

comisión del codex alimentarius



ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES
UNIDAS PARA LA AGRICULTURA
Y LA ALIMENTACIÓN

ORGANIZACIÓN
MUNDIAL
DE LA SALUD



OFICINA CONJUNTA: Viale delle Terme di Caracalla 00153 ROMA Tel: 39 06 57051 www.codexalimentarius.net Email: codex@fao.org Facsimile: 39 06 5705 4593

Tema 7 del programa

CX/MAS 09/30/8

PROGRAMA CONJUNTO FAO/OMS SOBRE NORMAS ALIMENTARIAS

COMITÉ DEL CODEX SOBRE MÉTODOS DE ANÁLISIS Y TOMA DE MUESTRAS

30.ª reunión

Balatonalmádi (Hungria), 9 - 13 de marzo de 2009

ANTEPROYECTO DE DIRECTRICES SOBRE CRITERIOS RELATIVOS A LOS MÉTODOS DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ALIMENTOS OBTENIDOS POR MEDIOS BIOTECNOLÓGICOS

(En el Trámite 3 del Procedimiento)

La 29.ª reunión del Comité del Codex sobre Métodos de Análisis y Toma de Muestras acordó proponer nuevas tareas relacionadas con la elaboración de criterios relativos a los métodos de detección e identificación de alimentos obtenidos por medios biotecnológicos. Se acordó que, con sujeción a la decisión de la Comisión, el Anteproyecto de Directrices que se presenta en el documento de trabajo CX/MAS 08/29/8 se distribuiría en el Trámite 3 para recabar observaciones (ALINORM 08/31/23, párrs. 87-93).

La Comisión, en su 31.º período de sesiones, tras haber debatido la cuestión, aprobó las nuevas tareas relacionadas con las Directrices sobre criterios relativos a los métodos de detección e identificación de alimentos obtenidos por medios biotecnológicos (ALINORM 08/31/REP, párrs. 94-97 y Apéndice X).

A través del presente documento se distribuye el Anteproyecto de Directrices en el Trámite 3 para recabar observaciones y para su examen por parte de la 30.ª reunión del Comité del Codex sobre Métodos de Análisis y Toma de Muestras. Los gobiernos y las organizaciones internacionales que deseen formular observaciones deben transmitirlos por escrito, preferiblemente por correo electrónico, a la Secretaría de la Comisión del Codex Alimentarius, Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias, FAO, Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Roma (Italia), número de fax: +39 (06) 5705 4593, correo electrónico: codex@fao.org, con copia al Punto de contacto del Codex en Hungría, Oficina de inocuidad de los alimentos de Hungría, H-1097 Gyáli út 2-6, Budapest (Hungría), número de fax: +36 13879400, correo electrónico: HU_CodexCP@mebih.gov.hu, **antes del 1.º de febrero de 2009.**

APÉNDICE I: DIRECTRICES PARA LA VALIDACIÓN Y REQUISITOS DEL CONTROL DE CALIDAD DEL ANÁLISIS DE ALIMENTOS OBTENIDOS POR MEDIOS BIOTECNOLÓGICOS

INTRODUCCIÓN

CrITERIOS del método

La Comisión del Codex Alimentarios hace especial hincapié en la aceptación de métodos de análisis que hayan sido “completamente validados” mediante un ensayo en colaboración que sea conforme a protocolos aceptados internacionalmente. En algunos sectores, incluido el de los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos, existen pocos métodos de análisis que hayan sido validados completamente. Por lo tanto, el Codex también ratifica mediante protocolos de validación de un laboratorio único de referencia. En esta área, podría haber presión a favor de la adopción de la validación formal por parte de un laboratorio único como medida provisional en caso de no que no existieran datos de ensayos en colaboración. Sin embargo, los métodos empleados para la detección de alimentos obtenidos por medios biotecnológicos pueden ser aplicados por diversos laboratorios, que es lo que se pretende, y, por lo tanto, deben ser validados por estudios de varios laboratorios en colaboración tan pronto como sea posible.

Actualmente se están desarrollando muchos métodos de detección, identificación y cuantificación de alimentos obtenidos por medios biotecnológicos. Antes de que se acepte su uso por parte del Codex, deben ser validados para garantizar su adecuación para este fin.

No obstante, los dos enfoques más comunes (Anklam *et al.*, 2002) son los métodos basados en ADN dirigidos a detectar una secuencia específica de ADN (diana) (Lipp *et al.* 2005; Holst-Jensen *et al.*, 2004, Miraglia *et al.*, 2004) y los que se basan en la detección de las propias proteínas o sus actividades (Grothaus *et al.*, 2007). En lo que respecta al análisis basado en el ADN, el enfoque de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es el que se aplica de manera más general actualmente, a pesar de que se podrían emplear otros métodos basados en ADN con o sin fase de PCR para realizar la medición en caso de que se validaran adecuadamente. En el presente documento se examinan los enfoques basados en ADN y los basados en proteína.

Los criterios convencionales adoptados por el Codex para la evaluación de los métodos de análisis son:

- la conformidad
- la aplicabilidad (matriz, intervalo de concentración y preferencia dada a los métodos “generales”)
- el límite de detección
- el límite de cuantificación
- la precisión; la repetibilidad en el mismo laboratorio, la reproducibilidad entre laboratorios (en el mismo y en otros laboratorios)
- la selectividad
- la sensibilidad
- la linealidad

Las directrices abordan estos requisitos del sector de los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos y anticipan que es probable que tengan que ampliarse (por ejemplo, para la PCR) con otros elementos, como:

para los métodos basados en ADN

- la longitud del amplicón
- si el método es específico al instrumento
- si existen diferencias entre los métodos de detección basados en la PCR cualitativos y cuantitativos
- si se realizan amplificaciones simples o de tipo múltiplex de la PCR

para los métodos basados en proteína

- equivalencia de los reactivos a lo largo del tiempo

El proceso de validación del método aceptado por el Codex comprende la definición de los requisitos del método, la comprobación de que el método cumple dichos requisitos cuando es aplicado, por ejemplo, por

varios laboratorios de países diferentes y la documentación sobre el rendimiento del método y la incertidumbre de la medición.

Enfoque por criterios

La Comisión del Codex Alimentarius ha aceptado el “enfoque por criterios” para los métodos de análisis. Este enfoque no abarca los procedimientos empíricos/de definición del Codex Tipo I. Es necesario garantizar la incorporación de este enfoque a las directrices del Codex sobre los métodos de análisis para la validación de alimentos obtenidos por medios biotecnológicos.

Calidad del laboratorio

La Comisión del Codex Alimentarius ha adoptado directrices para la “calidad” de los laboratorios que participan en la importación y la exportación de alimentos. Estas características de calidad se basan en el cumplimiento de la norma ISO/IEC 17025, la comprobación de la competencia y el control interno de la calidad, así como en el uso de métodos de análisis validados según los requisitos del Codex. Estas directrices generales proporcionan información y dictan los requisitos que deben cumplir los laboratorios que trabajan en el sector de los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos.

Incertidumbre de la medición

El Codex ha elaborado directrices sobre la incertidumbre de la medición. Las directrices exigen que los laboratorios estimen la incertidumbre de sus mediciones cuantitativas. Este hecho es muy importante y tiene consecuencias para las mediciones efectuadas en el sector de los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos, en el que los controles analíticos podrían ser menos eficientes que los análisis de otras áreas del sector alimentario. A menudo no se presta atención al hecho de que el grado de incertidumbre de la medición es mucho mayor en este sector analítico de lo que cabría esperar.

En el caso de los métodos basados en ADN, la incertidumbre también podría deberse a factores biológicos. Por ejemplo, una muestra podría contener material de granos hemicigóticos (por ejemplo, *Zea mays*) en el que la fuerza de la señal dependa de si la secuencia diana fue introducida por el progenitor macho o hembra. Además, las diferentes secuencias diana (especialmente en el caso de los métodos de confirmación) podrían estar contenidas en algunas o todas las muestras de grano. Dado que el grado es desconocido, el efecto no se puede determinar de manera precisa, si bien se debe incluir en la incertidumbre de las mediciones. En el caso de los métodos basados en proteína, es posible que varíen los niveles de expresión de la proteína y/o la eficiencia de extracción de las proteínas. No obstante, tanto los métodos basados en ADN como los basados en proteína se pueden utilizar en submuestras o en semillas individuales, dado que el posible impacto de tal variación biológica se ve muy reducido.

INFORMACIÓN QUE SE DEBE PROPORCIONAR AL CODEX CUANDO EL CCMAS SE PROPONE EXAMINAR LA ADOPCIÓN DE UN MÉTODO PARA LOS ALIMENTOS OBTENIDOS POR MEDIOS BIOTECNOLÓGICOS

En el Anexo I figura la información que se debe proporcionar al CCMAS cuando éste se propone considerar la ratificación de un método. En el anexo se enumeran las consideraciones generales y los requisitos específicos.

A medida que la metodología para identificar y cuantificar los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos se desarrolle, los requisitos específicos se convertirán en criterios de rendimiento para que sean conformes al “enfoque por criterios” adoptado por el Codex.

DEFINICIONES

Existen varias definiciones del Codex aplicables al análisis de los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos. En el Anexo II se presentan las definiciones propuestas.

DESARROLLO DEL MÉTODO HACIA LA VALIDACIÓN FORMAL

Aplicabilidad del método

Éste es un criterio muy importante en el análisis de los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos. En principio, el método debería ser aplicable a la matriz pertinente en el sistema del Codex. Cuando se trata de un alimento obtenido por medios biotecnológicos en particular, es adecuado exigir a aquéllos que tratan de que sea ratificado que proporcionen información acerca del método de análisis apropiado para el producto en concreto e, idealmente, acerca de la matriz en la que es probable que vaya a ser empleado. En el caso de

métodos de “uso general” para identificar y cuantificar alimentos obtenidos por medios biotecnológicos, debería haber disponible al menos un método de extracción aplicable a una matriz general.

Como ejemplo, se exige de un método de extracción, independientemente de la matriz a la que vaya a ser aplicado, que contenga ADN de suficiente integridad estructural y pureza en suficiente cantidad para permitir que se realice una evaluación apropiada del rendimiento de las fases posteriores del método que se vayan a realizar (por ejemplo, la amplificación adecuada del ADN durante la fase de PCR). Este hecho se puede comprobar, por ejemplo, estableciendo una serie de diluciones del ADN molde y **determinando el valor Ct (el umbral de número de ciclos tras los que la señal de fluorescencia que se mide cruza un valor umbral entre diluciones establecido por el usuario) de cada dilución**. En el análisis **en tiempo real** de la PCR, los **valores Ct** se pueden usar para estimar la eficiencia de la PCR. El análisis de las diferencias entre las diluciones del ADN molde **corresponde al factor de dilución; por ejemplo, si el ADN se diluye 10 veces, la diferencia teórica de los valores Ct debería ser aproximadamente 3,32**, y si el ADN se diluye cuatro veces, la diferencia debería ser 2. Estos números son teóricos y podrían no lograrse en situaciones reales. Las desviaciones **significativas** con respecto a esta relación podrían indicar que el ADN extraído contiene inhibidores de la PCR, que la solución de ADN no es homogénea o que la cantidad de ADN es tan baja que la variación estocástica de **la cantidad de ADN en las reacciones** da como resultado estimaciones cuantitativas imprecisas.

La cantidad y la naturaleza del ADN y la proteína diana, presentes en los alimentos y los ingredientes de los alimentos, que se pueden medir podrían verse afectadas en las diversas fases de elaboración. Los cambios que sufre una proteína durante la elaboración podrían provocar la desnaturalización y, si bien los ensayos basados en proteína se pueden aplicar a alimentos o piensos elaborados, se deben tomar precauciones para asegurar que el ensayo esté validado y sea apropiado para el fin específico. Habitualmente, los ensayos basados en proteína se han venido aplicando a productos muy poco elaborados (harina de maíz y soja, copos de soja desgrasados, leche de soja, tofu, etc.), aunque se han desarrollado aplicaciones para productos muy elaborados, como la harina tostada de soja y las proteínas aisladas.

La elaboración podría tener una influencia similar en la detectabilidad del ADN diana.

Proceso de validación

La validación del método es un proceso de determinación de las características y las limitaciones del rendimiento de un método analítico y de identificación de las influencias que podrían alterar las características y en qué medida podrían hacerlo. Los resultados de un proceso de validación definen qué analitos pueden determinarse en qué tipo de matrices en presencia de qué interferencia. El ejercicio de validación da como resultado valores precisos y conformes de un método analítico en particular en las condiciones examinadas.

La validación formal de un método representa la conclusión de un proceso largo que comprende los siguientes pasos principales:

- **Validación previa del método.** Se puede recomendar la validación previa, pero debería realizarse caso por caso, en función de las necesidades. La validación previa debe garantizar que un método tiene un rendimiento que permite que se llegue a una conclusión exitosa del estudio de validación, es decir, la validación previa debe proporcionar pruebas del cumplimiento del rendimiento o los reglamentos exigidos. La validación previa debe realizarse de preferencia con la participación de 2-4 laboratorios. Deben realizarse análisis estadísticos (por ejemplo, de la “repetibilidad” y la “reproducibilidad”) en función del procedimiento de validación que vaya a utilizarse posteriormente.
- **Validación completa del método.** La validación completa requiere muchos recursos y únicamente debe realizarse para los métodos que hayan sido comprobados adecuadamente con anterioridad.

La validación completa mediante un ensayo en colaboración es una tarea cara y, normalmente, sólo se realiza una vez que el método ha demostrado tener un rendimiento aceptable en un único laboratorio y en un estudio de validación previa.

Enfoque modular de la validación del método

El término “método” hace referencia a todos los procedimientos experimentales necesarios para estimar el mesurando en una matriz en particular. Para un material en concreto, podría comprender los métodos de extracción del ADN y la cuantificación final en un sistema de PCR. En tal caso, toda la cadena, desde la extracción hasta el método de PCR (u otro equivalente) constituye un método, aunque las diferentes partes del método se pueden examinar por separado (por ejemplo, la validación modular). Sin embargo, es posible utilizar el mismo método de preparación de la muestra (por ejemplo, moler) en combinación con el mismo aislado de ADN para diversos análisis de PCR posteriores (Holst-Jensen *et al.*, 2004). En tal caso, cada método debe ser validado independientemente, aunque el sistema entero puede combinarse en un enfoque modular, lo que ofrece ventajas económicas.

