del ADN introducido durante la transformación.

Secuencia diana (endógena) taxón-específica: Secuencia conocida por ser específica del taxón diana.

NOTA 1- En consecuencia, está presente en el taxón blanco pero ausente en otros taxa.

NOTA 2- Al menos hay dos tipos de secuencias diana taxón-específicas:

Las secuencias multicopia o de número variable que pueden ser utilizadas, por ejemplo, para asegurar la presencia de ácidos nucleicos.

Las secuencias de copia única o de bajo número de copias que pueden ser también utilizadas, por ejemplo, como una secuencia de referencia para establecer el fondo de equivalentes de



genoma del taxón blanco en un análisis cuantitativo.

Relativos al ADN y a los controles de PCR.

Las siguientes definiciones se aplican a los métodos basados en ADN.

Control blanco de extracción: Control generado realizando todos los pasos del procedimiento de extracción excepto la adición de la porción para análisis.

NOTA 1- Por ejemplo mediante sustitución de la porción para análisis por agua.

NOTA 2- Este control se utiliza para demostrar la ausencia de contaminación con ácidos nucleicos durante la extracción.

Control de inhibición de la PCR: Mezcla de reacción que proporciona los recursos para monitorizar la inhibición de la técnica de PCR para la muestra específica del analito blanco.

NOTA 1- Este control permite determinar la presencia de inhibidores solubles de la técnica de PCR, lo que es particularmente necesario en el caso de amplificaciones negativas y de ensayos de PCR cuantitativa.

NOTA 2- Generalmente, se añade una cantidad conocida de ADN blanco a la reacción que se ha de controlar. Podría tratarse de la secuencia diana original o de una siembra, por ejemplo un blanco ligeramente modificado como un plásmido competidor.

Control del medio ambiente: Control utilizado para determinar que no hay contaminación por ácidos nucleicos por el aire del laboratorio, por ejemplo.

NOTA El control es un tubo que contenga un volumen adecuado de agua libre de ácidos nucleicos que se ha

dejado abierto al aire a lo largo del proceso entero.

Control de reactivos de la PCR:

Control que contiene todos los reactivos de la amplificación excepto el molde de ADN extraído de la muestra objeto de análisis.

NOTA Este control se utiliza para demostrar la ausencia de contaminación de ácidos nucleicos en los reactivos. En lugar del molde de ADN, por ejemplo, se añade a la reacción un volumen equivalente de agua libre de ácidos nucleicos.

Control negativo del ADN blanco: ADN de referencia, o ADN extraído de un material de referencia certificado, o muestra negativa conocida que no contenga la secuencia bajo estudio.

NOTA: Este control demuestra que los resultados analíticos de las muestras para análisis que no contengan la secuencia blanco serán negativas.

Control positivo de extracción: Control utilizado para demostrar que el proceso de extracción de ADN se ha realizado de un modo que permitirá la extracción de ADN blanco.

NOTA Por ejemplo utilizando un material de muestra conocido por contener la secuencia blanco.

Control positivo del ADN blanco: ADN de referencia, o ADN extraído de un material de referencia certificado, o muestra positiva conocida representativa de la secuencia o del organismo objeto de estudio.

NOTA: Este control se utiliza para demostrar que los reactivos de la reacción de PCR funcionan como es deseado.



ANEXO III

VOCABULARIO

Internacional de Metrología (VIM)

Introducción

El presente vocabulario es un diccionario terminológico que contiene las designaciones y definiciones relacionadas con la Metrología, “ciencia de las medidas y sus aplicaciones”.

Sistema Internacional de Unidades, Sistema SI, SI:

Sistema de unidades basado en el Sistema Internacional de Magnitudes, con nombres y símbolos de las unidades, y con una serie de prefijos con sus nombres y símbolos de las unidades, y con una serie de prefijos con sus nombres y símbolos, así como reglas para su utilización, adoptado por la Conferencia General de Pesas y Medidas (CGPM).

NOTA 1- El SI está basado en las siete **magnitudes base** del ISQ. Los nombres y símbolos de las **unidades base** se presentan en la tabla siguiente:

| Magnitud base | Unidad base | |
|---------------------------|-------------|---------|
| Nombre | Nombre | Símbolo |
| Longitud | Metro | m |
| Masa | kilogramo | kg |
| Tiempo | Segundo | s |
| Corriente eléctrica | Ampere | A |
| Temperatura termodinámica | Kelvin | K |
| Cantidad de sustancia | Mol | mol |
| Intensidad luminosa | Candela | Cd |

NOTA 2- Las unidades base y las unidades derivadas coherentes del SI

forman un conjunto coherente, denominado “conjunto de unidades SI coherentes”.

NOTA 3- Una descripción y explicación completas del Sistema Internacional de Unidades puede encontrarse en la última edición del folleto sobre el SI, publicado por la Oficina Internacional de Pesas y Medidas (BIPM) y disponible en la página de internet del BIPM.

NOTA 4- En álgebra de magnitudes, la magnitud “número de entidades” se considera frecuentemente como magnitud base, con unidad base uno, símbolo 1.

NOTA 5- Los prefijos SI para los múltiplos y submúltiplos de las unidades son:

| Factor | Prefijo | Símbolo |
|------------|---------|---------|
| 10^{24} | Yotta | Y |
| 10^{21} | Zetta | Z |
| 10^{18} | Exa | E |
| 10^{15} | Peta | P |
| 10^{12} | Tera | T |
| 10^9 | Giga | G |
| 10^6 | Mega | M |
| 10^3 | Kilo | K |
| 10^2 | Hecto | H |
| 10^1 | Deca | Da |
| 10^{-1} | deci | D |
| 10^{-2} | centi | C |
| 10^{-3} | mili | m |
| 10^{-6} | micro | μ |
| 10^{-9} | nano | n |
| 10^{-12} | pico | p |
| 10^{-15} | femto | f |
| 10^{-18} | atto | a |
| 10^{-21} | zepto | z |
| 10^{-24} | yocto | y |

Propiedad cualitativa: Atributo, propiedad de un fenómeno, cuerpo o sustancia, que no puede expresarse cuantitativamente.

