

comisión del codex alimentarius S



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 3 del programa

CX/MAS 10/31/3

PROGRAMA CONJUNTO FAO/OMS SOBRE NORMAS ALIMENTARIAS

COMITÉ DEL CODEX SOBRE MÉTODOS DE ANÁLISIS Y TOMA DE MUESTRAS

31.^a reunión

Budapest (Hungría), 8 – 12 de marzo de 2010

ANTEPROYECTO DE DIRECTRICES SOBRE CRITERIOS PARA LOS MÉTODOS DE DETECCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE SECUENCIAS ESPECÍFICAS DE ADN Y DE PROTEÍNAS ESPECÍFICAS, EN PARTICULAR EN ALIMENTOS DERIVADOS DE LA BIOTECNOLOGÍA MODERNA

(En el trámite 3)

A través del presente documento se distribuye el anteproyecto de Directrices en el trámite 3, según figura en el Anexo II del informe del grupo de trabajo, para recabar observaciones y para su examen por parte del Comité del Codex sobre Métodos de Análisis y Toma de Muestras en su 31.^a reunión. 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.º, Budapest (Hungría), número de fax: +36 13879400, correo electrónico: HU_CodexCP@mebih.gov.hu, **antes del 10 de febrero de 2010.**

INFORME DEL GRUPO DE TRABAJO SOBRE EL ANTEPROYECTO DE DIRECTRICES SOBRE CRITERIOS PARA LOS MÉTODOS DE DETECCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE SECUENCIAS ESPECÍFICAS DE ADN Y DE PROTEÍNAS ESPECÍFICAS, EN PARTICULAR EN ALIMENTOS DERIVADOS DE LA BIOTECNOLOGÍA MODERNA

17 de agosto a 20 de noviembre de 2009 (grupo de trabajo electrónico)

El Comité del Codex sobre Métodos de Análisis y Toma de Muestras (CCMAS) celebró su 30.^a reunión del 9 al 13 de marzo de 2009 en Balatonalmádi (Hungria). Durante la 30.^a reunión del CCMAS se acordó establecer un grupo de trabajo electrónico con el fin de revisar (en el trámite 2 del procedimiento) el *Anteproyecto de Directrices sobre criterios para métodos de detección, identificación y cuantificación de secuencias específicas de ADN y proteínas específicas, en particular en alimentos obtenidos por la biotecnología moderna*, habida cuenta de las observaciones presentadas y planteadas a lo largo de la reunión (ALINORM 09/32/23).

El grupo de trabajo electrónico mencionado comenzó sus actividades el 17 de agosto y las concluyó el 20 de noviembre de 2009, bajo la presidencia conjunta de la Argentina, el Reino Unido y Alemania. Argentina actuó como anfitriona y proporcionó una plataforma basada en Internet y el correo electrónico para el funcionamiento del grupo de trabajo electrónico.¹ El idioma de trabajo fue el inglés y el grupo de trabajo electrónico estuvo abierto a todos los miembros y a organizaciones observadoras. El grupo de trabajo electrónico estaba integrado por 81 participantes, distribuidos en 31 delegaciones de los Estados miembros, de organizaciones miembros o de organizaciones internacionales. La lista detallada de participantes se incluye en este informe como Anexo I.

A lo largo de los debates del grupo de trabajo se intercambiaron un total de 243 intervenciones que se estructuraron como se describe a continuación.

Del 17 al 21 de agosto hubo un debate general sobre el conjunto del documento y la organización del trabajo. Durante sus intervenciones iniciales algunas delegaciones hicieron referencia a la viabilidad del documento para diferentes aplicaciones relacionadas con los alimentos y propusieron modificar el nuevo párrafo sobre el título y el alcance que se introdujo en la 30.^a reunión del CCMAS. A su vez, otras delegaciones se oponían a la modificación de estos textos, ya que representaban un compromiso reciente y existía interés por comenzar el examen del contenido técnico del proyecto sin más demora.

Con el fin de avanzar se propuso que hubiese una primera revisión o “lectura” del texto de las directrices en la que no se modificarían el título ni el párrafo sobre el alcance y se pondrían entre paréntesis y apartarían las referencias adicionales al alcance dentro del texto. Esto permitiría centrarse en los detalles técnicos y ajustar la orientación al nuevo alcance ampliado. Una vez que el grupo de trabajo electrónico hubiese examinado todo el texto una vez a la luz del nuevo alcance, habría un nuevo debate para examinar la necesidad de ajustes en el título y en la redacción del alcance. Por último, tras un debate específico, habría una segunda lectura breve de todas las directrices para perfeccionar el texto.

La primera lectura del proyecto se produjo entre el 24 de agosto y el 19 de octubre. El examen del documento se realizó por orden, en rondas de aproximadamente una semana centradas en las diferentes partes. La primera lectura se basó en un proyecto actualizado de directrices distribuido por anticipado en el que figuraban cambios acordados durante la 30.^a reunión del CCMAS. Estos cambios eran: a) el nuevo título y el nuevo párrafo sobre el alcance; b) cambios en la estructura propuestos originalmente por el Japón (CX/09/30/8-Add.1) y c) la supresión de texto relacionado con cuestiones de procedimiento del Codex porque se decidió que las directrices eran para uso de los gobiernos.

