

CASO DE ÉXITO EN MATERIALES DE REFERENCIA PARA OGM RETROSPECTIVA DE 10 AÑOS

Miriam Estrada S^{1,*}, Fabiola López R¹, María Guadalupe Barrera A¹, Mayren Cristina Zamora N¹.

¹ Centro Nacional de Referencia de Inocuidad y Bioseguridad Agroalimentaria. Carretera federal México-Pachuca, km 37.5, Municipio de Tecámac, Edo. de México.

*e-mail: estradaseguram@gmail.com

Resumen

En la década de los 1980s, los avances de la tecnología y el conocimiento científico hizo posible la modificación de pequeños fragmentos de ADN de un organismo en otro. En 1983, fue desarrollada la primera planta de tabaco resistente a antibióticos¹. Para 1995, se comercializó el primer transgénico resistente a herbicidas. Las modificaciones que se han realizado son: resistencias a nematodos, bacterias, hongos, virus, insectos y herbicidas. Siendo los últimos de mayor desarrollo principalmente para bromoxyl (canola, y algodón), glufosinato (canola, algodón, maíz, arroz, soya y betabel), glifosato (canola, algodón, maíz, soya y betabel) y sulfonilureas (linaza)². Existen legislaciones que regulan la liberación de alimentos y productos contienen OGM (organismos genéticamente modificados) o se producen a partir de ellos. Durante el proceso de autorización de un evento genéticamente modificado, el solicitante debe asegurarse que haya disponibilidad del material de referencia y que ha sido validado el método de cuantificación para el evento específico cumpliendo con criterios mínimos establecidos³.

Keywords: OGM, material de referencia certificado.

Introduction

Los materiales de referencia y los métodos validados están disponibles públicamente para los laboratorios de análisis de (OGM). Para ello, la disponibilidad de materiales de referencia certificados (MRC), calibradores y/o materiales de control es una de las principales necesidades para realizar la validación de métodos de medición, para el control de calidad, establecimiento de la trazabilidad del resultado de medición y en su caso determinar la competencia de medición de un laboratorio. El seguimiento de desarrollo y certificación de MRC es un proceso laborioso y costoso debido a que dicho material debe cubrir las necesidades metroológicas de los laboratorios de referencia.

En el año 2011, no existían casas comerciales que realizaran el proceso metroológico de todos los materiales requeridos para las necesidades específicas de la detección de eventos de maíz genéticamente modificado nacionales. Mediante el proyecto 2011-09-172352 "Desarrollo de materiales de referencia certificados, validación de métodos y fortalecimiento de la infraestructura soporte de las redes de laboratorios para la Inocuidad y Calidad Alimentaria financiado por el Fondo sectorial SAGARPA-CONACYT se logró generar y certificar nueve materiales de referencia para OGM tres en trigo, tres en maíz y tres en soya.

México es el primer país en Latinoamérica que ha creado y fortalecido su capacidad para la generación de materiales de referencia certificados para OGM en los últimos años. Esto le ha permitido al Centro Nacional de Referencia de Inocuidad y Bioseguridad Agroalimentaria llevar a cabo la emisión de resultados confiables para el análisis de modificaciones genéticas en productos de interés agroalimentario, mediante el análisis de organismos genéticamente modificados (OGM) basado en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en punto final y tiempo real que son dependientes del Material de Referencia Certificado (MRC), para llevar a cabo la cuantificación del OGM. La demanda de análisis ha incrementado notablemente, situación que genera la necesidad de acceder a nuevas metodologías que permitan emitir resultados confiables, certeros y oportunos.

Materials and Methods

En el Centro Nacional de Referencia de Inocuidad y Bioseguridad Agroalimentaria, se oferta el servicio de detección de los promotores 35SCaMV y FMV(PFMV) y del terminador NOS (tNOS) en matrices de maíz, soya, algodón., trigo, miel, betabel, alfalfa, alimentos procesados a base de maíz y canola. Todo esto mediante la técnica de PCR en tiempo real, así mismo también se realiza la identificación y cuantificación de los eventos que se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Eventos a identificar y cuantificar

Especie	Evento	Especie	Evento
MAÍZ	hmg	ALGODÓN	ACP
	MON 89034		MON 88913
	NK 603		MON 15985
	DAS 015071		MON 1445
	GA 21-P		MON 531
	BT 11-P		BCSGH002
	MON 810-P		DAS 242365
	MON 88017-P		DAS 210235
	MON 863-P		ACSGH0013
	DAS 59122-P		BCSGH005
	MYR 604-P		LEC
	SYNIR 162-P		MON 89788-P
	SYNEV 176-P		MON 4032-P
	DAS 40278-P		DP 305423-P
DP 98140-P	MON 87708		

Extracción de ADN

Para la obtención de ADN de calidad se ha realizado la extracción utilizando el método CTAB, plan MINI kit o Mericon Food Kit. se realiza la extracción de acuerdo con el instructivo del fabricante. Una vez obtenido el ADN se cuantifica y estandariza a 50 µg/ µL utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 Thermo Scientific™.