EJEMPLO 1 Sexo de una persona.

EJEMPLO 2 Color de una muestra de pintura.



EJEMPLO 3 Color de un indicador de ensayo (spot test) en química.

EJEMPLO 4 Código ISO de los países, con dos letras.

EJEMPLO 5 Secuencia de aminoácidos en un polipéptido.

NOTA 1- Una propiedad cualitativa tiene un valor que puede expresarse mediante palabras, códigos alfanuméricos u otros medios.

NOTA 2- El valor de una propiedad cualitativa no debe confundirse con el valor nominal de una magnitud.

Medición: proceso que consiste en obtener experimentalmente uno o varios valores que pueden atribuirse razonablemente a una magnitud.

NOTA 1- Las mediciones no son de aplicación a las propiedades cualitativas.

NOTA 2- La medición implica una comparación de magnitudes, o el conteo de entidades.

NOTA 3- Una medición supone una descripción de la magnitud compatible con el uso previsto de un resultado de medida, un procedimiento de medida y un sistema de medida calibrado conforme a un procedimiento de medida especificado, incluyendo las condiciones de medida.

Metrología: ciencia de las mediciones y sus aplicaciones.

NOTA La metrología incluye todos los aspectos teóricos y prácticos de las mediciones, cualesquiera que sean su **incertidumbre de medida** y su campo de aplicación.

Mensurando: magnitud que se desea medir.

NOTA 1- La especificación de un mensurando requiere el conocimiento de la naturaleza de la magnitud y la descripción del estado del fenómeno, cuerpo o sustancia cuya magnitud es una propiedad, incluyendo los componentes pertinentes y las entidades químicas involucradas.

NOTA 2- En la 2ª edición del VIM y en IEC 60050-300:2001, el mensurando está definido como "magnitud sujeta a medición".

NOTA 3- La medición, incluyendo el sistema de medida y las condiciones bajo las cuales se realiza ésta, podría alterar el fenómeno, cuerpo o sustancia, de tal forma que la magnitud bajo medición difiriera del **mensurando**. En este caso sería necesario efectuar la corrección apropiada.

EJEMPLO 1 La diferencia de potencial entre los terminales de una batería puede disminuir cuando se utiliza un voltímetro con una conductancia interna significativa. La diferencia de potencial en circuito abierto puede calcularse a partir de las resistencias internas de la batería y del voltímetro.

EJEMPLO 2 La longitud de una varilla cilíndrica de acero a una temperatura de 23 °C será diferente de su longitud a la temperatura de -20 °C, para lo cual se define el mensurando. En este caso, es necesaria una corrección.

NOTA 4- En química, la "sustancia a analizar", el analito, o el nombre de la sustancia o compuesto, se emplean algunas veces en lugar de "mensurando". Esta práctica es errónea debido a que estos términos, no se refieren a magnitudes.

Resultado de medida: Resultado de una medición, conjunto de valores de una magnitud atribuidos a un **mensurando**, acompañados de cualquier otra información relevante disponible

NOTA 1- Un resultado de medida contiene generalmente información relevante sobre el conjunto de valores de una magnitud. Algunos de ellos representan el mensurando mejor que otros. Esto puede representarse como una función de densidad de probabilidad (FDP).

NOTA 2- El resultado de una medición se expresa generalmente como un valor medido único y una **incertidumbre de medida**. Si la incertidumbre de medida



se considera despreciable para un determinado fin, el resultado de medida puede expresarse como un único valor medido de la magnitud. En muchos campos ésta es la forma habitual de expresar el resultado de medida.

NOTA 3- En la bibliografía tradicional y en la edición precedente del VIM, el término resultado de medida estaba definido como un valor atribuido al mensurando y podía entenderse como indicación, resultado no corregido o resultado corregido, según el contexto.

Exactitud de medida: Proximidad entre un valor medido y un valor verdadero de un **mensurando**

NOTA 1- El concepto "exactitud de medida" no es una magnitud y no se expresa numéricamente. Se dice que una **medición** es más exacta cuanto más pequeño es el error de medida.

NOTA 2- El término "exactitud de medida" no debe utilizarse en lugar de "veracidad de medida", al igual que el término "precisión de medida" tampoco debe utilizarse en lugar de "exactitud de medida", ya que esta última incluye ambos conceptos.

NOTA 3- La exactitud de medida se interpreta a veces como la proximidad entre los valores atribuidos al mensurando.

Veracidad de medida: Proximidad entre la media de un número infinito de valores medidos repetidos y un valor de referencia

NOTA 1- La veracidad de medida no es una magnitud y no puede expresarse numéricamente, aunque la norma ISO 5725 especifica formas de expresar dicha proximidad.

NOTA 2- La veracidad de medida está inversamente relacionada con el error sistemático, pero no está relacionada con el error aleatorio.

NOTA 3- No debe utilizarse el término "exactitud de medida" en lugar de "veracidad de medida" y viceversa.

Precisión de medida: Proximidad entre las indicaciones o los valores medidos obtenidos en mediciones repetidas de un mismo objeto, o de objetos similares, bajo condiciones especificadas.

NOTA 1- Es habitual que la precisión de una medida se exprese numéricamente mediante medidas de dispersión tales como la desviación típica, la varianza o el coeficiente de variación bajo las condiciones especificadas.

NOTA 2- Las "condiciones especificadas" pueden ser **condiciones de repetibilidad, condiciones de precisión intermedia, o condiciones de reproducibilidad** (véase la norma ISO 5725-3:1994).

NOTA 3- La precisión se utiliza para definir la **repetibilidad de medida, la precisión intermedia** y la **reproducibilidad**.

NOTA 4- Con frecuencia, "precisión de medida" se utiliza, erróneamente, en lugar de "**exactitud de medida**".

Error de medida: Diferencia entre un valor medido de una magnitud y un **valor de referencia**.