Aún no se ha demostrado que el enfoque de la validación modular se pueda aplicar a los métodos basados en proteína.

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN DEL MÉTODO [Condiciones necesarias para la validación completa]

Para evaluar un método antes de la validación completa, es necesario disponer de información sobre el método y sobre su comprobación. En el Anexo I figura información a este respecto.

El método será evaluado con arreglo a la información que haya sido proporcionada al Codex. La evaluación debe verificar el cumplimiento de los prerrequisitos de principio para utilizar el método para fines del Codex. En esta sección se describen los criterios de aceptación del método que éste debe cumplir para que se pueda llevar a cabo una validación previa y un ensayo completo en colaboración.

Condiciones de principio

La provisión del método de detección tiene por objeto facilitar principalmente los requisitos de la medición de productos obtenidos por medios biotecnológicos. Para que sea útil para estos fines, el método puede detectar y cuantificar la secuencia diana de ADN específica al taxón o la proteína derivada de éste en el producto; en la mayoría de casos, se puede lograr empleando métodos basados en proteína o en ADN.

En la realización del ensayo, se deben utilizar materiales de referencia relacionados con el acto de transformación.

Actualmente, el método de detección basado en ADN consiste típicamente en la metodología de la PCR e incluye:

- un protocolo que describe un método de extracción que es aplicable a una matriz pertinente;
- una descripción de las secuencias cebadoras del oligonucleótido que identifican de manera inequívoca la secuencia de ADN diana;
- una descripción de las secuencias de sonda del oligonucleótido fluorescente que identifican de manera inequívoca la secuencia de ADN diana, cuando proceda;
- una descripción de las secuencias cebadoras del oligonucleótido que amplifican una secuencia endógena de genes aplicable a las especies hospedadoras en particular;
- un protocolo que describe las condiciones, incluido el aparato empleado, en las que se puede utilizar la PCR para detectar la secuencia de ADN diana;
- muestras de control apropiadas, de estar disponibles. No obstante, la detección de ADN o proteínas derivados de alimentos desconocidos obtenidos por medios biotecnológicos no permite el uso de muestras de control, ya que éstas normalmente no están disponibles, si bien se podría desarrollar el plásmido y utilizarlo como muestra si está disponible la información sobre la secuencia de ADN buscada;
- descripciones de las operaciones realizadas para calcular el resultado.

Los métodos basados en proteína normalmente consisten en un método cuantitativo o cualitativo. En este último caso, se trata habitualmente de un sistema ELISA, que consiste en lo siguiente:

- una microplaca recubierta por un anticuerpo;

- un anticuerpo secundario conjugado con una enzima;
- estándares;
- controles;
- un sustrato enzimático para el desarrollo del color;
- solución tamponada limpiadora y para la extracción de muestras.

La cuantificación se realiza comparando la cantidad de proteína encontrada en la extracción o las extracciones con la cantidad de proteína expresada en la parte pertinente de la planta (por ejemplo, semilla o grano).

El método cualitativo puede consistir en un ELISA o un dispositivo de flujo lateral que comprende lo siguiente:

- una almohadilla de muestra;
- una almohadilla conjugada;
- una membrana de nitrocelulosa;
- una almohadilla de absorción con un soporte fino de plástico.

El proveedor del método debe demostrar que el método cumple los siguientes requisitos:

- (2) Los métodos basados en ADN específicos al acto de transformación deberían permitir la detección, identificación y cuantificación inequívocas de una transformación.

Actualmente, la mejor opción en lo que respecta a la especificidad de un método en relación con la transformación, en caso de que la técnica elegida sea la PCR, consiste en centrarse en una región genómica específica a las transformaciones utilizando un conjunto de oligonucleótidos (cebadores) que provocan la amplificación de dicha región. Entre los varios tipos de regiones genómicas específicas a la transformación, la relacionada con la confluencia de la inserción recombinante y el ADN genómico hospedador será probablemente la ubicación escogida. Sin embargo, cuando se pueda localizar una secuencia de ADN única en la inserción recombinante, dicha secuencia (denominada normalmente construcción específica) también podrá ser abordada por los cebadores oligonucleótidos adecuados y amplificada mediante una PCR. Se recomienda identificar el fragmento amplificado, por ejemplo mediante hibridación con sonda o cualquier otro método equivalente.

- (3) Los ensayos cualitativos realizados de tal manera que el número de submuestras positivas y negativas (reservas) obtenidas de una muestra puede permitir estimar el contenido en grano obtenido por medios biotecnológicos del material (Remund *et al.*, 2001).
- (4) Todos los métodos deben ser aplicables a los materiales indicados en su ámbito, así como a materiales de control de calidad y referencia adecuados, cuando estén disponibles.

Cabe señalar que, actualmente, sólo se puede realizar la cuantificación relativa, lo que implica que se mide el material de ADN recombinante relativo al ingrediente o la especie correspondientes.

REQUISITOS DEL ENSAYO EN COLABORACIÓN

Información general

La finalidad del ensayo en colaboración es validar completamente los datos resultantes de los ensayos previos mediante un ejercicio de validación previa o de laboratorio único y determinar la precisión metodológica en lo que respecta a la repetibilidad y la reproducibilidad.

Se deben interpretar y comparar cuidadosamente los valores de los parámetros de rendimiento que resulten de los estudios de validación. Los valores exactos y su interpretación pueden depender, además del rendimiento del método, de su alcance (por ejemplo, solamente una PCR cuantitativa en tiempo real frente a un método que abarque desde la extracción hasta la cuantificación en tiempo real de la PCR), el diseño experimental aplicado, por ejemplo la calibración frente a los métodos $\Delta\Delta Ct$, los formularios de cálculo exacto utilizados para determinar los parámetros y el enfoque utilizado para detectar y analizar los valores atípicos. Es necesario que se traten de manera adecuada y normalizada los factores indicados para que los “requisitos mínimos de rendimiento” sean respetados.

Para los fines del Codex, se ha adoptado la norma ISO 5725:1996 o el Protocolo armonizado AOAC/IUPAC¹. Si ya se ha realizado un ensayo en colaboración con arreglo a un protocolo aceptado internacionalmente, la información se puede utilizar para evaluar la aceptabilidad del método para los fines del Codex.

Requisitos mínimos de rendimiento

En un ensayo en colaboración, el rendimiento del método debe ser conforme a las partes pertinentes de los criterios de aceptación del método y cumplir los requisitos de rendimiento del método que se indican a continuación para el ensayo en colaboración. Por lo tanto, el ensayo en colaboración debe confirmar los resultados obtenidos durante las fases previas de evaluación del método y debe proporcionar información adicional acerca del rendimiento del método en diversos laboratorios. En particular, se debe evaluar el cumplimiento de los criterios de sensibilidad, repetibilidad y reproducibilidad, las desviaciones estándar y la conformidad.

Además de los criterios de aceptación del método, se deben evaluar al menos los requisitos de rendimiento del método enumerados en el Anexo I a partir de los datos experimentales del ensayo en colaboración. En primer lugar, se describe la definición y, posteriormente, los requisitos.

Los métodos aprobados y sus datos asociados de validación se deben revisar con regularidad a medida que evolucionan los conocimientos científicos y se obtiene más experiencia en materia de validación en un único laboratorio y ensayos en colaboración. Las directrices se deberán complementar con información práctica sobre las fases del proceso de validación.

Materiales del ensayo en colaboración

En principio, el método debería ser aplicable a la matriz pertinente (es decir, la matriz sobre la que se hayan desarrollado especificaciones) y debería ser comprobado en ella.

Tanto el ADN genómico como el plásmido se usan como calibradores (para un método basado en PCR). Sin embargo, los materiales y las matrices típicas de un tipo o grupo de materiales o matrices se pueden utilizar si los efectos de los materiales o las matrices en la calidad de ADN en la fase de extracción son importantes para el análisis.

VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS

En los Anexos III y IV figura información específica sobre la validación de los métodos de PCR cuantitativos y cualitativos, respectivamente.

En el Anexo V se presenta información específica sobre la validación de métodos basados en proteína cuantitativos y cualitativos.

UNIDADES DE MEDIDA

“Las mediciones se pueden expresar explícitamente como pesos o granos por porcentaje relativo. No obstante, ninguno de los métodos de detección actuales (basados en ADN o en proteína) es capaz de medirlo directamente a menos que se realice con un enfoque de múltiples submuestras en el grano. En el caso de que se emplee un método basado en ADN para cuantificar los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos, los equivalentes del genoma se pueden medir de manera típica. Los métodos basados en proteína miden la cantidad de una proteína en particular presente y la relacionan con la cantidad deseada. A pesar de que pudiera haber correlaciones entre los granos/peso-% y la cantidad de ADN o proteína, respectivamente, el carácter de estas relaciones está influenciado por el número de factores biológicos ([inserción borrada] Horst-Jensen *et al.*, 2004; Grothaus *et al.*, 2007). Por ejemplo, la cantidad de material recombinante se podría sobreestimar o subestimar (en relación con las semillas) o se podría sobreestimar típicamente en el caso de apilamiento de genes, por un enfoque basado en ADN o en proteína.”

La cuestión debe ser abordada y se deben convenir unidades de medidas, rendimiento y criterios de presentación de datos adecuados para estos métodos antes de emplearlos. La interpretación de los resultados sigue exigiendo mucha orientación técnica y minuciosidad.

INCERTIDUMBRE DE LA MEDICIÓN

La preparación de la muestra y los métodos analíticos constituyen dos fuentes importantes de error que deben ser examinadas al evaluar una medición analítica.

Los analistas que utilizan métodos que han sido validados con arreglo a estas directrices dispondrán de suficiente información para poder estimar la incertidumbre de su resultado.

La cuantificación basada en la proteína expresada también puede contribuir en gran medida a la incertidumbre del análisis.

Se han realizado y publicado muchos trabajos acerca de la validación de diversos métodos específicos de análisis (véase <http://biotech.jrc.it/bioinformatics/methodsdatabase.htm>).

El Codex ha elaborado y adoptado (o está en el proceso de hacerlo) orientaciones sobre la estimación y el uso de las estimaciones de la incertidumbre de las mediciones (Directrices sobre incertidumbre de la medición del Codex y proyecto de documento de directrices sobre “el uso de resultados de análisis”).

ORIENTACIONES SOBRE EL ESTABLECIMIENTO Y EL FUNCIONAMIENTO DEL LABORATORIO

Los métodos basados en ADN que se emplean para analizar los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos aplican técnicas que no se consideran métodos disponibles habitualmente, ya que actualmente precisan de aparatos y técnicas de manipulación específicos y diferentes de los de la mayor parte de los métodos de análisis químico. Sin embargo, el uso de métodos basados en ADN aumenta consistentemente en otras áreas de detección, como la microbiología de los patógenos de los alimentos. Al no disponerse actualmente de información de otros dominios de detección, es necesario ofrecer información e instrucciones acerca de las diferencias esenciales en las técnicas de establecimiento y funcionamiento del laboratorio. A este fin, se proporcionan ejemplos⁴.

Los métodos de análisis inmunológico (basados en proteína) se comprenden bien, se usan en muchos laboratorios para diferentes análisis y a menudo tienen forma de *kit*, lo que facilita su utilización.

MATERIALES DE REFERENCIA

Se pueden utilizar diferentes matrices para elaborar materiales de referencia o normas de funcionamiento para los métodos de detección de alimentos obtenidos por medios biotecnológicos. Cada una de ellas tiene sus propias ventajas e inconvenientes para cada fin.

El Codex podría estudiar la posibilidad de exigir que haya disponibles materiales de referencia adecuados como requisito del procedimiento de ratificación del método. Sin embargo, se reconoce que existen problemas concretos relacionados con la elaboración de materiales de referencia, por ejemplo, para los materiales de maíz, en el caso de que se considere el proceso de transformación del maíz o los métodos específicos a la construcción.

Normalmente, se exige un material de referencia adecuado para validar un método. Se están poniendo a disposición materiales de referencia adecuados para muchas transformaciones que se comercializan. Cuando no están disponibles, se podría recurrir, si están disponibles, a materiales de control de calidad de esquemas de comprobación de la competencia o al uso de ADN plásmido o amplicón.

Se recomienda que se trabaje con material 100 % homocigótico o, cuando sea posible, con material de referencia, de ser posible certificado con un nivel conocido de cigosidad. Sin embargo, otros materiales podrían ser adecuados, en función de cada caso.

Como materiales de referencia para los métodos de detección de proteína se pueden utilizar la propia proteína purificada de microbios recombinantes, como *E. coli*, la matriz molida de una planta (normalmente, hoja o grano) o una fracción de alimento elaborado. La forma física del material de referencia determina su adaptabilidad para ser usada en cualquier método. Para los materiales molidos, las diferencias en la distribución del tamaño de las partículas entre los materiales de referencia y las muestras habituales pueden afectar la eficiencia de extracción de la proteína diana y la reproducibilidad, debido al error del muestreo.

TOMA DE MUESTRAS

Normalmente, las tecnologías basadas en ADN y en proteína se aplican a una submuestra de una muestra de mayor tamaño, ya que el lote puede ser de gran tamaño (toneladas) y en el ensayo sólo se pueden utilizar pequeñas muestras (gramos). Elaborar planes adecuados para la toma de muestras puede ayudar a reducir el

número de errores atribuibles al muestreo y a garantizar que la muestra represente de manera precisa el lote. En el área del análisis de alimentos obtenidos por medios biotecnológicos se puede esperar que un error en el muestreo contribuya de manera significativa —o drástica— a la incertidumbre general del resultado de un análisis, especialmente cuando se examinan materias primas. Por regla general, las tecnologías analíticas se aplican a una submuestra de una muestra de mayor tamaño, ya que el lote puede ser de gran tamaño (toneladas) y el método de la prueba es destructivo y sólo puede aplicarse a pequeñas muestras (de gramos a kg). Elaborar planes adecuados para la toma de muestras puede ayudar a reducir el número de errores atribuibles al muestreo y a garantizar que la muestra represente de manera precisa el lote. Al igual que ocurre con cualquier análisis, cabe esperar que un error en la toma de muestras contribuya de manera significativa a la incertidumbre general del resultado de un análisis. Sin embargo, esto también ocurre en otras áreas analíticas, como la estimación del número de granos quemados u otros materiales de una muestra a granel. Entre las normas aceptadas para la toma de muestras cabe señalar ISO 6644, ISO 542 e ISO 13690, y Codex CAC/GL 50-2004.