Cuantificación de secuencias OGM

Realizar cuatro diluciones, siendo el primer punto la concentración inicial del MRC y el punto más bajo deberá ser 0.1%. Las concentraciones de los puntos de las curvas dependera de la concentración del % de OGM que se indique en el certificado del material de referencia. En la Tabla 2 se indican las posibles concentraciones de los puntos de las curvas más frecuentes.

PCR tiempo real

Para la detección, identificación y cuantificación se utilizan equipos de PCR tiempo real, el método consta de tres fases. La pre-incubación a 50°C, 120 segundos; desnaturalización a 95 °C, 600 segundo y por último alineamiento y extensión a 95°C, 15 segundos.

Tabla 2. Concentración de diluciones,

% OGM	Concentración de Diluciones			
100	100	10	1	0.1
9.86	9.86	2.143	0.466	0.101
4.91	4.91	1.364	0.379	0.105

Resultados

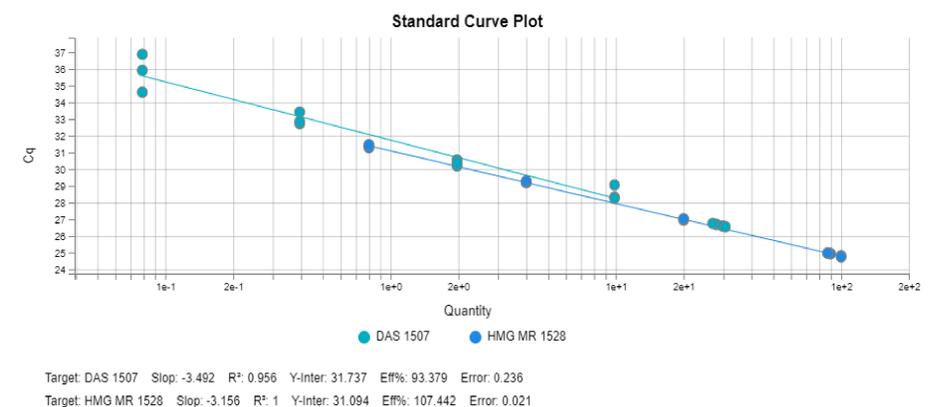
Una vez que se obtienen los ciclos de amplificación del gen endógeno y el ciclo de amplificación del evento a cuantificar. Se procede a realizar los cálculos para obtener el % OGM con la siguiente formula:

$$\%OGM = \frac{\text{Cantidad promedio de secuencia GM}}{\text{Cantidad promedio de la secuencia endógena}} * 100$$

Actualmente, el Centro Nacional de Referencia de Inocuidad y Bioseguridad Agroalimentaria cuantifica 14 eventos de OGM para maíz, 9 para algodón y 5 para soya, en total 28 eventos de los cuales solamente 10 MRC están al 100%, 16 tienen una concentración entre 9.85-10 % y 2 tienen un porcentaje de 4.91.

Por ejemplo, el evento DAS 1507 tiene una concentración de 9.86 % , al realizar las diluciones correspondientes se obtienen los resultados de la regresión lineal, con lo cual se cumplen los criterios de calidad establecidos. Los cuales son: pendiente de -3.1 a - 3.6, coeficiente de correlación: ≥ 0.98 y eficiencia de amplificación entre 90 a 110% como se muestra Figura 1.

Figura 1. Curva para cuantificación el evento DAS 1507



Las problemáticas que se tienen al cuantificar con MRC de baja concentración es cuando una muestra llega a tener una concentración mayor al porcentaje indicado en el certificado . Ya que si se realiza la cuantificación se estaría sobrestimando. Al tener concentraciones bajas, los ciclos de amplificación se observan más retardados comparados con los ciclos de amplificación del gen endógeno. Los cuales tienen un valor promedio de 23-24 gen endógeno y 27-29 para el evento a cuantificar. Las validaciones que se realizan para cada evento se basan en el punto máximo de la curva de cuantificación que corresponde a la concentración indicada en el certificado. Por lo cual, no se puede emitir un informe de resultados con la concentración puntual, lo que limita indicar > a 9.86% en el caso para DAS 1507. SAGARPA-CONACYT al lograr certificar materiales de referencia permitió tener mas materiales de referencia al 100%, aun hace falta certificar mas materiales de referencia con mayor porcentaje.

Conclusiones

A pesar de que han tenido grandes avances en el desarrollo de materiales de referencia certificados, se tiene la deficiencia que no se tienen al 100 por ciento. Al estar constantemente en desarrollo de Nuevo eventos, es necesario contar con materiales de referencia de mayor porcentaje, para dar resultados certeros.

References

- [1] Yang YT, Chen B. Governing GMOs in the USA: science, law and public health. J Sci Food Agric. 2016 Apr;96(6):1851-5. doi: 10.1002/jsfa.7523. Epub 2015 Dec 16. PMID: 26536836.
- [2] Duke SO. Taking stock of herbicide-resistant crops ten years after introduction. Pest Manag Sci. 2005 Mar;61(3):211-8. doi: 10.1002/ps.1024. PMID: 15660452.
- [3] ENGL (2008) Definition of minimum performance requirements (MPR) for analytical methods of GMO testing, <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/images/pdfdoc.gif>