NOTA 1-El concepto de error de medida puede emplearse:

- Cuando exista un único valor de referencia, como en el caso de realizar una **calibración** mediante un **patrón** cuyo valor medido tenga una **incertidumbre de medida** despreciable, o cuando se toma un valor convencional, en cuyo caso el error es conocido.
- Cuando el mensurando se supone representado por un valor verdadero único o por un conjunto de valores verdaderos, de amplitud despreciable, en cuyo caso el error es desconocido.

NOTA 2- Conviene no confundir el error de medida con un error en la producción o con un error humano.

Condición de repetibilidad de una medición: Condición de repetibilidad, Condición de **medición**, dentro de un conjunto de condiciones que incluye el



mismo **procedimiento de medida**, los mismos operadores, el mismo sistema de medida, las mismas condiciones de operación y el mismo lugar, así como mediciones repetidas del mismo objeto o de un objeto similar en un periodo corto de tiempo.

NOTA 1- Una condición de medición es una condición de repetibilidad únicamente respecto a un conjunto dado de condiciones de repetibilidad

NOTA 2- En química, el término “condición de precisión intra-serie” se utiliza algunas veces para referirse a este concepto.

Repetabilidad de medida: Precisión de medida bajo un conjunto de **condiciones de repetibilidad**.

Condición de reproducibilidad de una medición: Condición de reproducibilidad, Condición de **medición**, dentro de un conjunto de condiciones que incluye diferentes lugares, operadores, **sistemas de medida** y mediciones repetidas de los mismos objetos u objetos similares.

NOTA 1- Los diferentes sistemas de medición pueden utilizar diferentes **procedimientos de medida**.

NOTA 2- En la práctica, conviene que toda especificación relativa a las condiciones incluya las condiciones que varían y las que no.

Reproducibilidad de medida: Precisión de medida bajo un conjunto de **condiciones de reproducibilidad**.

NOTA En las normas ISO 5725-1:1994 e ISO 5725-2:1994 se detallan los términos estadísticos pertinentes.

Incertidumbre de medida: Parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los valores atribuidos a un **mensurando**, a partir de la información que se utiliza

NOTA 1- La incertidumbre de medida incluye componentes procedentes de efectos sistemáticos, tales como

componentes asociadas a correcciones y a valores asignados a patrones, así como la **incertidumbre debida a la definición**. Algunas veces no se corrigen los efectos sistemáticos estimados y en su lugar se tratan como componentes de incertidumbre.

NOTA 2- El parámetro puede ser, por ejemplo, una desviación típica, en cuyo caso se denomina incertidumbre típica de medida (o un múltiplo de ella), o una semi-amplitud con una probabilidad de cobertura determinada.

Calibración: Operación que bajo condiciones especificadas establece, en una primera etapa, una relación entre los valores y sus **incertidumbres de medida** asociadas obtenidas a partir de los **patrones de medida**, y las correspondientes indicaciones con sus incertidumbres asociadas y, en una segunda etapa, utiliza esta información para establecer una relación que permita obtener un resultado de medida a partir de una indicación

NOTA 1- Una calibración puede expresarse mediante una declaración, una función de calibración, un diagrama de calibración, una **curva de calibración** o una tabla de calibración. En algunos casos, puede consistir en una corrección aditiva o multiplicativa de la indicación con su incertidumbre correspondiente.

NOTA 2- Conviene no confundir la calibración con el ajuste de un sistema de medida, a menudo llamado incorrectamente “autocalibración”, ni con una **verificación** de la calibración.

NOTA 3- Frecuentemente se interpreta que únicamente la primera etapa de esta definición corresponde a la calibración.

Jerarquía de calibración: Secuencia de **calibraciones** desde una referencia hasta el sistema de medida final, en la cual el resultado de cada calibración depende del resultado de la calibración precedente



NOTA 1- La incertidumbre de medida va aumentando necesariamente a lo largo de la secuencia de calibraciones.

NOTA 2- Los elementos de una jerarquía de calibración son **patrones** y sistemas de medida utilizados según **procedimientos de medida**.

NOTA 3- En esta definición, la referencia puede ser la definición de una unidad de medida, a través de una realización práctica, un procedimiento de medida o un patrón.

NOTA 4- La comparación entre dos patrones de medida puede considerarse como una calibración si ésta se utiliza para comprobar y, si procede, corregir el valor y la incertidumbre atribuida a uno de los patrones.

Trazabilidad metrológica: Propiedad de un resultado de medida por la cual el resultado puede relacionarse con una referencia mediante una cadena ininterrumpida y documentada de **calibraciones**, cada una de las cuales contribuye a la **incertidumbre de medida**.

NOTA 1- En esta definición, la referencia puede ser la definición de una unidad de medida, mediante una realización práctica, un **procedimiento de medida** que incluya la unidad de medida cuando se trate de una **magnitud no ordinal**, o un **patrón**.

NOTA 2- La trazabilidad metrológica requiere una **jerarquía de calibración** establecida.

NOTA 3- La especificación de la referencia debe incluir la fecha en la cual se utilizó dicha referencia, junto con cualquier otra información metrológica relevante sobre la referencia, tal como la fecha en que se haya realizado la primera calibración en la jerarquía.

NOTA 4- Para mediciones con más de una magnitud de entrada en el modelo de medición, cada valor de entrada debiera ser metrológicamente trazable y la jerarquía de calibración puede tener forma de estructura ramificada o de red. El esfuerzo realizado para establecer la

trazabilidad metrológica de cada valor de entrada debería ser en proporción a su contribución relativa al resultado de la medición.

NOTA 5- La trazabilidad metrológica de un resultado de medida no garantiza por sí misma la adecuación de la incertidumbre de medida a un fin dado, o la ausencia de errores humanos.

NOTA 6- La comparación entre dos patrones de medida puede considerarse como una calibración si ésta se utiliza para comprobar, y si procede, corregir el valor y la incertidumbre atribuidos a uno de los patrones.

NOTA 7- La ILAC considera que los elementos necesarios para confirmar la trazabilidad metrológica son: una cadena de trazabilidad metrológica ininterrumpida a un patrón internacional o a un patrón nacional, una incertidumbre de medida documentada, un procedimiento de medida documentado, una competencia técnica reconocida, la trazabilidad metrológica al SI y los intervalos entre calibraciones (véase ILAC P-10:2002).