Diversas organizaciones internacionales abordan actualmente la cuestión de la combinación de la toma de muestras y las incertidumbres analíticas, particularmente EURACHEM, que ha creado un nuevo grupo de trabajo que se ocupa de la incertidumbre en la toma de muestras, e ISO, que está organizando un foro que versará sobre la toma de muestras. El CCMAS ha trabajado mucho en el área de la toma de muestras en general y la toma de muestras de alimentos a granel obtenidos por medios biotecnológicos, abordada por el Centro Común de Investigación (JRC) de la Unión Europea (por ejemplo, Paoletti *et al.*, 2006), CEN, GIPSA (Freese *et al.*), ISTA e ISO (TC/34 Grupo de trabajo 7), que recomienda que se empleen los métodos de toma de muestras existentes para los productos obtenidos por medios biotecnológicos modernos.

DISTRIBUCIONES DE LA CONCENTRACIÓN

De manera convencional, se considera que las concentraciones en el sector de los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos están distribuidas normalmente. Sin embargo, se ha realizado un estudio de datos de dos esquemas de competencia de alimentos obtenidos por medios biotecnológicos en el que se estudiaron datos de 29 rondas y 43 materiales de ensayo a lo largo de tres años. Los resultados de los dos esquemas son similares y se refuerzan mutuamente. El proceso de amplificación utilizado en las determinaciones cuantitativas de PCR predice una mezcla de distribuciones normales, binomiales y logarítmico-normales, dominadas por estas dos últimas. Como se previó, los resultados del estudio siguen de manera coherente una distribución asimétrica positiva. Es eficaz realizar una transformación logarítmica antes de calcular los valores z para establecer distribuciones casi simétricas que sean lo suficientemente cercanas a lo normal para justificar la interpretación con arreglo a la distribución normal⁸. Por lo tanto, se debe considerar si se deberían realizar la transformación logarítmica de todos los datos de las determinaciones cuantitativas antes de usarlos. En el Anexo VI se esbozan las consecuencias para los sistemas de comprobación de la competencia.

REFERENCIAS

1. ISO/AOAC/IUPAC harmonized protocol (Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies (1995), Ed. Horwitz, Pure and Applied Chemistry. 67: págs. 331-343).
2. Directrices sobre la incertidumbre en la medición (CAC/GL 54-2004).
3. Proyecto de documento de orientación del Codex sobre “el uso de los resultados analíticos: muestreo, relación entre los resultados analíticos, la incertidumbre de la medición, los factores de recuperación y las disposiciones de las normas del Codex”.
4. ISO/DIS 24276.
5. Directrices generales del Codex sobre toma de muestras (CAC/GL 50-2004).
6. Paoletti, C., Heissenberger, A., Mazzara, M., Larcher, S., Grazioli, E., Van den Eede, G., Corbisier, P., Hess, N., Berben, G., Lübeck, P.S., De Loose, M., Moran, G., Henry, C., Brera, C., Folch, I. y J. Ovesna (2006). Kernel Lot Distribution Assessment (KeLDA): a study on the distribution of GMO in large soybean shipments. *European Food Research and Technology* 224:129-139.

7. EN ISO 21570 Foodstuffs - Methods for the detection of genetically modified organisms and derived products – Quantitative nucleic acid based methods (ISO 21570:2005).
8. Scoring in Genetically Modified Organism Proficiency Tests Based on Log-Transformed Results, Michael Thompson, Stephen I. R. Ellison, Linda Owen, Kenneth Mathieson, Joanne Powell, Roger Wood y Andrew P Damant, *Journal of AOAC International*, 2006, 89(1), 232- 239.
9. Holst-Jensen, A. y K. G. Berdal (2004). The modular analytical procedure and validation approach and the units of measurement for genetically modified materials in foods and feeds. *Journal of AOAC International*. 87(4): págs. 927-936.
10. Freese *et al.* *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 6060-6066. Evaluating Homogeneity of LL601 Rice in Commercial Lots Using Quantitative Real-Time PCR.
11. Lipp, M., Shillito, R., Giroux, R., Spiegelhalter, F., Charlton, S., Pinero, D. y Song, P. (2005) Polymerase Chain Reaction Technology as an analytical tool in Agricultural Biotechnology. *Journal of AOAC International*. 88 (1): págs. 136-155, 2005.
- 12.** Grothaus, G. D., Bandla, M., Currier, T., Giroux, R., Jenkins, R., Lipp, M., Shan, G., Stave, J., y V. Pantella (2007). Immunoassay as an Analytical Tool in Agricultural Biotechnology. *Journal of AOAC International*. 85: 3, págs. 780-786.
13. Remund K.M., Dixon D.A., Wright D.L. Holden L.R. (2001). Statistical considerations in seed purity testing for transgenic traits. *Seed Science Research*. 11: págs. 101-120.
14. E. Anklam, F. Gadani, P. Heinze , H. Pijnenburg, y G. Van den Eede (2002). Analytical methods for Detection and Determination of Genetically Modified Organisms (GMO's) in Agricultural Crops and Plant-derived Food Products. *European Food Research and Technology* 214:3-26.
15. Miraglia, M., Berdal, K.G., Brera. C., Corbisier, P., Holst-Jensen, A., Kok, E.J., Marvin, H.J.P., Schimmel, H., Rentsch, J., van Rie, J.P.P.F. y J. Zagon (2004). Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. *Food and Chemical Toxicology* 42: 1157–1180.

ANEXO I: INFORMACIÓN QUE SE DEBE PROPORCIONAR AL CODEX CUANDO EL CCMAS SE PROPONE EXAMINAR UN MÉTODO PARA RATIFICARLO

A fin de facilitar la ratificación de un método propuesto de análisis para el sector de los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos por parte del Codex, especialmente por parte del CCMAS, se debe proporcionar lo siguiente:

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Se debe proporcionar una descripción completa y detallada de todos los componentes del método. Se debe abordar de manera explícita el uso de placas múltiples para la PCR y los métodos de proteína, como ejemplos. La descripción también debe incluir información acerca del alcance del método y se debe indicar claramente la unidad de medida, así como los datos siguientes:

Propósito y relevancia del método

Se deben indicar el objetivo del método y su relevancia con respecto a los requisitos legislativos pertinentes. En particular, quien proponga el método debe indicar que se cumplen las condiciones de principio del método.

Base científica

Se debe proporcionar una visión general de los principios científicos en los que se basa el método (por ejemplo, la biología molecular que sustenta el uso del método de PCR en tiempo real).

El modelo de predicción adoptado para interpretar los resultados y realizar deducciones se debe describir en gran detalle.

Especificación del modelo de predicción/modelo matemático necesario para el método

Si el cálculo de los resultados depende de una relación matemática, se debe indicar y registrar este hecho (por ejemplo, el método $\Delta\Delta C_t$ o una recta de regresión o una curva de calibración obtenida por otros medios). Se deben proporcionar instrucciones que permitan aplicar el modelo correctamente. Entre ellas, en función del método, se podrían proporcionar el número e intervalo de niveles que se deben analizar, el número mínimo de réplicas y/o diluciones que se deben incluir en los análisis habituales o los medios y los intervalos de confianza para evaluar la bondad del ajuste.

Se deben incluir un esbozo del diseño del experimento utilizado para la validación y los análisis habituales y detalles sobre el número de muestras, réplicas, diluciones, etc.

INFORMACIÓN ACERCA DE LA OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO

Ensayo de pares cebadores/sonda de oligonucleótido fluorescente

Para los métodos de PCR, se debe proporcionar una justificación suficiente de la selección de los pares cebadores propuestos/sonda de oligonucleótido fluorescente para el gen diana y el gen de referencia. Los límites del producto amplificado están formados por los cebadores a ambos lados. Por lo tanto, la selección de cebadores/sondas adecuados es un factor crucial del análisis de PCR.

Comprobación de la selectividad

Se deben proporcionar los resultados empíricos de la comprobación del método con las transformaciones del ADN recombinante no diana y el material vegetal de ADN no recombinante. Este ensayo debería incluir las transformaciones relacionadas estrechamente y casos en los que los límites de la sensibilidad se comprueben realmente. Además, podría ser adecuado comprobar otras plantas, especialmente en lo referente a los genes de referencia, para reducir la posibilidad de obtener un falso resultado positivo.

Comprobación de la estabilidad

Se pueden proporcionar los resultados empíricos de la comprobación de los métodos (**para detectar las secuencias de ADN diana y de referencia o proteínas) con diversas variedades, según proceda**, para demostrar, por ejemplo, la estabilidad del número de copias y la conservación de la secuencia del gen de referencia.

Comprobación de la sensibilidad

Se deben proporcionar los resultados empíricos de la comprobación del método con distintas concentraciones para comprobar la sensibilidad del método. Se deben definir los límites de detección empleando muestras que contengan solamente productos únicos, por ejemplo “el límite de detección para la soja Roundup Ready® es 0,1 % de la soja total *si el producto está compuesto al 100 % de soja*”. Para los productos alimentarios compuestos de varios ingredientes, la sensibilidad real se verá reducida, ya que el ADN total extraído se derivará de más de un ingrediente, de manera que la cantidad inicial del mesurando real se reducirá. El efecto de la dilución dependerá de la cantidad de ingrediente diana (por ejemplo, soja) que esté presente en el producto de alimentación y de la cantidad total de ADN derivado de los otros ingredientes. Algunos ingredientes aportarán una gran cantidad de ADN, como la harina de trigo y maíz o los huevos, mientras que otros ingredientes no aportarán ADN, como el azúcar refinado, el agua pura o los aceites muy elaborados.

El límite de detección debe ser determinado en relación con los equivalentes de genoma haploide para cada sistema de PCR por separado.

Comprobación de la solidez

Se deben proporcionar los resultados empíricos de la comprobación del método frente a los resultados obtenidos con variaciones pequeñas y deliberadas de los parámetros del método.

Reactividad cruzada

Se deben evaluar la reactividad cruzada, las interferencias y los efectos en la matriz.

APLICACIÓN PRÁCTICA DEL MÉTODO

Aplicabilidad

Se debe proporcionar la indicación de la matriz (por ejemplo, alimento elaborado, materia prima, etc.), el tipo de muestra (por ejemplo, semillas, harina, pizza, galletas, etc.) y el intervalo en el que se puede aplicar el método. Las limitaciones relevantes del método también se deben abordar (por ejemplo, la interferencia de otros analitos o la inaplicabilidad en ciertas situaciones). Entre las limitaciones también cabe incluir, en la medida de lo posible, las restricciones debidas al costo, los equipos u otros riesgos no específicos para el operador y/o el medio ambiente.

Características operacionales y practicabilidad del método

El equipo necesario para aplicar el método se debe indicar claramente, en relación con el propio análisis y la preparación de las muestras. Sería muy útil disponer de una indicación de los costos para los fines del Codex, así como de información sobre las dificultades prácticas y cualquier otro factor que pudiera ser importante para los operadores.

Habilidades que deben poseer los operadores

También se debe proporcionar la descripción de las habilidades prácticas necesarias para aplicar adecuadamente el método propuesto.

CONTROLES ANALÍTICOS

Se debe indicar la realización adecuada de controles en la aplicación del método, siempre que esté disponible esta información. Se deben especificar claramente los controles y se debe registrar su interpretación. Podría tratarse de controles negativos y positivos, sus contenidos detallados, el grado en que deben utilizarse y la interpretación de los valores obtenidos. Sin embargo, se reconoce que las muestras de control podrían no estar disponibles en el caso de plantas desconocidas/no aprobadas/en proceso de aprobación derivadas de ADN recombinante.

En particular, es necesario indicar lo siguiente:

- controles positivos y negativos utilizados;
- muestras de control, plásmidos y elementos similares utilizados;
- materiales de referencia empleados, cuando proceda.

VALIDACIÓN Y RENDIMIENTO DEL MÉTODO

Véase la “lista de comprobación del Codex” (es decir, exactitud, aplicabilidad (matriz, intervalo de concentración y preferencia concedida a los métodos “generales”), límite de detección, límite de cuantificación, precisión, recuperación, selectividad, sensibilidad y linealidad) y una comprobación de que los métodos serán adecuados para el fin.

Además, se debe proporcionar, en particular, la siguiente información para los procedimientos basados en ADN:

- ***Longitud de amplicón***

La elaboración de los alimentos conduce normalmente a la degradación del ADN diana. La longitud del producto amplificado podría influir en el rendimiento de la PCR. Por lo tanto, si se eligen tamaños menores de amplicón (dentro de lo razonable) se aumentará la posibilidad de obtener una señal positiva en el análisis de los alimentos muy elaborados. Por lo general, la longitud del fragmento amplificado para la secuencia endógena y la secuencia diana deberían tener un tamaño similar.

- ***Si el método es específico al instrumento o a compuestos químicos***

Actualmente, hay disponibles diversos tipos de instrumentos y compuestos químicos en tiempo real. Dichos instrumentos y compuestos químicos podrían tener rendimientos diferentes en lo que respecta a la estabilidad de los reactivos y las características de calentamiento y enfriamiento, lo que afecta las tasas de desnivel y el tiempo necesario para que se produzca la PCR completa.

Además de las diferencias del sistema de calentamiento y enfriamiento, hay otras diferencias en la técnica y los programas informáticos utilizados para inducir y registrar posteriormente la fluorescencia. Algunos instrumentos en tiempo real emplean técnicas de láser para inducir la fluorescencia; otros están equipados únicamente con una lámpara halógena y filtros para seleccionar una longitud de onda específica. La detección y la cuantificación de la fluorescencia podrían variar en función de los instrumentos y los programas informáticos utilizados para el registro.

Los métodos cualitativos podrían utilizar, por ejemplo, un sistema basado en gel para interpretar los resultados. Además, los métodos cualitativos tienden a ser menos específicos al instrumento que los métodos cuantitativos.

