

# ESTUDIO NACIONAL COLABORATIVO PARA LA ARMONIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA DÚPLEX DEL TERMINADOR NOS-RESPECTO AL GEN *Le1* EN HARINA DE SOYA

Maria G. Barrera Andrade<sup>1</sup>, Laura E. Tovar<sup>2</sup>, y Melina Pérez Urquiza<sup>3</sup>

<sup>1</sup>CNRDOGM, Carretera Federal México-Pachuca km 37.5 C.P. 55740, Municipio de Tecámac, Estado de México Tel. (55) 5905-1000, Ext. 53039 maria.barrera@senasica.gob.mx

<sup>2</sup>CIBIOGEM, Av. San Borja No. 938, Esq. Heriberto Frías Col. Del Valle, Del. Benito Juárez. C.P. 03100 Ciudad de México, D.F. Tel. 55756878 ext. 8210 Tel. 53227873 e-mail: ltovar@conacyt.mx

<sup>3</sup>CENAM, Km 4.5 Carretera a los Cués Mpio el Marqués Qro. 442 2110500 x3920, meperez@cenam.mx

**Resumen:** En este trabajo se presentan los resultados del 4° estudio nacional colaborativo de la RNLD-OGM (ENC 2015), participaron 10 laboratorios, con dos de nuevo ingreso. Se cumplió con el objetivo de armonizar los métodos de cuantificación de OGMs, utilizando MRC para la determinación de la fracción *t-NOS/gen* de referencia *Le1* por método dúplex en 8 laboratorios, y en dos de nuevo ingreso los métodos simplex para la determinación del *p35S/gen* de referencia *Le1*.

## 1. INTRODUCCIÓN

México ha creado y fortalecido su capacidad para la generación de materiales de referencia certificados para OGM en los últimos 5 años, siendo el primer país en Latinoamérica que cuenta con esta capacidad. En el momento de diseñar el estudio que se presenta, no existía comercialmente un MRC para el terminador Nos, por lo que únicamente se realizaba el análisis cualitativo de dicho elemento. Fue necesario desarrollar un material de referencia que permitiera determinar y emitir un resultado cuantitativo, ya que varios eventos de modificación genética no tienen la presencia del promotor 35S *CaMV*. Para evidenciar el cumplimiento de la regulación nacional e internacional se requiere que en la prueba de *screening*, donde se encuentre un resultado positivo para el terminador Nos, pueda registrarse el contenido del mismo expresado en porcentaje en masa.

Se trató de un estudio nacional colaborativo (ENC), para la armonización de metodologías en materia de detección y cuantificación de Organismos Genéticamente Modificados (OGM). Se utilizó el material de referencia certificado DMR 495 IIa, y el material de referencia DMR 495 IIIa utilizado como muestra ciega para la medición de su contenido de *p35S*, y del terminador Nos con el objeto de realizar la comparación de los resultados de la Red Nacional de laboratorios de Detección, Identificación y Cuantificación de OGMs (RNLD-OGM) respecto a los valores de referencia. Con el material de referencia certificado (MRC) se estableció el valor de referencia para el promotor 35S, y con el valor de

referencia obtenido con PCR digital el del terminador Nos, respecto al gen de referencia *Le1*.

## 2. DESARROLLO

El ENC 2015 corresponde a una cuarta etapa de estudios colaborativos nacionales para establecer la comparabilidad de las mediciones, en este caso para el marcador de modificación genética *t-NOS/Le1* en soya, entre laboratorios, utilizando las técnicas de medición que se emplean para su detección y cuantificación. Este marcador es uno de los elementos de regulación más comúnmente empleados para el tamizaje de OGMs en los laboratorios analíticos, además de ser una de las cinco secuencias propuestas por Waiblinger para la detección de OGMs autorizados y no autorizados en maíz [1] y soya entre otros, por lo que estandarizar su protocolo de detección fortalecería las capacidades de la RNLD-OGM. Se propuso armonizar los métodos de cuantificación de OGM, analizando parámetros de medición como, veracidad, repetibilidad, reproducibilidad, límites de detección y cuantificación e incertidumbres de medición, y obtener de esta manera información útil para evidenciar el cumplimiento de la regulación nacional e internacional. Así como fortalecer la capacidad analítica de México en esta área.