NOTA 8- Algunas veces el término abreviado “trazabilidad” se utiliza en lugar de “trazabilidad metrológica” así como para otros conceptos, como trazabilidad de una muestra, de un documento, de un instrumento, de un material, etc., cuando interviene el historial (“traza”) del elemento en cuestión. Por tanto, es preferible utilizar el término completo “trazabilidad metrológica” para evitar confusión.

Trazabilidad metrológica a una unidad de medida: Trazabilidad metrológica en la que la referencia es la definición de una unidad de medida mediante su realización práctica.

NOTA La expresión “trazabilidad al SI” significa trazabilidad metrológica a una unidad de medida del **Sistema Internacional de Unidades**.



Verificación: Aportación de evidencia objetiva de que un elemento satisface los requisitos especificados

EJEMPLO 1 La confirmación de que un **material de referencia** declarado homogéneo lo es para el valor y el procedimiento de medida correspondientes, para muestras de masa de valor hasta 10 mg.

EJEMPLO 2 La confirmación de que se satisfacen las propiedades de funcionamiento declaradas o los requisitos legales de un sistema de medida.

EJEMPLO 3 La confirmación de que puede alcanzarse una incertidumbre objetivo.

NOTA 1- Cuando sea necesario, es conveniente tener en cuenta la **incertidumbre de medida**.

NOTA 2- El elemento puede ser, por ejemplo, un proceso, un procedimiento de medida, un material, un compuesto o un sistema de medida.

NOTA 3- Los requisitos especificados pueden ser, por ejemplo, las especificaciones del fabricante.

NOTA 4- En metrología legal, la verificación, tal como la define el VIML, y en general en la evaluación de la conformidad, puede conllevar el examen, marcado o emisión de un certificado de verificación de un sistema de medida.

NOTA 5- No debe confundirse la verificación con la **calibración**. No toda verificación es una **validación**.

NOTA 6- En química, la verificación de la identidad de una entidad, o de una actividad, requiere una descripción de la estructura o las propiedades de dicha entidad o actividad.

Validación: Verificación de que los requisitos especificados son adecuados para un uso previsto.

EJEMPLO Un procedimiento de medida habitualmente utilizado para la medición de la concentración en masa de nitrógeno en agua, puede también validarse para la medición en el suero humano.

Corrección: Compensación de un efecto sistemático estimado

NOTA 1- Véase la Guía ISO/IEC 98-3:2008, 3.2.3, para una explicación del concepto de “efecto sistemático”.

NOTA 2- La compensación puede tomar diferentes formas, tales como la adición de un valor o la multiplicación por un factor, o bien puede deducirse de una tabla.

Instrumento de medida: Dispositivo utilizado para realizar **mediciones**, solo o asociado a uno o varios dispositivos suplementarios.

NOTA 1- Un instrumento de medida que puede utilizarse individualmente es un **sistema de medida**.

NOTA 2- Un instrumento de medida puede ser un instrumento indicador o una medida materializada.

Sistema de medida: Conjunto de uno o más **instrumentos de medida** y, frecuentemente, otros dispositivos, incluyendo reactivos e insumos varios, ensamblados y adaptados para proporcionar valores medidos dentro de intervalos especificados, para magnitudes de naturalezas dadas

NOTA Un sistema de medida puede estar formado por un único instrumento de medida.

Detector: Dispositivo o sustancia que indica la presencia de un fenómeno, cuerpo o sustancia cuando se excede un valor umbral de una magnitud asociada

EJEMPLOS Detector de fugas de halógeno, papel tornasol.

NOTA 1- En algunos campos el término “detector” es utilizado en lugar de sensor.

NOTA 2- En química frecuentemente se emplea el término “indicador” para este concepto.

3.11 ajuste de un sistema de medida,

Conjunto de operaciones realizadas sobre un sistema de medida para que proporciones indicaciones prescritas, correspondientes a valores dados de la magnitud a medir



NOTA 1- Diversos tipos de ajuste de un sistema de medida son: ajuste de cero, ajuste del offset (desplazamiento) y ajuste de la amplitud de escala (denominado también ajuste de la ganancia).

NOTA 2- No debe confundirse el ajuste de un sistema de medida con su propia calibración, que es un requisito para el ajuste.

NOTA 3- Después de su ajuste, generalmente un sistema de medida debe ser calibrado nuevamente.

4. Propiedades de los dispositivos de medida

4.12 sensibilidad de un sistema de medida,

Cociente entre la variación de una indicación de un sistema de medida y la variación correspondiente del valor de la magnitud medida

NOTA 1- La sensibilidad puede depender del valor de la magnitud medida.

NOTA 2- La variación del valor de la magnitud medida debe ser grande en comparación con la resolución.

4.14 resolución,

Mínima variación de la magnitud medida que da lugar a una variación perceptible de la indicación correspondiente

NOTA La resolución puede depender, por ejemplo, del ruido (interno o externo) o de la fricción. También puede depender del valor de la magnitud medida.

4.18 límite de detección,

Valor medido, obtenido mediante un procedimiento de medida dado, con una probabilidad β de declarar erróneamente la ausencia de un constituyente en un material, dada una probabilidad α de declarar erróneamente su presencia

NOTA 1- La IUPAC recomienda por defecto los valores de α y β iguales a 0,05.

NOTA 2- En inglés algunas veces se usa la abreviatura LOD.

NOTA 3- No debe utilizarse el término "sensibilidad" en lugar de "límite de detección".

Curva de calibración: Expresión de la relación entre una indicación y el valor medido correspondiente

NOTA Una curva de calibración expresa una relación biunívoca, que no proporciona un resultado de medida, ya que no contiene información alguna sobre la incertidumbre de medida.