Si se toman todas las diferencias en consideración, es imposible cambiar el instrumento sin adaptar el método de PCR. Por lo tanto, debido a que los métodos dependen generalmente de los instrumentos y los compuestos químicos, no pueden transferirse a otros equipos o a otros compuestos químicos sin ser evaluados y/o modificados.

En muchos aspectos, es equivalente al método de Tipo I del Codex, y se debería considerar de manera similar.

- ***si se realizan amplificaciones simples o de tipo múltiplex de la PCR***

La utilización de más de un conjunto cebador en una reacción única se denomina PCR múltiplex. La finalidad de este enfoque es reducir los costos y el tiempo utilizado en el análisis de diferentes dianas de una única muestra (por ejemplo, un sistema específico a una transformación se combina con un taxón objeto específico para la cuantificación relativa). A menos que se haya realizado la optimización adecuada del múltiplex, se debe hacer hincapié en que la presencia desequilibrada de una de las secuencias diana conducirá a una amplificación preferida por la polimerasa durante la PCR. Además, la combinación de elementos cebadores diferentes está limitada a entre 7 y 10 por reacción simple.

La información proporcionada debe demostrar la solidez del método para la transferibilidad entre laboratorios, lo que implica que el método debe haber sido comprobado por al menos otro laboratorio además del que haya desarrollado el método. Éste es un requisito importante para el éxito de la validación del método.

Y, en lo que respecta a los métodos basados en proteína y en ADN:

- ***si existen diferencias entre los métodos basados en PCR y los inmunológicos en lo que respecta a los criterios de validación***

Las técnicas basadas en ADN y proteína empleadas para detectar y cuantificar los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos se basan en principios diferentes. En la PCR, el ADN diana se amplifica de manera exponencial, por lo que una pequeña diferencia al principio de la PCR conducirá a una gran diferencia en la

cantidad amplificada de ADN tras 35-45 ciclos. Además, la cuantificación mediante la PCR en tiempo real a menudo se basa en dos sistemas de PCR independientes: uno para la modificación genética y otro para la secuencia específica al taxón.

A diferencia de la PCR, los ensayos de detección inmunológica no siempre incluyen ciclos múltiples en los que el producto de la etapa anterior de amplificación se vuelva a amplificar.

ANEXO II: DEFINICIONES DEL CODEX APLICABLES AL ANÁLISIS DE ALIMENTOS OBTENIDOS POR MEDIOS BIOTECNOLÓGICOS

En este anexo se abordan las definiciones necesarias en el análisis de los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos. (*Nota: algunas definiciones se han agrupado en un único encabezamiento; las definiciones podrían ser contradictorias, lo que representa un problema que debe ser resuelto. La definición del Codex proporcionada en el Manual de Procedimiento debe ser usada y ampliada, de ser necesario. Las definiciones del Codex que no precisaban de una mayor cualificación para este análisis no se han reproducido en el presente documento*).

Exactitud

La exactitud se define como el grado de concordancia entre el resultado de un ensayo o la medición del resultado y el valor de referencia aceptado¹. En la práctica, se sustituye el valor aceptado de referencia por el valor verdadero. El término *exactitud*, cuando se aplica a un conjunto de resultados de un ensayo o a los resultados de mediciones, conlleva una combinación de componentes aleatorios y un error sistemático o componente de sesgo común.

Aplicabilidad

Los analitos, matrices y concentraciones para los cuales puede utilizarse un método de análisis².

Los analitos, matrices y concentraciones deben ser adecuados para los fines del control para el que se haya propuesto el método. La descripción puede incluir también advertencias acerca de la interferencia conocida de otros analitos o de la inaplicabilidad a determinadas matrices y situaciones.

No es factible proporcionar materiales de referencia para cada una de las muchas matrices de alimentos disponibles, por lo que, por regla general, será necesario utilizar como referencia una matriz representativa. El empleo del método en una nueva matriz deberá ser validado como mínimo mediante la validación en un único laboratorio, normalmente mediante experimentos de patrón y recuperación, y el material de referencia usado, cuando esté disponible, debe describirse en el informe que se entrega al cliente.

Rango dinámico - rango de cuantificación

El intervalo de concentración en el que se haya demostrado por un ensayo en colaboración que el procedimiento analítico tiene un nivel adecuado de precisión y exactitud.

Límite de detección

El límite de detección es la menor concentración o contenido de analitos que se puede detectar con fiabilidad, aunque no necesariamente cuantificarlo, según lo demostrado por la validación por ensayo en colaboración o por un único laboratorio. También se puede tomar el último valor con datos fiables para determinar el límite de detección. El límite de detección se expresa normalmente como la cantidad de analito con la que el método analítico detecta la presencia del analito en al menos el 95 % de las ocasiones (≤ 5 % de falsos resultados negativos).

Límite de cuantificación

El límite de cuantificación de un procedimiento analítico es la menor cantidad o concentración de un analito presente en una muestra que se puede determinar cuantitativamente con un grado aceptable de precisión y exactitud, según lo demostrado por las validaciones³ satisfactorias realizadas mediante ensayos en colaboración o en un único laboratorio⁴. También se puede tomar el último valor con datos fiables para determinar el límite de cuantificación.

¹ Definición adoptada de ISO 3534-1.

² La definición proporcionada en CODEX CX/MAS 02/4: Anteproyecto de directrices para la evaluación de métodos de análisis aceptables (versión de noviembre de 2002) ha sido modificada ligeramente.

³ EN/ISO 24276:2006 (E), con modificaciones ligeras.

⁴ E.g. Thompson *et al.* 2002. Informe técnico de IUPAC: Directrices armonizadas para la validación de métodos de análisis en un laboratorio único. Pure Appl. Chem. 74(5): 835-855.

Practicabilidad

La facilidad de las operaciones, en lo que respecta al rendimiento y los costos de la muestra, para lograr los criterios exigidos de rendimiento y cumplir así el propósito especificado⁵.

Por regla general, el método debería ser práctico para los fines pretendidos.

Desviación estándar de la repetibilidad

La desviación estándar de los resultados de los ensayos obtenidos en condiciones de repetibilidad. Las condiciones de repetibilidad son aquéllas en las que los resultados de un ensayo se obtienen con la aplicación del mismo método en elementos de ensayo idénticos por el mismo operador y en el mismo laboratorio, utilizando el mismo equipo en cortos intervalos de tiempo⁶.

Desviación estándar de la reproducibilidad

La desviación estándar de los resultados de las pruebas obtenidos en condiciones de reproducibilidad. Las condiciones de reproducibilidad son aquéllas en las que los resultados de los ensayos se obtienen aplicando el mismo método en elementos de ensayo idénticos por operadores diferentes de laboratorios diferentes utilizando diferentes equipos⁷.

Recuperación

Proporción de la cantidad de analito presente o añadida a la porción analítica del material de ensayo que se extrae y presenta para medición.

Solidez

La solidez hace referencia a las variaciones del método que aplican diferentes “técnicos” de laboratorios diferentes. En este apartado se utiliza terminología adaptada de las directrices armonizadas. La solidez debe ser demostrada mediante la validación del método en 8-12 laboratorios, como se dispone en las directrices armonizadas. Desde el punto de vista del Codex, es preferible que los laboratorios estén emplazados en varios continentes o bloques comerciales.

La solidez de un método analítico es una medición de su capacidad de no verse afectado por pequeñas variaciones deliberadas de los parámetros del método. La solidez es una indicación de la fiabilidad del método cuando se usa normalmente⁸.

Sensibilidad

La sensibilidad de un método es la medición de la magnitud de la respuesta causada por una cantidad determinada de analito.

El método debe ser lo suficientemente sensible como para detectar y cuantificar en relación con los umbrales, como dispone la legislación pertinente.

Dado que la sensibilidad depende del método y el fin, debe especificarse en el protocolo. Un objetivo razonable para la sensibilidad es el necesario para cumplir los niveles especificados en los contratos, con una certitud razonable de que el nivel no excede el límite requerido.

El término *sensibilidad* se utiliza de dos maneras: **límite de detección** y **respuesta instrumental**. El “límite de detección” es el término que se debe utilizar de preferencia para referirse a la medición de la capacidad que tiene un método para detectar una pequeña cantidad de analito. Véanse también las observaciones relacionadas con la sensibilidad en partes anteriores de este documento.

Selectividad

Capacidad de un método de responder exclusivamente a la característica o el analito de interés.

⁵ Adoptado de EN/ISO 24276:2006 (E), con modificaciones ligeras.

⁶ Definiciones adoptadas de ISO 3534-1.

⁷ Definiciones adoptadas de ISO 3534-1.

⁸ Definición adoptada del tema Q 2 A de ICH “Validación de métodos analíticos: definiciones y terminología”. Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos. CPMP/ICH/381/95. Versión de noviembre de 1994. Disponible en <http://www.emea.eu.int/pdfs/human/ich/038195en.pdf>.

Conformidad

El grado de concordancia entre el valor medio obtenido de una serie amplia de resultados de ensayos y un valor de referencia aceptado⁹.

La medición de la conformidad se expresa habitualmente en términos de sesgo. La conformidad se ha definido también como la “exactitud de la media”.

⁹ Adoptado de ISO 3534.

ANEXO III: VALIDACIÓN DE UN MÉTODO CUANTITATIVO DE PCR

INTRODUCCIÓN

El análisis basado en el ADN se realiza normalmente utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica amplifica un segmento específico (corto) de ADN hasta una medida en la que su cantidad se puede medir con ayuda de instrumentos (por ejemplo, por medios fluorométricos). El ADN es una molécula que se degrada fácilmente durante la elaboración de los alimentos (por ejemplo, debido al calor, a las enzimas y al corte mecánico) y, por lo tanto, recomendamos encarecidamente que se tenga esto en cuenta cuando se evalúen los criterios de rendimiento de esta técnica. Este hecho es de mucha importancia, porque en la mayor parte de los alimentos no hay presentes materias primas, sino elaboradas, lo que afecta a las proteínas y/o el ADN contenido en los alimentos. Además, las proteínas y/o el ADN podrían resultar degradados o su cantidad total podría disminuir a causa de la elaboración. Por lo tanto, todos los métodos actuales de detección (basados en ADN o en proteína) se ven afectados.

A menudo, los resultados de una determinación se expresan en forma de porcentaje de una muestra que contiene una secuencia particular obtenida por medios biotecnológicos. En un ensayo cuantitativo, esta medición atañe a dos determinaciones basadas en la PCR: la del analito primario (por ejemplo, una secuencia de genes insertada) y la del endógeno, o secuencia de comparación (por ejemplo, un gen de maíz endógeno). Las dos determinaciones tienen sus propias incertidumbres y las dos podrían tener características de medición diferentes. En la mayor parte de aplicaciones, el analito primario estará presente en concentraciones bajas y la secuencia de comparación estará presente en concentraciones entre 10 y 1 000 veces mayores. Por lo tanto, es importante que se validen adecuadamente ambas mediciones. En los casos en que la medición se expresa directamente como porcentaje, se deben tomar en consideración estos factores para validar el método.

La consecuencia es que el análisis de ADN, especialmente en los alimentos elaborados, tiene por objeto detectar una cantidad muy pequeña de analito. Si bien el resultado de un análisis de PCR se expresa a menudo porcentualmente como la cantidad relativa de ADN específico para los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos en relación con la cantidad total de ADN de una especie concreta, la cantidad real de ADN específico para alimentos obtenidos por medios biotecnológicos representa normalmente sólo nanogramos o gramos, o incluso cantidades menores. Es importante que los usuarios de los resultados del análisis tengan en cuenta que el análisis de tan bajas cantidades de analito conlleva una gran incertidumbre en las mediciones.

VALIDACIÓN

Un ensayo cuantitativo de PCR debe ser validado para el fin o aplicación previstos. Existe la norma ISO 5725:1996 y el protocolo armonizado AOAC/IUPAC para lo relacionado con los métodos de análisis químico. En ellos se definen los procedimientos que se deben realizar para validar un método. Cabe señalar que todos los principios y normas del protocolo armonizado son aplicables a los métodos cuantitativos de PCR.

A continuación se explican en detalle ciertos parámetros de la validación del rendimiento de un ensayo cuantitativo de PCR. Se trata del ámbito, el límite de detección, el límite de cuantificación, la exactitud, la precisión, la sensibilidad y la solidez. Otros factores importantes son los criterios de aceptación e interpretación de los resultados y la cuestión de las unidades en las que se expresan los resultados.

Nota: Actualmente existe un debate científico general acerca de la interpretación de los valores porcentuales. Se reconoce que, hasta la fecha, no hay ninguna relación fiable entre el peso y el número de copias debido a la incertidumbre acerca de la correlación entre el peso del ingrediente y el número de moléculas de ADN. Por el momento, los cálculos peso/peso y número de copias/número de copias son igualmente aceptables.

Todos los parámetros que se enumeran más adelante, incluidos la selectividad y la sensibilidad, **deben ser evaluados individualmente para cada uno de los ensayos, con inclusión de las reacciones PCR específicas al taxón y a la diana.** Se enumeran por orden alfabético, lo que no prejuzga un orden de importancia.

Exactitud

Al igual que cualquier otro método, la exactitud del método tiene que ser comparada con valores conocidos derivados de materiales de referencia, de preferencia los mejor caracterizados. La precisión será determinada de la manera habitual por estudios de laboratorio único (repetibilidad) y de diversos laboratorios (reproducibilidad). Sin embargo, se debe tener en cuenta el efecto de las diferencias entre las matrices de la muestra que se va a analizar y del material de referencia.

Aplicabilidad

Se deben indicar los analitos, matrices y concentraciones para los cuales puede utilizarse un método de análisis.

Rango dinámico - rango de cuantificación

El alcance los métodos define el intervalo de concentración en el que se podrá determinar el analito con fiabilidad. El intervalo para los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos variará entre casi 0 % y 100 % y, para el control endógeno, será de casi el 100 %, a menos que se prevea comprobar mezclas complejas. El rango deseado de concentración define las curvas típicas. Se debe utilizar un número suficiente de estándares, cuando sea de aplicación, como ocurre con las curvas de calibración, para definir adecuadamente la relación entre la concentración y la respuesta. Se debe demostrar que la relación entre la respuesta y la concentración es continua, reproducible y lineal, después de la transformación apropiada.