## 3. RESULTADOS

En la **tabla 1** se presentan los valores de Referencia Certificados y valores de Referencia del MRC utilizado como muestra ciega problema entregada a los participantes.

Mensurando	Fracción copias, % (cp/cp)	Incertidumbre (±) Fracción copias, % (cp/cp)
Promotor 35S/Le1	1.9	0.3
Terminador NOS/Le1	1.9	0.1

U (k=2.8), para el promotor 35S/Le1 y U (k=2) para el terminador NOS/Le1, que define un nivel de confianza de aproximadamente el 95 %.

En la figura 1 se presentan los resultados obtenidos por los laboratorios.

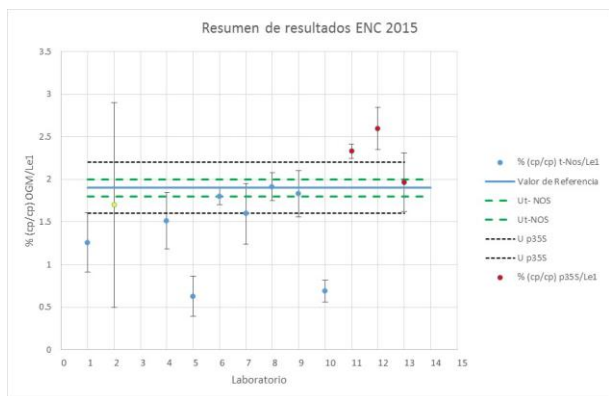


Fig. 1. Resultados obtenidos por los laboratorios en el ENC 2015.

En la **tabla 2** se presentan las medidas de tendencia central y de dispersión obtenidas en el ENC 2015.

Medidas de tendencia central		Medidas de dispersión	
Promedio	1.7	0.4	desviación estándar del promedio
Mediana	1.8	0.30	promedio de las desviaciones absolutas de la media
Media geométrica	1.5	0.6	desviación estándar de la población

Se calculó el z-score para cada laboratorio participante, considerando el valor de referencia 1.9, y 1.8 Mediana de todos los resultados, como estimador de referencia; la incertidumbre expandida del valor de referencia y el promedio de las desviaciones absolutas de la media como estimador de la dispersión de resultados.

#### 4. DISCUSIÓN

De los resultados de 10 laboratorios presentados en el gráfico, seis (2, 4, 6, 7, 8-9, y 13) mostraron resultados, cuyo valor e incertidumbre se encuentran dentro del intervalo del valor de referencia incluyendo su incertidumbre ( $\pm ulab$ ).

#### 5. CONCLUSIONES

Se concluye que se cumplió con el objetivo del estudio de armonizar los métodos de cuantificación de OGM, en este caso utilizando un método dúplex para la determinación de *t-NOS/gen* de referencia *Le1* en 8 laboratorios de la Red, y en 2 laboratorios de nuevo ingreso métodos simplex para la determinación del *p35S/gen* de referencia *Le1*. El uso de MRC permitió definir los parámetros de medición: veracidad, repetibilidad, reproducibilidad, y cada laboratorio cuenta con información suficiente para determinar sus límites de detección, límite de cuantificación e incertidumbre de medición, con lo cual se avanza en la consolidación de la RNLD-OGM, demostrando que los laboratorios que la conforman cuentan con capacidad y calidad de medición. Dentro de las experiencias del estudio colaborativo, se identificaron fuentes de error comunes durante el proceso de análisis, mismas que fueron corregidas y que se incluirán como puntos de atención dentro del protocolo a seguir, a fin de evitar su recurrencia. Es importante destacar que a nivel comercial no está disponible un material certificado para el terminador Nos, por lo que su desarrollo constituye una fortaleza nacional en el área.

Finalmente estas acciones posicionan a México como referencia en América Latina para el análisis de Organismos Genéticamente Modificados.

#### AGRADECIMIENTOS

Al fondo CIBIOGEM por el apoyo a la Red con el suministro de reactivos para la caracterización de materiales y para realizar las mediciones por los laboratorios.

#### REFERENCIAS

[1] Waiblinger, H. U.; Grohmann, L.; Mankertz, J.; Engelbert, D.; Pietsch, K. Anal. Bioanal. Chem. 2010, 396, 2065–2072