Patrón de medida: Realización de la definición de una magnitud dada, con un valor determinado y una incertidumbre de medida asociada, tomada como referencia

EJEMPLO 1 Patrón de masa de 1 kg, con una incertidumbre típica asociada de $3 \mu\text{g}$

EJEMPLO 2 Resistencia patrón de 100Ω , con una incertidumbre típica asociada de $1 \mu\Omega$

EJEMPLO 3 Patrón de frecuencia de cesio, con una incertidumbre típica relativa asociada de 2×10^{-15}

EJEMPLO 4 Electrodo de referencia de hidrógeno, con un valor asignado de 7.072 y una incertidumbre típica asociada de 0.006

EJEMPLO 5 Serie de disoluciones de referencia, de cortisol en suero humano, que tienen un valor certificado con una incertidumbre de medida

EJEMPLO 6 **Materiales de referencia** con valores e incertidumbres de medida asociadas, para la concentración de masa de diez proteínas diferentes

NOTA 1- La "realización de la definición de una magnitud dada" puede establecerse mediante un sistema de medida, una medida materializada o un material de referencia.

NOTA 2- Un patrón se utiliza frecuentemente como referencia para obtener valores medidos e incertidumbres de medida asociadas para otras magnitudes de la misma naturaleza, estableciendo así la trazabilidad metrológica, mediante calibración de otros patrones, instrumentos o sistemas de medida.

NOTA 3- El término "realización" se emplea aquí en su sentido más general.



Se refiere a tres procedimientos de realización. El primero, la realización stricto sensu, es la realización física de la unidad a partir de su definición. El segundo, denominado “reproducción”, consiste, no en realizar la unidad a partir de su definición, sino en construir un patrón altamente reproducible basado en un fenómeno físico, por ejemplo el empleo de láseres estabilizados en frecuencia para construir un patrón del metro, el empleo del efecto Josephson para el volt o el efecto Hall cuántico para el ohm. El tercer procedimiento consiste en adoptar una medida materializada como patrón. Es el caso del patrón de 1 kg.

NOTA 4- La incertidumbre típica asociada a un patrón es siempre una componente de la incertidumbre típica combinada (véase la Guía ISO/IEC 98-3:2008, 2.3.4) de un resultado de medida obtenido utilizando el patrón. Esta componente suele ser pequeña comparada con otras componentes de la incertidumbre típica combinada.

NOTA 5- El valor de la magnitud y de su incertidumbre de medida deben determinarse en el momento en que se utiliza el patrón.

NOTA 6- Varias magnitudes de la misma naturaleza o de naturaleza diferentes pueden realizarse mediante un único dispositivo, denominado también patrón.

NOTA 7- En el idioma inglés algunas veces se utiliza la palabra “embodiment” (materialización) en vez de “realization”.

Calibrador: Patrón utilizado en calibraciones.

NOTA Este término sólo se utiliza en ciertos campos

Cuando un patrón se usa específicamente para propósitos de calibración más que para propósitos de control de calidad, este patrón viene a ser un **calibrador**. (De Bièvre, Dybkaer, Fajgelj, & Hibbert, 2011).

NOTA: El término “calibrante” también es usado.

Además del valor de cantidad asignado y la estimación de la incertidumbre, un calibrador deberá ser acompañado de la siguiente información: origen (trazabilidad del material), producción, definición de la cantidad, cualquier matriz, homogeneidad, estabilidad, procedimiento usado en la asignación del valor de la cantidad y la incertidumbre de medición, estado de la trazabilidad metrológica, fecha de caducidad, propósito de uso del calibrador y las instrucciones de uso.

El calibrante, además de tener estas propiedades esenciales, su uso en una jerarquía de calibración requiere que éste sea conmutable.

Calibrador primario: Es un calibrador establecido sin referencia hacia otro calibrador del mismo tipo de cantidad.

NOTA 1- El valor y la incertidumbre asociada a un calibrador primario es obtenida por un procedimiento de medición de referencia primario o por un procedimiento de preparación primario.

NOTA 2- El calibrador primario usualmente se acompaña de un certificado o un certificado de calibración expedido por un instituto nacional o internacional de metrología.

NOTA 3- Con frecuencia se asume que un calibrador primario es parte de una magnitud con un valor que alcanza la incertidumbre de medición más pequeña, pero que el tamaño de la incertidumbre relativa no es un criterio para denominarlo como “primario”.

En el caso de que no exista un calibrador primario disponible, la norma ISO 17511 recomienda producir un:

Calibrador convencional internacional:

Es un calibrador establecido por acuerdo internacional.

Calibrador secundario: Es un calibrador establecido mediante medición de acuerdo a un procedimiento de medición



de referencia secundario. (De Bièvre , Dybkaer, Fajgelj, & Hibbert, 2011).

Material de referencia, MR: Material suficientemente homogéneo y estable con respecto a propiedades especificadas, establecido como apto para su uso previsto en una medición o en un examen de propiedades cualitativas

NOTA 1- El examen de una propiedad cualitativa comprende la asignación de un valor a dicha propiedad y de una incertidumbre asociada. Esta incertidumbre no es una incertidumbre de medida.

NOTA 2- Los materiales de referencia con o sin valores asignados pueden servir para controlar la precisión de la medida, mientras que únicamente los materiales con valores asignados pueden utilizarse para la calibración o control de la veracidad.

NOTA 3- Los materiales de referencia comprenden materiales que representan tanto magnitudes como propiedades cualitativas.

EJEMPLO 1 Ejemplos de materiales de referencia que representan magnitudes

- a) agua de pureza declarada, cuya viscosidad dinámica se emplea para la calibración de viscosímetros.
- b) Suero humano sin valor asignado a la concentración de colesterol inherente, utilizado solamente como material para el control de la precisión de la medida.
- c) Tejido de pescado con una fracción másica determinada de dioxina, utilizado como calibrador.

EJEMPLO 2 Ejemplo de materiales de referencia que representan propiedades cualitativas

- a) carta de colores mostrando uno o más colores especificados.
- b) ADN conteniendo una secuencia especificada de nucleótido.
- c) Orina conteniendo 19-androstenediona.

NOTA 4- Algunas veces un material de referencia se incorpora a un dispositivo fabricado especialmente.