El rango de un método cuantitativo está diseñado típicamente para ser de entre casi 0 % y 100 % (porcentaje de ADN/moléculas/moléculas, genomas haploides/genomas haploides). Sin embargo, es común validar un método para un intervalo de concentraciones que sea de relevancia para el alcance de la aplicación. Si se valida un método para un intervalo determinado de valores, no se puede ampliar dicho intervalo sin validarlo de nuevo. Para ciertas aplicaciones (por ejemplo, el análisis de alimentos o grano), se podría estudiar el uso de ADN genómico para la preparación de la curva típica (véase el debate sobre el uso de ADN plásmido más adelante). Si bien es fácil establecer un estándar del 100 % nominal (únicamente limitada por la pureza de los materiales vegetales utilizados), es difícil producir soluciones estándar con precisión por debajo del 0,1 %. Además, el número de sitios diana (secuencia de ADN que se debe amplificar) se reduce tanto que pueden empezar a producirse errores estocásticos dominantes, lo que hará que el análisis sea menos preciso^{1,2,3}. Si se decide utilizar ADN (genómico o plásmido) como calibrador, es importante que se remonte dicho calibrador (en el sentido metrológico) a una referencia de orden metrológico superior, como un material de referencia certificado. El rango se determinará confirmando que el procedimiento de PCR proporciona un grado aceptable de linealidad y exactitud cuando se aplica a muestras que contienen cantidades de analito comprendidas dentro del rango especificado del procedimiento o en sus límites.

Las características únicas de la PCR cuantitativa imponen restricciones particulares en el límite inferior del rango dinámico de una PCR cuantitativa. Esto se debe a la dificultad de determinar los valores de los límites de detección y cuantificación debido a la distribución anormal de las variaciones de los valores de este intervalo.

Límite de detección y límite de cuantificación

Si la validación del ensayo cuantitativo de PCR muestra que el ensayo es capaz de medir la planta de ADN recombinante a, por ejemplo, el 0,1 % con conformidad y precisión aceptables, a menudo no es necesario determinar los límites de detección y cuantificación, ya que el método sólo se aplica por encima del rango en el que estos parámetros son relevantes. Sin embargo, si el método se emplea en concentraciones cercanas a los límites de detección y cuantificación (típicamente, 0,01-0,05 %), la evaluación de ambos límites formará parte del procedimiento de validación.

Cabe señalar que la determinación de los límites de detección y cuantificación no establece necesariamente la validez de un método para una aplicación determinada. Por ejemplo, no añade mucho valor el hecho de que se determine que el límite de detección es de 1 ng/kg si el alcance de la validación del método abarca únicamente concentraciones del orden de g/kg. En este caso y otros similares, la fiabilidad del método deberá ser demostrada por los demás parámetros y en la validación del método no se realizarán acciones dirigidas a calcular el límite de detección. No obstante, el límite de cuantificación siempre se debe establecer e incluir en el estudio de validación.

Si es necesario disponer del límite de detección, es práctica corriente asumir que éste equivale a la fuerza de la señal de una muestra testigo aumentada en tres veces la desviación estándar de la muestra testigo. No obstante, este método ofrece como mucho una estimación, se basa en una distribución gaussiana normal de

las mediciones de la muestra testigo alrededor de cero y puede dar como resultado un valor más bajo que el límite de detección real. Su uso no es válido en métodos como la PCR cuantitativa, en el que la distribución de los valores de las mediciones de las muestras testigo se trunca típicamente a cero y, por lo tanto, no tiene una distribución normal. Por consiguiente se hace necesario determinar el límite de detección de forma experimental, a menos que las concentraciones buscadas sean muy superiores al límite de detección y que, por tanto, éste carezca de importancia. Para los métodos cuantitativos, el límite de detección se define como la cantidad de analito con la que el método analítico detecta la presencia del analito al menos en el 95 % de las ocasiones (≤ 5 % de falsos resultados negativos). Éste, y el porcentaje de falsos resultados positivos, son los únicos parámetros necesarios para cualquier método cualitativo, aparte de la selectividad.

Para los métodos cuantitativos es importante conocer si el límite de cuantificación de una matriz en particular es cercano a los valores que se deben medir. Con el enfoque tradicional, el límite de cuantificación se puede definir como la fuerza de la señal de una muestra testigo igual al límite de detección aumentada en 6-10 veces la desviación estándar de la muestra testigo, a menos que se conozca por otras fuentes que los valores medidos son tan superiores al límite de cuantificación que la determinación de este último sea irrelevante. Sin embargo, este método de determinación del límite de cuantificación permite calcular únicamente una estimación del límite de cuantificación real que podría ser una aproximación artificial demasiado alta o baja.

En la práctica, se han utilizado dos procedimientos para determinar el límite de cuantificación. El primer método consiste en practicar ensayos en diversas muestras convencionales complementadas con cantidades conocidas de analito. En tal caso, el límite de cuantificación es el nivel en el que la variabilidad del resultado cumple ciertos criterios preestablecidos. Sin embargo, la extracción del ADN podría ser complicada en algunas matrices, como féculas o el *ketchup*, y se debe aceptar que puede haber eficiencias de extracción más bajas. Cuando la eficiencia de extracción es baja, se debe indicar este hecho en los datos de validación y en el informe del análisis. Un enfoque más completo consiste en comprobar el método utilizando diversas muestras que contengan cantidades conocidas de alimentos obtenidos por medios biotecnológicos. Este método es más complicado, ya que exige que se pueda acceder a cantidades significativas de materiales de referencia que contengan un rango conocido de concentraciones de la transformación de interés.

La validación de los métodos tiene dos etapas. La primera es una validación interna de todos los parámetros mencionados anteriormente excepto la reproducibilidad. La segunda es un ensayo en colaboración, cuyo principal resultado es la medición de la repetibilidad y la reproducibilidad junto con información detallada acerca de la transferibilidad de los métodos entre laboratorios. Se recomienda encarecidamente que se realice un ensayo en colaboración de pequeña escala para comprobar la solidez general de un método antes de efectuar el gasto que representa la organización de un ensayo a gran escala. En caso de que sea necesario mejorar el método o su descripción, sólo se efectúan gastos menores en el ensayo previo, mientras que el fallo de la validación de un método en la que participen varios laboratorios debido a la ambigüedad de la descripción del método representaría un fallo muy costoso. Además, cabe señalar que la aplicación de un método validado en el laboratorio debe incluir experimentos para confirmar que el método aplicado funciona tan bien en las condiciones particulares como lo hizo en las condiciones de la validación en el laboratorio. Es importante indicar que el método debe ser validado en las mismas condiciones en las que se empleará en el futuro. En lo que respecta a los métodos cuantitativos, es importante saber si el límite de cuantificación de una matriz determinada es cercano a los valores que vayan a ser medidos. Los métodos tradicionales de cálculo por aproximación del límite de cuantificación (valor cero más 6-10 desviaciones estándar) se basan en una distribución gaussiana normal de las mediciones de la muestra testigo alrededor de cero. Este enfoque no es válido en métodos como la PCR cuantitativa, en los que la distribución de los valores de la medición de muestras testigo se trunca típicamente en cero, por lo que no están distribuidas normalmente. Por lo tanto, el límite de cuantificación se debe determinar experimentalmente.

Practicabilidad

Se debe demostrar la practicabilidad del método.

Desviación estándar de la repetibilidad

Recomendación: La desviación estándar de la repetibilidad relativa debería ser ≤ 25 % o un valor tan cercano como sea posible en todo el rango dinámico del método.

Desviación estándar de la reproducibilidad

Recomendación: La desviación estándar de la reproducibilidad relativa debería ser inferior al 35 %, o tan cercana como sea posible a la concentración buscada en la mayor parte del rango dinámico. La desviación estándar de la reproducibilidad relativa debe ser ≤ 50 % o un valor tan cercano como sea posible al extremo inferior del límite de cuantificación.

Solidez

La evaluación de la solidez demuestra la fiabilidad de un método en relación con las variaciones involuntarias de los parámetros del ensayo. Las variaciones que se pueden incluir son los volúmenes de reacción (por ejemplo, 29 frente a 30 μ l), la temperatura de recocido (por ejemplo, $\pm 1^\circ$ C) y/u otras variaciones relevantes. Los experimentos deben ser realizados al menos por triplicado. La respuesta de un ensayo respecto a estos pequeños cambios no debe desviarse más de ± 35 % en los experimentos de reproducibilidad de la respuesta obtenida en las condiciones originales.

La adecuación de la comprobación de la solidez debe ser demostrada método por método. Por ejemplo, para un método de PCR en tiempo real, se deben tomar en consideración los siguientes factores y su origen o fuente: diferentes modelos de termociclador, polimerasa del ADN, uracil-n-glicosilasa, concentración de cloruro de magnesio, concentración cebadora directa e inversa, concentración de sonda, perfil de temperatura, perfil temporal, dNTP incluidas las concentraciones dUTP.

Sensibilidad

Para un método cuantitativo de PCR, se debe obtener una relación lineal del valor Ct como una función del logaritmo de la concentración del objetivo individual en todo el rango del método. Se debe informar del coeficiente de correlación, la intersección con el eje y y la pendiente de la línea de regresión. El porcentaje residual de cada uno de los calibradores debería ser idealmente ≤ 30 %.

A fin de obtener una curva típica para los ensayos cuantitativos de transformaciones, se pueden preparar mezclas estándar de ADN combinando ADN genómico purificado de material vegetal de ADN recombinante y no recombinante, como semillas u hojas. El contenido de planta de ADN recombinante de las mezclas podría ser 100, 50, 10, 5, 1, 0,5, 0,1, y 0 %, o los porcentajes apropiados para un intervalo menor de concentraciones. Se deben analizar al menos dos réplicas para cada punto de la curva típica. Cabe destacar que los efectos de la matriz pueden influir en los resultados, ya que la muestra a analizar y el material de referencia utilizado para la calibración podrían ser de matrices diferentes y haber sido extraídos por separado.

Para los ensayos cuantitativos de genes endógenos vegetales, se pueden preparar mezclas estándar de ADN combinando ADN genómico purificado de la especie vegetal diana y de especies que no constituyen la diana, siempre que las impurezas de la extracción de ADN no interfieran con la amplificación. Por ejemplo, en el contexto de la validación de un ensayo cuantitativo de un maíz Adh1, la especie vegetal objetivo es el maíz y la especie no objetivo podría ser la soja u otra especie. El contenido de ADN de la especie vegetal objetivo en las mezclas es típicamente 100, 50, 25, 10, 5, 1 y 0 %, o los porcentajes que convengan. Se deben analizar al menos dos réplicas para cada punto de la curva típica. Cabe destacar que los efectos de la matriz pueden influir en los resultados, ya que la muestra a analizar y el material de referencia utilizado para la calibración podrían ser de matrices diferentes y haber sido extraídos por separado.

En los casos en los que un laboratorio emplee el método Δ CT en vez de un método cuantitativo basado en la calibración, el analista será responsable de garantizar que la cantidad general de ADN esté comprendida en el intervalo para el que se validó el ensayo.

Especificidad de la diana

La especificidad para la diana de la detección y los genes de referencia debe ser demostrada mediante la aportación de pruebas experimentales de la comprobación del método con transformaciones de ADN recombinante no diana y plantas de ADN no recombinante. Esta comprobación debe incluir las transformaciones y, de preferencia, los casos en los que los límites de la detección sean comprobados verdaderamente. Dado que el método debe ser específico al acto de transformación, sólo debería ser funcional con el alimento obtenido por medios biotecnológicos y no debería ser funcional si se aplica a otras transformaciones, autorizadas previamente o no. Además, si un sistema de genes de referencia forma parte del método, este hecho no debería reconocer ninguna secuencia correspondiente incluso a especies relacionadas filogenéticamente y debería dar valores Ct similares, no diferentes estadísticamente, cuando se amplifican cantidades iguales de ADN de cultivares diferentes de orígenes muy distintos del mismo taxón.

La adecuación del ensayo debe ser analizada método por método. Es necesario proporcionar al Codex información sobre la comprobación de la especificidad de la diana en el caso de que los genes estén apilados en alguna fase.

Recomendación: La especificidad de la diana es el punto de partida del método y debe ser tomada en consideración cuando se diseñan los cebadores y las sondas. Los cebadores deben ser comprobados frente a la secuencia conocida de la inserción de la transformación y las bases de datos de secuencias pertinentes en busca de posibles homologías. Tras la realización de la evaluación teórica de la especificidad de la diana, se debe demostrar la selectividad experimentalmente. A continuación se sugiere un enfoque razonable de los experimentos que se deben realizar en la fase de validación previa de un ensayo.

Para los ensayos específicos a las transformaciones:

- Analizar al menos diez transformaciones de ADN recombinante no diana y cualquier planta de ADN no recombinante que puedan ser encontrados en el producto como sustancias contaminantes.
- Comprobar las muestras de cada fuente (un número apropiado de muestras de ADN).
- Analizar dos réplicas de cada muestra de ADN, que darán resultados dentro de un valor Ct de 0,5.

Los resultados de los ensayos muestran claramente que no se observan efectos significativos sobre la lectura de los instrumentos o de tipo químico.

Para los ensayos en genes vegetales endógenos (de referencia):

- Analizar al menos diez muestras vegetales diferentes que comprendan variedades diferentes de orígenes genéticos muy diversos de la misma especie vegetal, así como otras especies vegetales importantes para la producción de alimentos (como trigo, arroz, maíz, patata y soja) y que se pueden encontrar comúnmente en el producto como sustancias contaminantes.
- Someter a ensayo una muestra de cada fuente (un número apropiado de muestras de ADN).
- Analizar dos réplicas de cada muestra de ADN, que darán resultados dentro de un valor Ct de 0,5.

Los resultados de los ensayos muestran claramente que no se observan efectos significativos sobre la lectura de los instrumentos o de tipo químico.

Conformidad

Recomendación: La conformidad debe estar comprendida en \pm [30 %] del valor aceptado de referencia en todo el rango dinámico. Esto es de aplicación para la fase de PCR, a menos que se haya aplicado el enfoque modular.