EJEMPLO 1 Sustancia de punto triple conocido como celda de punto triple.

EJEMPLO 2 Vidrio de densidad óptica conocida, en un soporte de filtro de transmitancia.

EJEMPLO 3 Esferas de granulometría uniforme montadas en un portamuestras de microscopio.

NOTA 5- Algunos materiales de referencia tienen valores asignados que son metrológicamente trazables a una unidad de medida fuera de un sistema de unidades. Tales materiales incluyen vacunas a las que la Organización Mundial de la Salud ha asignado Unidades Internacionales (UI).

NOTA 6- En una medición dada, un material de referencia puede utilizarse únicamente para calibración o para el aseguramiento de la calidad.

NOTA 7- Dentro de las especificaciones de un material de referencia conviene incluir su trazabilidad, su origen y el proceso seguido (Accre. Qual. Assur.:2006).

NOTA 8- La definición según ISO/REMCO es análoga, pero emplea el término "proceso de medida" para indicar "examen" (ISO 15189:2007, 3.4), el cual cubre tanto una medición de la magnitud como el examen de una propiedad cualitativa.

Material de referencia certificado, MRC: Material de referencia acompañado por la documentación emitida por un organismo autorizado, que proporciona uno o varios valores de propiedades especificadas, con incertidumbres y trazabilidades asociadas, empleando procedimientos válidos.

EJEMPLO Suero humano, con valores asignados a la concentración de colesterol y a la incertidumbre de



MANUAL DE PROTOCOLOS DE MEDICION

medida indicados en un certificado, empleado como calibrador o como material para el control de la veracidad de la medida.

NOTA 1- La “documentación” mencionada se proporciona en forma de “certificado” (véase la Guía ISO 31:2000).

NOTA 2- Procedimientos para la producción y certificación de materiales de referencia certificados puede encontrarse, por ejemplo, en las Guías ISO 34 e ISO 35.

NOTA 3- En esta definición, el término “incertidumbre” se refiere tanto a la “incertidumbre de la medida” como a la “incertidumbre del valor de la propiedad cualitativa”, tal como su identidad y secuencia. El término “trazabilidad” incluye tanto la “trazabilidad metrológica” del valor de la magnitud como la “trazabilidad del valor de la propiedad cualitativa”.

NOTA 4- Los valores de las magnitudes especificadas de los materiales de referencia certificados requieren una trazabilidad metrológica con una incertidumbre de medida asociada (Accred. Qual. Assur.:2006)

NOTA 5- La definición de ISO/REMCO es análoga ((Accred. Qual. Assur.:2006) pero utiliza el calificativo “metrológica” tanto para una magnitud como para una propiedad cualitativa.

Conmutabilidad de un material de referencia: Propiedad de un material de referencia, demostrada por la proximidad de concordancia entre la relación de los resultados de medida para una magnitud determinada de este material, obtenidos de acuerdo a dos procedimientos de medida dados, y la relación obtenida entre los resultados de medida para otros materiales especificados.

NOTA 1- El material de referencia en cuestión es generalmente un calibrador,

y los otros materiales especificados son generalmente muestras de rutina.

NOTA 2- Los procedimientos de medida mencionados en la definición son el anterior y el posterior al material de referencia utilizado como calibrador, en la jerarquía de calibración (véase ISO 17511).

NOTA 3 La estabilidad de los materiales de referencia conmutables debe ser monitoreada regularmente



ANEXO IV

Tabla 21. Lista de abreviaturas

| Acrónimo | Nombre original | Nombre traducido |
|------------------|---|---|
| BIPM | Bureau International des Poids et Mesures | Oficina Internacional de Pesas y Medidas |
| CCQM | Consultative Committee for Amount of Substance. | Comité Consultivo para la Cantidad de Materia |
| CENAM | Centro Nacional de Metrología | |
| CIBIOGEM | Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados | |
| CGPM | The General Conference on Weights and Measures | Conferencia General de Pesas y Medidas |
| ENGL | European Network of GMO Laboratories | Red Europea de Laboratorios de Organismos Genéticamente Modificados |
| ema | Entidad Mexicana de Acreditación | |
| EU | Europea Union | Unión Europea |
| EURL-GMFF | European Union Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed | |
| GUM | Guide to the expression of uncertainty in measurements | Guía para la expresión de la incertidumbre de medida |
| ILAC | International Laboratory Accreditation Cooperation | Cooperación Internacional de Acreditación de Laboratorios |
| INIFAP | Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias | |
| ISO | International Standardization Organization | Organización Internacional de Normalización |
| ISO/REMCO | International Standardization Organization/Reference Material Commite | Organización Internacional de Normalización, Comité de Materiales de Referencia |
| IUPAC | International Union of Pure and Applied Chemistry | Unión Internacional de Química Pura y Aplicada |
| MRC | Material de Referencia Certificado | |
| OGM | Organismo Genéticamente Modificado | |
| OIML | International Organization of Legal Metrology | Organización Internacional de Metrología Legal |
| SAGARPA | Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación | |
| SENASICA | Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria | |
| VIM | Vocabulario Internacional de Metrología | Vocabulario Internacional de Metrología |
| VIML | Vocabulario Internacional de Términos de Metrología Legal | |



ANEXO V

Tabla No. 22 Controles de amplificación del ADN por PCR

| Pasos de control | Control ambiental ^b | Control blanco de extracción ^c | Control positivo de extracción ^d | Control positivo del ADN blanco | Control negativo del ADN blanco | Control de amplificación de reactivos | Control de inhibición de la PCR |
|---|--------------------------------|---|---|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|---|
| Homogenización | Recomendado | | | | | | |
| Extracción de ácidos nucleicos | ↓ ^a | Uno por serie | OBLIGATORIO a intervalos regulares | | | | |
| Control de la calidad de los ácidos nucleicos | ↓ | ↓ | ↓ | | | | |
| Amplificación de los ácidos nucleicos | ↓ | ↓ | ↓ | OBLIGATORIO | Recomendado | OBLIGATORIO | Recomendado, pero obligatorio en algunos casos ^e |
| Evaluación de la amplificación del ADN | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ |

a: las flechas indican que se recomienda que el control se emplee en las etapas analíticas subsecuentes.
b: su uso ayuda al analista de laboratorio a identificar las fuentes de contaminación en una etapa temprana, incluso se puede identificar el área de trabajo en la cual la contaminación está presente.
c: debe incluirse al menos un control blanco cada vez que se extrae ADN de una o más muestras.
d: incluir uno siempre que se utilice un nuevo lote de reactivos.
e: es obligatorio incluir un control de inhibición de PCR, cuando los resultados de la amplificación fueron negativos y para aquellas matrices en las que se desconoce el rendimiento en la amplificación.

* Tabla adaptada de ISO 24276:2006



ANEXO VI

Método CTAB

Tabla. 23 Reactivos para método CTAB

| |
|--|
| <p><u>Disolución α amilasa (opcional) 10 mg/mL.</u> Esta disolución no deberá ser esterilizada. Almacenar a -20 °C y evitar su congelamiento y descongelamiento en repetidas ocasiones.</p> |
| <p><u>Buffer de extracción, $p(\text{CTAB})= 20 \text{ g/L}$, $c(\text{NaCl})= 1.4 \text{ mol/L}$, $c(\text{Tris})= 0.1 \text{ mol/L}$, $c(\text{Na}_2\text{EDTA})= 0.02 \text{ mol/L}$.</u> Ajustar el pH a 8.0 con HCl o NaOH</p> |
| <p><u>Buffer de precipitación CTAB, $p(\text{CTAB})= 5 \text{ g/L}$, $c(\text{NaCl})= 0.04 \text{ mol/L}$.</u></p> |
| <p>Disolución de cloruro de sodio $c(\text{NaCl})= 1.2 \text{ mol/L}$.</p> |
| <p>Disolución de etanol, $\emptyset(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 70\%$</p> |
| <p><u>Disolución de proteínasa K (opcional), $p= 20 \text{ mg/ml}$</u> Disolver la enzima en agua estéril. Esta disolución no deberá ser esterilizada. Almacenar en alícuotas a una temperatura de 20 °C y evitar su congelamiento y descongelamiento en repetidas ocasiones.</p> |
| <p><u>Disolución ARNasa, $p(\text{RNasa A})= 10 \text{ mg/mL}$. (opcional)</u> Almacenar en alícuotas a 20 °C.</p> |
| <p><u>Buffer TE, $c(\text{TRIS}) = 0.01 \text{ mol/L}$, $c(\text{Na}_2\text{EDTA}) = 0.001 \text{ mol/L}$.</u> Ajustar el pH a 8.0 con HCl o NaOH</p> |

Tabla. 24 Disoluciones para método CTAB

| |
|--|
| <p><u>Disolución α amilasa (opcional) 10 mg/mL.</u> Esta disolución no deberá ser esterilizada. Almacenar a -20 °C y evitar su congelamiento y descongelamiento en repetidas ocasiones.</p> |
| <p><u>Buffer de extracción, $p(\text{CTAB})= 20 \text{ g/L}$, $c(\text{NaCl})= 1.4 \text{ mol/L}$, $c(\text{Tris})= 0.1 \text{ mol/L}$, $c(\text{Na}_2\text{EDTA})= 0.02 \text{ mol/L}$.</u> Ajustar el pH a 8.0 con HCl o NaOH</p> |
| <p><u>Buffer de precipitación CTAB, $p(\text{CTAB})= 5 \text{ g/L}$, $c(\text{NaCl})= 0.04 \text{ mol/L}$.</u></p> |
| <p>Disolución de cloruro de sodio $c(\text{NaCl})= 1.2 \text{ mol/L}$.</p> |
| <p>Disolución de etanol, $\emptyset(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 70\%$</p> |
| <p><u>Disolución de proteínasa K (opcional), $p= 20 \text{ mg/ml}$</u> Disolver la enzima en agua estéril. Esta disolución no deberá ser esterilizada. Almacenar en alícuotas a una temperatura de 20 °C y evitar su congelamiento y descongelamiento en repetidas ocasiones.</p> |
| <p><u>Disolución ARNasa, $p(\text{RNasa A})= 10 \text{ mg/mL}$. (opcional)</u> Almacenar en alícuotas a 20 °C.</p> |
| <p><u>Buffer TE, $c(\text{TRIS}) = 0.01 \text{ mol/L}$, $c(\text{Na}_2\text{EDTA}) = 0.001 \text{ mol/L}$.</u> Ajustar el pH a 8.0 con HCl o NaOH</p> |



Tabla. 25 Matrices probadas con el método CTAB

Fórmula infantil
 Comida infantil
 Mezcla de pastel
 Biscochos
 Cubos de caldo de pollo*
 Caramelos dulces o agrio
 Maíz enlatado
 Crema de caramelo*
 Pastel para ganado (Cattlecakes)
 Granos de cereal: arroz, trigo, avena, centeno, trigo sarraceno
 Barras de chocolate*
 Crema de chocolate*
 Chocolates*
 Galletas de chocolate*
 Galletas
 Cerveza de maíz*
 Hojuelas de maíz*
 Crema para postre
 Dextrosa*
 Rellenos de pralinés
 Pastas finas
 Pescado*
 Dedos de pescado*
 Hojuelas o frijoles enteros de soya
 Papas fritas
 Gravy*
 Jamón hervido
 Miel*
 Comidas instantáneas
 Harina de maíz
 Germen de maíz*
 Alimento de gluten de maíz
 Hojas de maíz
 Almidón nativo de maíz*
 Aceite de maíz (nativo)*
 Proteínas de maíz*
 Semillas/granos de maíz
 Semolina de maíz
 Margarina*
 Carne fresca
 Leche en polvo
 Leche
 Alimento de mascota
 Muesli*
 semillas de frijol verde mungo