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN DEL CONTROL ANALÍTICO E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Un método validado también incluye los valores de los criterios que permiten suponer la validez de un resultado observado de la medición. Es importante seguir estos criterios y respetar el sistema de apoyo a la toma de decisiones para el análisis y la interpretación de los datos. En caso de que se desee apartarse de los criterios y normas indicados, sería necesario realizar un estudio de validación del nuevo método para demostrar la validez del nuevo sistema de apoyo a la toma de decisiones y los nuevos procedimientos.

Como mínimo, los criterios de aceptación siguientes son comunes a todos los métodos cuantitativos de PCR y son aplicables a cada proceso de PCR:

- El resultado del control positivo del ADN diana con, por ejemplo, un 0,9 % de ADN recombinante, la media de las réplicas se desvía menos de 3 desviaciones estándar del valor asignado. Cuando sea de aplicación, un control del ADN diana se define como ADN de referencia o ADN extraído de un material de referencia certificado o del que se sabe que es una muestra representativa positiva de la secuencia u organismo objeto de estudio. El control tiene la finalidad de demostrar cuál debería ser el resultado de los análisis de las muestras que contienen la secuencia diana.
- El control del reactivo de amplificación es igual o menor que el límite de detección. El control del reactivo de amplificación se define como el control que contiene todos los reactivos, excepto el ADN molde extraído de la muestra. En vez del ADN molde, se añade a la reacción un volumen correspondiente de agua sin ácido nucleico.

- El porcentaje de residuos de cada uno de los estándares debería ser $\leq 30\%$, o un valor tan cercano a éste como sea posible.

Para aceptar el resultado de una muestra desconocida, la desviación estándar relativa de las réplicas de la muestra debe ser $\leq [35]\%$ o un valor tan cercano a éste como sea posible.

REFERENCIAS DEL ANEXO III

1. Horwitz W; Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. Pure and Applied Chemistry, 67, 331 (1995).
2. Huebner P, Waiblinger H U, Pietsch K, Brodmann P (2001) Validation of PCR methods for quantitation of genetically modified plants in food. Journal of AOAC International 84(6) 1855-1864.
3. Kay, S. y G. Van den Eede. The limits of GMO detection (2001). Nature Biotechnology. 19(5): pág. 504.
4. Residue Chemistry Test Guidelines OPPTS 860.1340 "Residue Analytical Method". Organismo de protección medioambiental de los EE.UU., agosto de 1996, (Mihaliak & Berberich, 1995).

ANEXO IV: VALIDACIÓN DE UN MÉTODO CUALITATIVO DE PCR

Introducción

Un método cualitativo de PCR debe ser validado en la medida de lo posible en la misma manera en que se pretende usar para los análisis habituales, lo que implica que se debe demostrar que la sensibilidad del método es tal que se puede confiar en que detectará una muestra positiva y no dará muchos falsos resultados positivos. Se ha elaborado un concepto de utilización de tasas de falsos resultados positivos y falsos resultados negativos para describir la exactitud y la precisión de un ensayo cualitativo, para los ensayos microbiológicos¹. Este concepto se puede aplicar a los ensayos cualitativos de PCR. Una cuestión central de la validación de este tipo de método es la disponibilidad de materiales de ensayo cuya positividad o negatividad sean conocidas. La provisión de materiales de referencia negativos es especialmente importante y crítica en el caso de los métodos cualitativos. No obstante, se reconoce que, en algunos casos, podría no haber ningún material de referencia disponible, por ejemplo en el caso de productos obtenidos por medios biotecnológicos modernos aún no aprobados.

Debido a su naturaleza, los ensayos cualitativos están orientados a la identificación por encima/por debajo de un límite de detección. Las mediciones de la precisión y la exactitud son las frecuencias de los falsos resultados positivos y/o negativos en el límite de detección. Los falsos resultados negativos indican la ausencia de un analito determinado cuando, de hecho, el analito está presente en la muestra, mientras que los falsos resultados positivos indican la presencia de un analito que no está presente en la muestra. Debido a la naturaleza inherente de la técnica de análisis, se observa un aumento de los falsos resultados negativos cuando la cantidad de analito se acerca al límite de detección del método. Al igual que el límite de detección en los métodos cuantitativos, el límite de detección de un método cualitativo se puede definir como la concentración en la que una muestra positiva arroja resultados positivos en al menos el 95 % de las ocasiones. Por lo tanto, el porcentaje de falsos resultados negativos debe ser de 5 % o menos. Durante la validación de un ensayo cualitativo de PCR, también es importante determinar el número de falsos resultados positivos (un resultado positivo obtenido con una muestra que se sabe que es negativa). También se expresa como ratio o porcentaje.

Tasa de falsos resultados positivos

Es la probabilidad de que una muestra de ensayo que se sabe que es negativa sea clasificada como positiva por el método. La tasa de falsos resultados positivos es el número de negativos conocidos mal clasificados dividido por el número total de muestras de ensayo negativas (positivos mal clasificados más el número de negativos clasificados correctamente) que se haya obtenido con el método.

Para mayor facilidad, esta tasa se puede expresar porcentualmente:

$$\% \text{ falsos resultados positivos} = \frac{\text{número de muestras negativas conocidas mal clasificadas}}{\text{número total de resultados negativos (incl. los mal clasificados)}}$$

Tasa de falsos resultados negativos

Es la probabilidad de que una muestra de ensayo que se sabe que es positiva sea clasificada como negativa por el método. La tasa de falsos resultados negativos es el número de positivos conocidos mal clasificados dividido por el número total de muestras de ensayo positivas (positivos mal clasificados más el número de positivos conocidos clasificados correctamente) que se haya obtenido con el método.

Para mayor facilidad, esta tasa se puede expresar porcentualmente:

$$\% \text{ falsos resultados negativo} = \frac{\text{número de muestras negativas conocidas mal clasificadas}}{\text{número total de resultados positivos (incl. los mal clasificados)}}$$

Nota: algunos sectores emplean definiciones diferentes.

Para demostrar la tasa de falsos resultados negativos de un ensayo cualitativo, se debe analizar una serie de muestras (por ejemplo, grano/reservas de semillas) con una concentración constante y conocida de material positivo en un conjunto de material negativo (por ejemplo, un grano positivo en 199 granos convencionales

de maíz) y se deben evaluar los resultados. Cabe señalar que los conceptos de intervalos de confianza e incertidumbre estadística también deben ser aplicados al riesgo de falsos resultados positivos y/o negativos. El nivel deseado de confianza determina el número y el tamaño de los conjuntos en los que se deben realizar ensayos. Por ejemplo, la obtención de 100 resultados positivos en 100 mediciones independientes de muestras verdaderamente positivas indica que el nivel de falsos resultados negativos está por debajo del 4,5 % con un nivel de confianza del 99 % para la concentración comprobada de granos positivos (expresada como el número de granos positivos en un conjunto de granos negativos).

Solidez

Como ocurre con todos los métodos validados, se deben realizar acciones para demostrar la solidez del ensayo. Para ello, es necesario optimizar e investigar minuciosamente el impacto que tiene la introducción de pequeñas modificaciones que podrían producirse por razones técnicas.

Valores de los criterios de aceptación e interpretación de los resultados

Un método validado incluye valores para los criterios de rendimiento con arreglo a los cuales se puede aceptar como válido el resultado observado de una medición. Es importante seguir estos criterios y respetar el sistema de apoyo a la toma de decisiones para el análisis y la interpretación de los datos. Por lo tanto, es importante asegurarse de que el resultado del control del ADN diana positivo, cuando esté disponible, sea positivo. Del mismo modo, el control del reactivo de amplificación debe ser negativo. Además de estos controles, es deseable realizar una reacción paralela en la misma muestra de ADN utilizando un conjunto de cebadores que detecte una secuencia de copia única endógena para determinar el impacto de los inhibidores de la PCR que se sospechan presentes. Esta reacción se debe realizar en todas las muestras de ADN en las que no se haya observado amplificación, y se puede realizar tanto en la misma reacción (múltiplex) como en una reacción independiente en la misma extracción de ADN. En el caso de las reacciones de tipo múltiplex es importante que la reacción endógena no supere a la reacción específica a la transformación para los reactivos, ya que es probable que la secuencia endógena esté presente en una cantidad de hasta en 1 000 veces más que la secuencia diana. Para llevar a cabo la optimización de las condiciones de la PCR se deberán tomar en consideración estas condiciones. La reacción de control de la inhibición con la secuencia endógena ofrece una indicación de la calidad del ADN como molde para la PCR. En el Cuadro 1 se indican los criterios de aceptación/rechazo para la PCR utilizando los resultados de la PCR con una secuencia endógena.

La reacción de control de la inhibición también se puede realizar con ADN patrón y el ensayo de la PCR adecuado y que no interfiera en ella.

Cuadro 1: Criterios para clasificar los análisis cualitativos de PCR

Resultado de la PCR (analito modificado genéticamente)	Resultado de la PCR (endógeno)	Clasificación del ensayo
Positivo	Positivo	Positivo
Negativo	Positivo	Negativo
Positivo	Negativo	Repetir
Negativo	Negativo	Repetir

No obstante, una complicación adicional viene introducida por el hecho de que las PCR cualitativas se realizan normalmente al menos por duplicado. Por lo tanto, es posible que los duplicados no den resultados idénticos. Es práctica habitual repetir las reacciones PCR al menos una vez en muestras de ADN rechazadas debido a la discrepancia de los resultados de las réplicas. La repetición de un resultado indeterminado indica que el analito no se puede detectar con fiabilidad (véase el Cuadro 2) y que el ensayo se está realizando por debajo del límite de detección ya que, por definición, en el límite de detección se debería lograr una tasa de detección del 95 % o superior. Por lo tanto, la muestra será clasificada como inferior al límite de detección. Son de aplicación criterios similares si se realizan más réplicas en cada muestra de ADN.

Cuadro 2: Criterios para clasificar los análisis cualitativos de PCR duplicados ya clasificados en función del Cuadro 1.

Resultado 1	Resultado 2	Resultado del análisis
Positivo	Positivo	Positivo
Negativo	Positivo	Repetir/indeterminado
Positivo	Negativo	Repetir/indeterminado
Negativo	Negativo	Por debajo del límite de detección

REFERENCIAS DEL ANEXO IV

1. AOAC® Official MethodsSM Program Manual, Apéndice X p14f, mayo de 2002, AOAC International; sitio web: www.aoac.org/vmeth/omamannual/htm.

ANEXO V: VALIDACIÓN DE UN MÉTODO BASADO EN PROTEÍNA¹

ENSAYO CUANTITATIVO

Los ensayos cuantitativos inmunológicos sirven para determinar los niveles del analito proteínico presente en partes concretas de la planta (por ejemplo, semilla, hoja, raíz, tallo) de un cultivar o una mezcla de cultivares. Las aplicaciones típicas se muestran en la Tabla 1. Para aplicar un método de detección inmunológica, como ELISA de microplaca, con el fin de determinar cuantitativamente un analito proteínico en tejidos vegetales, es necesario obtener en primer lugar una muestra representativa del material vegetal. La cantidad de muestra y el procedimiento de preparación de las porciones del ensayo influirán en el límite de detección o sensibilidad del ensayo. A continuación se extrae el analito del material vegetal añadiendo el líquido adecuado y mezclando, agitando o aplicando fuerzas de corte o sónicas. Los líquidos que se emplean normalmente son agua y soluciones salinas tamponadas. A veces, se añaden detergentes o tensioactivos en función de los ensayos validados y las matrices. Algunas proteínas exigen procedimientos más rigurosos como la homogeneización o la cocción en solventes, detergentes, sales, etc.

La descripción del procedimiento siguiente es sólo una de las varias posibles para realizar un ensayo inmunológico de detección de las proteínas expresadas en plantas derivadas de ADN recombinante.

Tras la realización de partes más o menos específicas de los ensayos de detección, como la inmovilización de los anticuerpos de captura en la superficie del pozo de la microplaca, se añade un volumen preciso de la solución extraída de la muestra a cada pozo. El analito presente en la solución del ensayo se une al anticuerpo de captura. El anticuerpo secundario marcado con enzimas se añade y se une también al analito, envolviéndolo. En este momento, se lava el pozo para eliminar el analito y los anticuerpos que no se hayan unido, dejando únicamente el conjugado complejo anticuerpo-analito-anticuerpo adherido a la superficie del pozo. Se añade un sustrato colorimétrico que procesa la enzima, lo que da como resultado un producto de color. La reacción se detiene tras un período de tiempo determinado y con ayuda de un fotómetro se mide la absorción de color en una longitud de onda determinada. Se genera la curva típica trazando la densidad óptica en el eje y y la concentración en el eje x , lo que da como resultado una curva de la respuesta a la dosis que utiliza una ecuación cuadrática u otro modelo de curva adecuado del método.

Para obtener un valor cuantitativo preciso y exacto, la densidad óptica de las soluciones de muestra debe estar incluida en la porción lineal de la curva de calibración. Si la densidad óptica es demasiado alta, la solución de muestra debe ser diluida hasta que la densidad óptica esté dentro del rango de cuantificación del ensayo. La concentración del analito proteínico en la muestra original de material vegetal se calcula corrigiendo el factor de dilución que se introdujo para preparar la muestra para su aplicación a la microplaca. El peso inicial de la muestra, el volumen de líquido de extracción y las diluciones posteriores se usan para calcular el factor de dilución.

Se pueden utilizar diferentes controles para demostrar el rendimiento del ensayo. Puede introducirse en el ensayo una muestra testigo, como un pozo vacío o una solución tamponada, para determinar las respuestas iniciales que se obtendrán de la muestra y las respuestas de calibración, si se desea. Se usará una muestra de control negativa (por ejemplo, una solución de extracción de la matriz de la que se sabe que no contiene el analito) para demostrar que no se producen en el ensayo respuestas no específicas o consecuencias para la matriz. Se puede realizar un control positivo o una extracción de la matriz incrementada con una cantidad conocida del analito para demostrar la exactitud del ensayo. Se pueden aplicar estándares y muestras en un número adecuado de réplicas para evaluar la precisión del ensayo. Normalmente, se realizan muestras testigo, controles negativos, controles positivos, extracciones fortificadas de la muestra cuando es necesario, materiales de referencia, extracciones del material de referencia y réplicas en cada microplaca para controlar las variaciones de una placa a otra.