Hojas de mostaza
 Palomitas de maíz
 Papas (chips)
 Almidón de papa (nativo)
 Tubérculos de papa
 Aceite de mostaza (crudo/nativo)*
 Semillas de aceite de mostaza
 Lecitina de soya *
 Comidas instantáneas
 Salami (alto contenido de grasa)
 Snaks salados (maíz)
 Embutidos
 Agentes sazonantes*
 Almidones modificados (algunos tipos)*
 Dip de crema con cebolla*
 Harina de soya
 Germen de soya (conservado, congelado)
 Proteína de soya*
 Bebidas de soya*
 Semillas/granos de soya
 Tofu de soya
 Frijoles de soya acidificada*
 Hojas de betabel
 Semillas de betabel
 Semillas de girasol
 Surimi con soya*
 Maíz dulce
 Tostada para tacos
 Taramas (pasta de hueva de pescado)
 Tabaco
 Salsa de tomate (kétchup)*
 Concentrado de tomate*
 Tomates
 Totopos (Chips de tortilla)*
 Hamburguesas vegetarianas
 Waffles*
 Almidón de trigo (nativo)
 Yogurts*

NOTA:*En estos productos, la repetibilidad de los resultados del método dependerá de la tecnología de producción y del número de lote del alimento. Ya que ha sido observado, degradación del ADN o su detección se encuentra por debajo del LOD del método.



ANEXO VII

Método fenol/cloroformo

Tabla. 26 Reactivos para método

Fenol/cloroformo

| |
|--|
| Ácido acético glacial (CH_3COOH) |
| Cloroformo (CHCl_3) |
| Etanol, Ø($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) = 96 % Almacenar y usar a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ |
| Sal dipotásica de ácido etilendiaminotetraacético (K_2EDTA) ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{K}_2$) |
| Fenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$) |
| Ácido clorhídrico, Ø(HCl) = 37 % |
| Alcohol isoamílico[(CH_3) ₂ CHCH ₂ CH ₂ OH] |
| Proteinasa K, aprox. 20 unidades /mg del liofilizado. |
| Acetato de potasio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{K}$) |
| Ribonucleasa A, libre de DNasa, de páncreas de bovino, aprox. 50 unidades Kunitz/mg de liofilizado. |
| Cloruro de potasio (KCl) |
| Hidróxido de potasio (KOH) |
| Tris hidroximetilaminometano (Tris) ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$) |
| Dodecilsulfato de sodio (SDS) ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{O}_4\text{SNa}$) |



Tabla.27 Disoluciones para método Fenol/Cloroformo

| |
|--|
| <p><u>Buffer de extracción/lisis.</u> $p(\text{SDS}) = 30 \text{ g/L}$, $c(\text{Tris}) = 0.050 \text{ mol/L}$ $c(\text{K}_2\text{EDTA}) = 0.050 \text{ mol/L}$. Ajustar el pH a 8.0 con HCl o KOH</p> |
| <p><u>Disolución de alcohol isoamílico-cloroformo.</u> Mezclar 24 partes de cloroformo con 1 parte de alcohol isoamílico. Las partes medidas en volumen.</p> |
| <p><u>Disolución de alcohol isoamílico-cloroformo-fenol.</u> Mezclar 1 parte de fenol equilibrado con 1 parte de disolución alcohol isoamílico-cloroformo. Las partes medidas en volumen.</p> |
| <p><u>Disolución de acetato de potasio $c(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{K}) = 3.0 \text{ mol/L}$.</u> Ajustar el pH a 5.2 con ácido acético glacial. No esterilizar la disolución. Si es necesario filtrar empleando un filtro de 0.22μ</p> |
| <p>Disolución de etanol, $\emptyset(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 70 \%$ Almacenar y usar a -20°C</p> |
| <p><u>Disolución de proteínasa K, $p = 20 \text{ mg/ml}$</u> Disolver la enzima en agua estéril. Esta disolución no deberá ser esterilizada. Almacenar en alícuotas a una temperatura de 20°C y evitar su congelamiento y descongelamiento en repetidas ocasiones.</p> |
| <p><u>Disolución ARNasa, $p = 10 \text{ mg/mL}$ de liofilizado.</u> Almacenar en alícuotas a 20°C. Evitar el congelamiento/descongelamiento.</p> |
| <p>Buffer TE, $c(\text{TRIS}) = 0.010 \text{ mol/L}$, $c(\text{K}_2\text{EDTA}) = 0.001 \text{ mol/L}$. Ajustar el pH a 8.0 con HCl o KOH</p> |
| <p>Fenol Equilibrado, $\text{pH} > 7.8$ Usar el fenol equilibrado en lugar del buffer de extracción sin SDS.</p> |

Tabla. 28 Matrices probadas con el método



Fenol/Cloroformo

Frijoles de soya acidificada*
Alfalfa deshidratada
Biscochos para bebé*
Leche para bebé*
Bacterias y sus esporas
Semillas de cebada
Pate de res/puerco*
Cerveza*
Queso azul
Brownies*
Maíz enlatado
Semillas de zanahoria
Barras de cereal*
Queso
Nuggets de pollo
Hojas y raíces de endivias
Galletas de chocolate*
Pasta de chocolate*
Galletas de canela*
Compotas
Hojuelas de maíz*
Arroz quebrado

Semillas de chícharos secos
Biscochos de maíz*
Pasteles maíz aceite para alimentación
Harina de maíz
Gluten de maíz para alimentación
Carne de tapioca
Carne cocida* y fresca (res, pollo, puerco y pavo)
Pulpa de la fruta de melón
Semillas de melón
Carne picada
Ingredientes del muesli*
Muesli
Semillas de frijol verde mungo*
Semillas de avena
Tubérculos de papa
Semilla de colza
Embutidos (en rebanadas y en cocktail*)
Schnitzel (platillo Alemán)
Proteína de soya contenida en preparaciones de carne*
Lecitina de soya (café y amarilla*)
Germen de soya*
Bebidas de soya
Crema de soya

NOTA:*En estos productos, la repetibilidad de los resultados del método dependerá de la tecnología de producción y del número de lote del alimento. Ya que se ha observado que el ADN sufre degradación o bien, su detección se encuentra por debajo del LD del método.