MATERIALES DE REFERENCIA

El material de referencia es la misma matriz que el producto agrícola que va a ser objeto de ensayo. Por ejemplo, si la matriz que va a ser objeto de ensayo es semilla de soja, el material de referencia normalizado debería ser semilla de soja que contenga una proporción conocida de semilla de ADN recombinante. También se puede utilizar una muestra pura o una extracción de la proteína de interés, siempre que el uso de dichos materiales proteínicos de referencia haya sido validado para la matriz en cuestión. En algunos casos, la matriz de referencia, por ejemplo la fécula, podría no estar disponible. El acceso a los materiales de referencia es importante en el desarrollo, la validación y el empleo de ensayos inmunológicos para analizar

las proteínas introducidas en los productos básicos agrícolas de ADN recombinante. Se debe utilizar material de referencia de la mejor calidad disponible para cumplir los reglamentos y los requisitos de los ensayos.

En el caso de los productos básicos como el grano o la semilla, en los que el producto se compone de unidades discretas, es apropiado preparar una muestra de referencia con una proporción conocida de material de ADN recombinante. En otros casos, la generación de muestras de referencia para ciertas matrices y analitos puede ser una tarea difícil. La estabilidad y la uniformidad son cuestiones importantes. Por ejemplo, si la matriz que debe ser objeto de ensayo se compone de una mezcla de materiales, será difícil combinar el material de ADN recombinante y no recombinante de tal manera que se pueda lograr una muestra homogénea de referencia que contenga una proporción conocida de material de ADN recombinante. La estabilidad de estos materiales debería ser evaluada en condiciones de almacenamiento y de ensayo. En cualquier caso, es útil disponer de material de ADN recombinante y no recombinante para utilizarlo como controles negativos y positivos.

Si se interrumpe la disponibilidad, como en el caso de que se retirara del mercado una planta derivada de ADN recombinante, se deben alcanzar soluciones adecuadas para poder realizar los controles positivos.

Durante el desarrollo del ensayo, se utiliza el material de referencia para seleccionar los parámetros del ensayo que reducirían los efectos de interferencia de la matriz (por ejemplo, la unión no específica de los componentes de la muestra a los anticuerpos o los inhibidores de enzimas). Durante la validación y el uso del ensayo, se pueden extraer los materiales de referencia y analizarlos junto a las muestras del ensayo para que los resultados sean comparables de manera directa.

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO CUANTITATIVO BASADO EN PROTEÍNA

Los principios de validación del método descritos en los Anexos III y IV para los métodos de PCR también son de aplicación para los métodos basados en proteína. En lo que respecta a los equipos de ensayo inmunológico disponibles comercialmente, el rendimiento del ensayo es validado normalmente por el fabricante en un único laboratorio o mediante ensayos de validación en colaboración, y se documenta en el manual del usuario del producto.

La validación debería ser realizada de conformidad con el protocolo armonizado ISO/IUPAC/AOAC para los métodos de análisis químico. En el presente documento se indican los procedimientos necesarios para validar un método².

Exactitud: La exactitud se demuestra midiendo la recuperación del analito de muestras fortificadas y se da cuenta de ella como la recuperación media en varios niveles del rango cuantitativo. Lo ideal es que los métodos cuantitativos tengan recuperaciones demostradas de entre 70 y 120 % y un coeficiente de variación de menos de 20 % para las recuperaciones medidas en cada nivel de fortificación (Mihaliak y Berberich, 1995).

Eficiencia de extracción: La eficiencia de extracción es una medición de la eficiencia de un método determinado de extracción en la separación del analito proteínico de la matriz. Se expresa como porcentaje de analito recuperado de la muestra. Dado que la proteína introducida expresada es endógena a la planta, puede ser difícil demostrar verdaderamente la eficiencia del procedimiento de extracción. Podría no haber un método alternativo de detección con el que comparar los resultados del ensayo inmunológico. Un método para abordar la eficiencia de extracción consiste en demostrar la recuperación de cada tipo de analito proteínico introducido de cada tipo de fracción de alimento por extracción exhaustiva, es decir, la extracción repetida de la muestra hasta que no se detecta más proteína (Stave, 1999).

Precisión: La precisión en el ensayo hace referencia a las variaciones que ocurren en un ensayo. Se puede evaluar determinando la variación (% del coeficiente de variación) entre las réplicas que han sido objeto de ensayo en varias concentraciones de la curva típica y en la variación reunida (% del coeficiente de variación) derivada de los valores de absorción en estándares de ensayos independientes realizados en fechas diferentes. La precisión del ensayo describe la variación que tiene lugar entre ensayos diferentes y que se puede medir analizando las muestras de control de calidad de cada microplaca. Las muestras de control de calidad necesarias se componen de dos conjuntos de extracciones, una extracción de tejido vegetal de ADN recombinante y una de tejido vegetal de ADN no recombinante. Las extracciones se almacenan congeladas. Posteriormente, se descongela una porción y se somete a ensayo en cada microplaca. La precisión del ensayo se puede evaluar a lo largo del tiempo y se expresa como porcentaje del coeficiente de variación (Rogan *et al.*, 1999). La precisión de los métodos cuantitativos basados en proteína es, por lo general, más alta que la de los métodos basados en PCR.

Recomendación: La exactitud debe estar comprendida en $\pm [25 \%$ del valor aceptado de referencia en todo el rango dinámico.

Sensibilidad:

La sensibilidad del ensayo se puede definir como la cantidad de analito que puede ser medido mediante la lectura de la absorción de dos desviaciones estándar por encima de la absorción inicial (Rogan *et al.*, 1992). El límite de detección se puede expresar como la dilución más baja de la proteína derivada del producto de ADN recombinante que puede ser detectada y combinada con la proteína extraída de la muestra de ADN no recombinante (Rogan *et al.*, 1999). Puede haber discrepancias en el caso de que la proteína de interés sea la misma en varias transformaciones a pesar de tener tasas diferentes de expresión proteínica. Por ejemplo, dos transformaciones podrían expresar la misma proteína aunque las tasas de expresión proteínica fueran diferentes en el grano cosechado (así como en otras partes de la planta). De manera similar, probablemente haya una variabilidad sustancial en las expresiones proteínicas en función de las condiciones de cultivo. Si el material de referencia utilizado para calibrar un método ELISA tiene una tasa de expresión alta, el ensayo subestimaré la presencia en el material vegetal procedente de plantas cultivadas en condiciones que favorezcan niveles inferiores de expresión.

Rango dinámico - rango de cuantificación

El alcance los métodos define el intervalo de concentración en el que se podrá determinar el analito con precisión. En la mayor parte de los casos, el rango analítico de los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos variará entre 0,1 % y varios puntos porcentuales. El intervalo deseado de concentración define las curvas típicas y se debe utilizar un número suficiente de estándares para definir adecuadamente la relación entre la concentración y la respuesta del ensayo. Se debe demostrar que la relación entre la respuesta y la concentración es continua, reproducible y lineal, después de la transformación apropiada.

Puede ser difícil interpretar los valores porcentuales (por ejemplo, el rango dinámico entre 10 % y 500 % del valor objetivo) utilizando métodos cuantitativos. Los métodos cuantitativos basados en proteínas arrojan por lo general una estimación de la concentración de la proteína derivada de plantas de ADN recombinante en la matriz, debido a variaciones en la expresión de la cantidad de proteína presente en los diferentes tejidos vegetales o entre cultivares, así como en el mismo tejido procedente de ubicaciones diferentes. El uso de métodos cualitativos basados en proteína es, por lo tanto, mucho más corriente. Además, es necesario actuar con cautela cuando se utiliza un método que puede detectar la proteína en la matriz analizada. Por ejemplo, se cree que las proteínas sufren modificaciones o degradación debido a la elaboración en mayor medida que el ADN, por lo que se debe tener en cuenta la pérdida de señal provocada por los efectos de la elaboración de los alimentos.

Cabe señalar que la determinación de los límites de detección y cuantificación no establece necesariamente la validez de un método para una aplicación determinada. Por ejemplo, no añade mucho valor el hecho de que se determine que el límite de detección es de 1 ng/kg si el alcance de la validación del método abarca únicamente concentraciones del orden de g/kg. En este caso y otros similares, la fiabilidad del método deberá ser demostrada por los demás parámetros y en la validación del método no se realizarán acciones dirigidas a calcular el límite de detección. No obstante, el límite de cuantificación siempre se debe establecer e incluir en el estudio de validación.

Límite de detección

En el Anexo II se define el límite de detección. Las proteínas están presentes en los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos en concentraciones mayores que el ADN diana en los métodos de PCR. Por lo tanto, los efectos estocásticos tienen menos influencia en la determinación del límite de detección que cuando se emplea la PCR.

Para estimar el límite de detección, es práctica habitual asumir que es la fuerza de la señal de una muestra testigo aumentada en tres veces la desviación estándar de la muestra testigo. Este método da como resultado, como mucho, una estimación, y se basa en una distribución gaussiana típica de las mediciones de la muestra testigo alrededor de cero. De manera general, esto se puede asumir para métodos como ELISA, aunque la mejor manera de determinar el límite de detección es mediante experimentos. El límite de detección también se define normalmente como una concentración igual al estándar inferior utilizado en el ensayo, en el caso de que se obtenga un valor positivo consistente con dicho estándar.

Límite de cuantificación

Para los métodos cuantitativos es importante conocer si el límite de cuantificación de una matriz en particular es cercano a los valores que se deben medir. Con el enfoque tradicional, el límite de cuantificación se puede definir como la fuerza de la señal de una muestra testigo igual al límite de detección aumentada en 6-10 veces la desviación estándar de la muestra testigo, a menos que se conozca por otras fuentes que los valores medidos son tan superiores al límite de cuantificación que la determinación de este último sea irrelevante. Sin embargo, este método de determinación del límite de cuantificación permite calcular únicamente una estimación del límite de cuantificación real que podría ser una aproximación artificial demasiado alta o baja.

En la práctica, se han utilizado dos procedimientos para determinar el límite de cuantificación. El primer método consiste en practicar ensayos en diversas muestras convencionales complementadas con cantidades conocidas de analito. En tal caso, el límite de cuantificación es el nivel en el que la variabilidad del resultado y el porcentaje de recuperación cumplen ciertos criterios preestablecidos. Para las moléculas pequeñas, estos criterios son, típicamente, un coeficiente de variación $\leq 20\%$ y una recuperación de entre 70 y 120 %³. Sin embargo, la recuperación de proteínas podría ser complicada en algunas matrices, como féculas o aceites, y se debe aceptar que puede haber eficiencias de recuperación más bajas. Cuando la eficiencia de la recuperación es baja, se debe indicar este hecho en los datos de validación y en el informe del análisis. Un método más completo consiste en comprobar el método utilizando diversas muestras que contengan cantidades conocidas de materiales procedentes de alimentos obtenidos por medios biotecnológicos. Este método es más complicado, ya que exige que se pueda acceder a cantidades significativas de materiales de referencia que contengan un rango conocido de concentraciones de la transformación de interés. Los procedimientos para calcular el límite de detección y el límite de cuantificación de los métodos cuantitativos de PCR figuran en los Anexos III y IV.

Especificidad de la diana

La especificidad de la diana es el grado en que los análogos u otras moléculas se unen a los anticuerpos. Este concepto debe clasificarse y describirse en el método. La especificidad de la diana debe ser demostrada mediante resultados experimentales del ensayo del método con transformaciones de ADN no diana recombinante y plantas de ADN no recombinante. Este ensayo debería incluir las transformaciones relacionadas estrechamente y casos en los que los límites de detección sean comprobados realmente. Dado que el método debería ser específico a la proteína, sólo debería ser funcional con el alimento obtenido por medios biotecnológicos objeto de estudio y no debería ser funcional si se aplica a transformaciones que no expresan la proteína en cuestión. La posibilidad de que se produzcan interferencias causadas por reactivos y el material de laboratorio se puede evaluar sometiendo a ensayo extracciones de material vegetal de ADN no recombinante.

Efectos de la matriz: si la respuesta del método se ve afectada por una sustancia en la extracción final, aparte del analito proteínico concreto, la respuesta no específica recibe la denominación de efecto de la matriz. Una manera de gestionar los efectos de la matriz consiste en demostrar que el método analítico arroja resultados idénticos con o sin la matriz de muestra presente en la extracción. Con este enfoque, se debe demostrar la ausencia de efectos de la matriz en todas las matrices en las que se vaya a aplicar el ensayo. Otro enfoque menos adecuado para gestionar los efectos de la matriz consiste en preparar las soluciones estándar en extracciones de matrices de ADN no recombinante, como estándares ajustados a la matriz. Así se garantiza que los efectos de la matriz que pudieran producirse serán coherentes con los estándares y las muestras.

Solidez

La evaluación de la solidez demuestra la fiabilidad de un método en relación con las variaciones involuntarias de los parámetros del ensayo. Las variaciones que se podrían incluir son los volúmenes de reacción, la temperatura de incubación (por ejemplo, 5-10°C positivos y negativos) y/u otras variaciones pertinentes. Los experimentos deben ser realizados al menos por triplicado y se debe calcular la recuperación. La respuesta de un ensayo respecto a estos pequeños cambios no debe desviarse más de $\pm 30\%$ respecto a la respuesta obtenida en las condiciones originales. Entre los experimentos que pueden realizarse para determinar la solidez, cabe destacar el análisis repetido de las muestras en fechas diferentes y la medición de la exactitud y la precisión de las muestras fortificadas empleando material de control de diversas fuentes.

ENSAYO CUALITATIVO (UMBRAL)

Los dispositivos de flujo lateral son herramientas útiles para la comprobación de umbrales *in situ* o en el terreno. Los métodos ELISA tradicionales también se pueden emplear en los ensayos cualitativos. A fin de

garantizar la fiabilidad de los resultados, los fabricantes de los ensayos deben llevar a cabo una validación del método y proporcionar una descripción de las características de rendimiento del producto en las instrucciones del producto. Si se han realizado estas acciones, normalmente no es necesario que los usuarios de los dispositivos de flujo lateral realicen estudios de validación para la aplicación de la técnica en su laboratorio. Cada dispositivo de flujo lateral es una unidad individual independiente capaz de realizar los estándares descritos en las instrucciones del producto de acuerdo con el esquema de garantía de calidad del fabricante. En el caso de los métodos ELISA, se debe realizar la validación para garantizar que el método funciona como se esperaba en el laboratorio.

A fin de establecer un procedimiento *in situ* de comprobación del umbral, se debe establecer en primer lugar el nivel del umbral. Para determinar que el dispositivo de flujo lateral puede diferenciar entre muestras que contienen proteína derivada de plantas de ADN recombinante por encima o por debajo del umbral, se deben someter a un ensayo de competición una referencia negativa y una referencia de umbral que contengan una proporción conocida de planta de ADN recombinante. La referencia negativa es una muestra de una matriz de ensayo de la que se sabe que no contiene el analito proteínico y que se somete a ensayo para demostrar que el método es capaz de distinguir entre cero y el nivel de umbral. Se somete a ensayo un número suficiente de estas muestras para garantizar que la sensibilidad del ensayo es adecuada para determinar si el nivel de la muestra de ensayo es superior o inferior al nivel de umbral. Durante la comprobación habitual de muestras de productos básicos a granel, los dispositivos de flujo lateral se usan normalmente sin someter a ensayo de competencia las muestras de referencia negativa y de umbral.

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO CUALITATIVO BASADO EN PROTEÍNA

Los mismos principios son de aplicación para los ensayos cualitativos basados en proteína que para los ensayos cualitativos de PCR. Estos enfoques, incluido el cálculo de las tasas de falsos resultados positivos y negativos, se pueden aplicar por lo tanto a los métodos basados en proteína. Por regla general, debido al carácter más preciso de los métodos de flujo lateral basados en proteína, no se realizan por duplicado en cada muestra. Sin embargo, si se realiza el ensayo ELISA, se deben utilizar pozos duplicados.

Se pueden utilizar los mismos tipos de muestras de control y los mismos criterios de aceptación/rechazo que para los métodos cualitativos de PCR. El límite de detección se expresa normalmente como la cantidad de analito con la que el método analítico detecta la presencia del analito al menos en el 95 % de las ocasiones (< 5 % de falsos resultados negativos). No obstante, los ensayos de flujo lateral se aplican generalmente en concentraciones de ensayo de al menos el doble (o más) del límite de detección.

REFERENCIAS DEL ANEXO V

1. Guidelines for the Validation and Use of Immunoassays for Determination of Introduced Proteins in Biotechnology Enhanced Crops and Derived Food Ingredients. Lipton *et al.*, Food and Agricultural Immunology, 2000, 12, 153-164.
2. Horwitz W; Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. Pure and Applied Chemistry, 67: 331 (1995).
3. Mihaliak, C.A. y Berberich S.A. “Guidelines to the Validation and Use of Immunochemical Methods for Generating Data in Support of Pesticide Registration”, en: Nelson, J.O., Karu, A.E. y Wong, R.B. (editores) (1995). Immunoanalysis of Agrochemicals: Emerging Technologies, ACS Symposium Series n.º 586, American Chemical Society: págs. 288 – 300.
4. J.W. Stave (1999) Detection of the new or modified proteins in novel foods derived from GMO-future needs, Food Control 10: págs. 367–374.
5. Rogan G.J., Dudin Y.A., Lee T.C.; Magin K.M., Astwood J.D., Bhakta N.S., Leach J.N., Sanders P.R., Fuchs R.L. Immunodiagnostic methods for detection of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in Roundup Ready(R) soybeans (1999) Food Control 10(6): págs. 407-414.

ANEXO VI: COMPROBACIÓN DE LA COMPETENCIA DE ALIMENTOS OBTENIDOS POR MEDIOS BIOTECNOLÓGICOS: interpretación de los valores z derivados de datos obtenidos por transformación logarítmica

NOTA: Documento técnico 18 del Comité de métodos analíticos de RSC, descargado del sitio de Internet www.rsc.org/lap/rsccom/amc/amc_index.htm.

En algunos ensayo de competencia destinados a medir la proporción de alimentos obtenidos por medios biotecnológicos, los resultados se someten a transformación logarítmica antes de proceder al cálculo de los valores z [1]. La transformación se puede justificar teórica y prácticamente. No obstante, la transformación da lugar a valores z que no son de la misma escala que los datos originales, por lo que no se pueden interpretar de manera tan directa. Podría ser útil tener nociones previas sobre transformaciones logarítmicas.

¿Qué es una distribución logarítmico-normal?

En el Gráfico 1 se muestra la densidad de una variable de distribución logarítmico-normal. Es asimétrica, presenta una asimetría positiva y todos los valores de x son, necesariamente, superiores a cero. Si, en cambio, se representan la densidad y el logaritmo de x , se obtiene la forma familiar de la distribución normal (véase el Gráfico 2). (Obsérvese que en este documento se entiende que los logaritmos son de base diez).

Definición: *una variable x tiene distribución logarítmico-normal si $\log x$ tiene una distribución normal.*

Si bien todas las distribuciones normales tienen esencialmente la misma forma, la forma de una distribución logarítmico-normal depende de su desviación estándar relativa, que se expresa en este documento en forma de fracción. Por ejemplo, la distribución muy asimétrica del Gráfico 1 presenta una desviación estándar relativa de 0,3, mientras que el Gráfico 3, que tiene también distribución logarítmico-normal y una desviación estándar relativa de 0,1, muestra únicamente una asimetría ligera. (Para facilitar la referencia, los resultados de los ensayos de competencia de ADN recombinante vegetal tienen normalmente una desviación estándar relativa de cerca de 0,7).

Datos de ensayos de competencia de alimentos obtenidos por medios biotecnológicos

Actualmente, casi todas las mediciones cuantitativas de especies modificadas genéticamente presentes en alimentos se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En los estudios realizados por varios laboratorios, como el ensayo de competencia, los resultados muestran casi siempre una distribución muy asimétrica (véase el Gráfico 4 como ejemplo). Existen razones previas para esperar este resultado. En primer lugar, el procedimiento podría haber comenzado con un número muy pequeño de copias del gen, por lo que las copias tendrían una distribución binomial en la muestra tomada para la PCR. Las distribuciones binomiales presentan una asimetría positiva para un pequeño número de copias. Si el ADN está asociado con un número pequeño de partículas, la toma de muestras de dichas partículas podría dar lugar a un resultado asimétrico, incluso si el número de copias de gen fuera relativamente alto. La función de calibración en la PCR tiene forma logarítmico-lineal, lo que tenderá a producir una distribución logarítmico-normal de los resultados a partir de la inserción de un dato normal. Por último, debe tenerse en cuenta la distribución normal de los errores del sistema de lectura de los instrumentos.

Como resultado de todo ello, se espera que la distribución de los errores sea una convolución compleja de los tipos de distribución, con una tendencia hacia la asimetría positiva. Por tanto, es tentador sugerir que podría ser adecuado realizar la transformación logarítmica de los resultados de los participantes antes de generar los valores z . Mediante un estudio detallado de los datos del ensayo de competencia se ha justificado esta acción en la práctica [2]. Pero, ¿cómo se pueden relacionar dichos valores z con la práctica cotidiana y el rendimiento de cada uno de los laboratorios?

Comprobación de la competencia de la asignación de valores z en plantas derivadas de ADN recombinante

Cabe recordar que, en los ensayos cuantitativos de los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos, los errores parecen ser más multiplicativos que aditivos, como ocurre en la mayor parte de las tareas analíticas. En tal contexto, una propiedad muy útil de la transformación logarítmica es que varios conjuntos de datos que tienen la misma desviación estándar *relativa* en la escala original tienen la misma desviación estándar *absoluta* en la escala logarítmica. En el caso de los ensayos de competencia de alimentos obtenidos por medios biotecnológicos, este hecho permite a los operadores establecer un valor único σ_p para el esquema, independientemente de la concentración del analito (excepto, por supuesto, cuando la concentración sea cero

o un valor muy cercano a cero). Así, se puede calcular un valor z a partir de un resultado x y un valor asignado x_a (ambos en la escala original), según la ecuación:

$$z = (\log x - \log x_a) / \sigma_p = \log(x/x_a) / \sigma_p .$$

$\log x_a$ será normalmente la media robusta de los valores de $\log x$. El valor σ_p (la desviación estándar para la competencia, antes denominada “valor objetivo”) debe ser un criterio específico para el fin, de ser posible.

Por lo tanto, si la adecuación para el fin exige que el resultado satisfactorio esté comprendido entre (por ejemplo) $0.5x_a$ y $2.0x_a$, debemos establecer σ_p de manera que los resultados del límite den valores z de -2 y $+2$, respectivamente. La sustitución de los valores correspondientes $z = 2$ y $x = 2.0x_a$ en la ecuación anterior da como resultado

$$2 = (\log 2x_a - \log x_a) / \sigma_p , \text{ o bien}$$

$$\sigma_p = \frac{1}{2} \log 2 = 0.1505 .$$

(Utilizando $z = -2$ y $x = 0.5x_a$ se obtiene el mismo resultado, compruébelo).

En términos generales, si son necesarios los límites dados por x_a/q y qx_a , se requiere que $\sigma_p = \frac{1}{2} \log q$. Además, se puede conmutar fácilmente entre un valor z y el valor correspondiente de $r = x/x_a$ (el factor por el cual un resultado difiere del valor asignado) utilizando las ecuaciones $r = 10^{z\sigma_p}$ y $z = \log r / \sigma_p$. Por ejemplo, si $z = 3.5$ y $\sigma_p = 0.1505$, obtenemos $r = 10^{0.527} = 3.36$: el resultado excede el valor asignado en un factor de 3,36.

Conclusión

Lo esencial es que los errores principales parecen ser multiplicativos en los ensayos cuantitativos basados en PCR de alimentos obtenidos por medios biotecnológicos. Como consecuencia, la incertidumbre de la escala de medición original no está dispuesta simétricamente alrededor del resultado. Independientemente de ello, los valores z basados en los datos obtenidos por transformación logarítmica se pueden seguir tratando como si fueran simétricos: un valor z de $-3,5$ tiene la misma importancia que un valor z de $+3,5$. Condiciones similares podrían ser aplicables para cualquier otro sistema de medición (como la microbiología cuantitativa) que se base en un procedimiento multiplicativo.

NOTA: Este documento técnico ha sido preparado para el Comité de métodos analíticos por el Subcomité de estadística, presidido por M. Thompson, con el apoyo del Organismo de normas alimentarias del Reino Unido.

REFERENCIAS DEL ANEXO VI

1. Powell, J. y L Owen (2002). Reliability of food measurements: the application of proficiency testing to GMO analysis. Accreditation and quality assurance. **7**: 392-402.
2. Thompson, M., Ellison, S. I. R., Owen, L., Mathieson, K., Powell, J., Wood, R. y Andrew P Damant (2006). Scoring in Genetically Modified Organism Proficiency Tests Based on Log-Transformed Results, Journal of AOAC International, 89(1): 232- 239.

Gráficos:

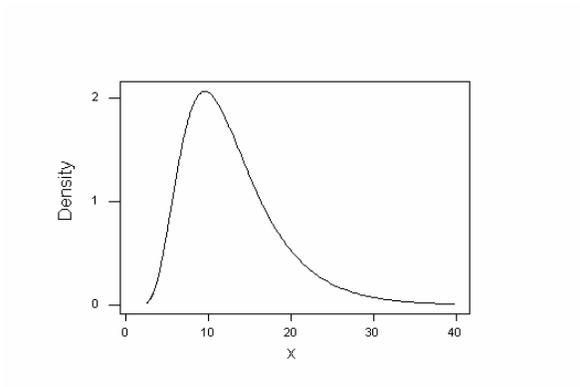


Gráfico 1. Una distribución logarítmico-normal con una desviación estándar relativa de 0,3.

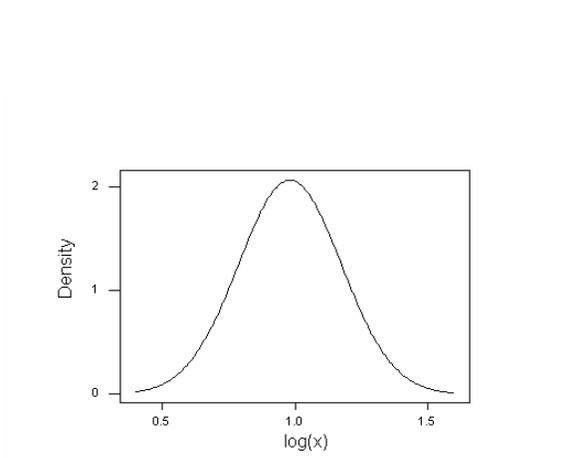


Gráfico 2. La misma distribución del Gráfico 1, con la densidad y $\log x$ en los ejes.

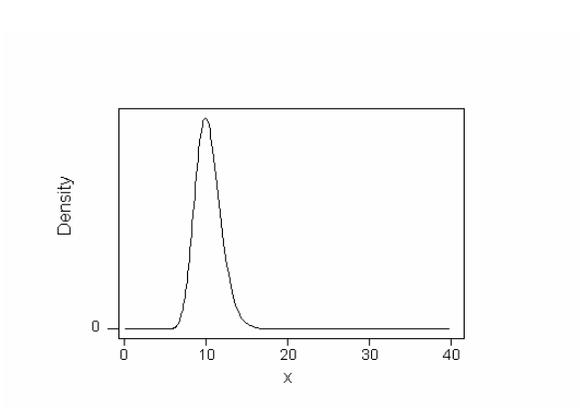


Gráfico 3. Una distribución logarítmico-normal con una desviación estándar relativa de 0,1.

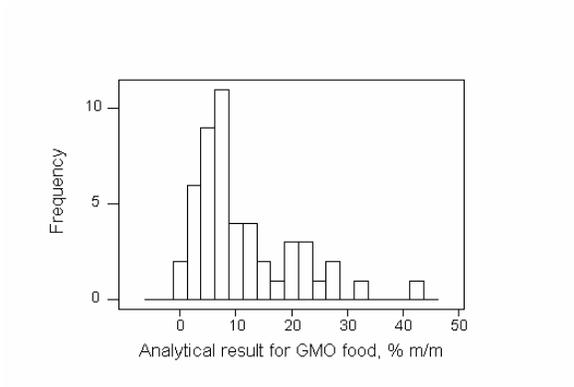


Gráfico 4. Resultados de una única ronda de ensayos de competencia en los que se midió la concentración de soja de ADN recombinante.