¹ Con este fin, los anfitriones desarrollaron una adaptación específica del programa gratuito de código abierto Moodle (<http://moodle.org>) para brindar apoyo a un grupo de trabajo electrónico del Codex. Los grupos de trabajo electrónicos facilitan considerablemente la implicación de los países miembros en desarrollo como participantes o anfitriones de grupos de trabajo entre las reuniones de los comités. En el Manual de procedimiento del Codex se indica que se debería otorgar preferencia a la creación de grupos de trabajo electrónicos en la búsqueda de un consenso mundial y una mayor aceptabilidad de las normas del Codex. Por tanto los archivos modelo y los conocimientos generados durante la experiencia se encuentran a disposición de los miembros interesados y el sitio web permanecerá accesible hasta abril de 2010 en la dirección www.agrobiotecnologia.gov.ar/ccmas.

Las cuestiones pendientes presentadas y planteadas en la anterior reunión del CCMAS se trataron durante la primera lectura. Tales cuestiones comprendían la necesidad de mejoras en relación con los métodos basados en las proteínas, la actualización de metodologías y referencias técnicas o científicas, la estimación de la incertidumbre en la medición, la armonización de la terminología y modificaciones de redacción.

Además, se modificó la terminología anterior que restringía la aplicabilidad de la orientación a los productos de la biotecnología por una más general aplicable a cualquier secuencia específica de ADN o cualquier proteína específica de interés en los alimentos, de acuerdo con el nuevo alcance. Sin embargo, algunos detalles de la orientación solo eran aplicables o necesarios con respecto a alimentos derivados de la biotecnología y, por tanto, la terminología específica se mantuvo en esos casos.

Desde el 19 de octubre al 6 de noviembre se registró un debate sobre la redacción del alcance. Se centró en el título, el párrafo sobre el alcance, el párrafo sobre la finalidad y una fórmula única para las referencias adicionales al alcance a lo largo del texto. Algunas delegaciones mantenían que la manera como se mencionaban en esas partes importantes los alimentos derivados de la biotecnología moderna fomentaba el malentendido de que las directrices solo debían aplicarse a los métodos concebidos para esos productos. Como consecuencia de ello, proponían una redacción alternativa. Sin embargo, otras delegaciones no estaban conformes con la redacción alternativa y se declararon favorables a mantener la redacción y algunas alusiones importantes a los alimentos derivados de la biotecnología tal como resultaban de la última reunión del CCMAS.

Del 26 de octubre al 16 de noviembre se realizó una segunda lectura del proyecto modificado. En la segunda lectura se examinaron simultáneamente todas las directrices, lo que permitió mejoras en todas las partes, mejoras en pequeños detalles técnicos y la simplificación editorial del documento.²

Si bien se hizo todo lo posible, no se pudo llegar a una solución definitiva con respecto a la redacción del alcance. Sin embargo, se registró consenso y un claro sentimiento de avance en relación con la mayor parte restante del texto. Como consecuencia de ello, el título y el párrafo sobre el alcance procedentes de la 30.^a reunión del CCMAS, que se utilizaron como referencia durante la revisión técnica, se presentan en el proyecto revisado como opción principal, en tanto que las redacciones y opciones alternativas para las referencias adicionales al alcance figuran entre paréntesis.

Por último, el presente informe se elaboró del 16 al 20 de noviembre. El grupo de trabajo acordó presentar al Presidente del CCMAS y a la Secretaría del Codex el proyecto revisado de Directrices con el fin de facilitar la continuidad de las etapas siguientes previstas en el informe de la 30.^a reunión del CCMAS: la difusión del proyecto revisado con miras a la formulación de observaciones en el trámite 3, en preparación de su examen en la 31.^a reunión del CCMAS.

A fin de complementar el presente informe, las actas de los debates del grupo de trabajo electrónico se mantendrán disponibles en su totalidad en el sitio web del grupo hasta la siguiente reunión del CCMAS.

El documento revisado con el título de *Anteproyecto de Directrices sobre criterios para métodos de detección, identificación y cuantificación de secuencias específicas de ADN y proteínas específicas, en particular en alimentos obtenidos por la biotecnología moderna* se incluye en este informe como **Anexo II**.

² En diferentes momentos de la revisión algunas delegaciones sostuvieron que, después de las importantes modificaciones introducidas, una nueva reorganización del documento mejoraría aun más su calidad. Sin embargo, no se discutieron el detalle ni las ventajas de tal reorganización a fin de terminar a tiempo la tarea del grupo de trabajo electrónico.

ANEXO I

LISTA DE PARTICIPANTES

Copresidentes del grupo de trabajo:

Prof. Martín Alfredo Lema

Ministry of Agriculture,
Livestock and Fisheries –
Biotechnology Directorate.
Av. Paseo Colón 922, piso 2, of.
247 C1063ACW,
Buenos Aires
T: +54-11- 4349-2070
F: +54-11- 4349-2178
e-mail: mlema@minagri.gob.ar

Dr. Roger Wood

Food Standard Agency
c/o Lincolne, Sutton and
Wood.
70-80 Oak Street, NR3 3AQ,
Norwich
T: +44 (0) 1603 624555
F: +44 1603629981
e-mail:
roger.wood@foodstandards.gsi.gov.uk

Dr. Gerd Fricke

Federal Office of Consumer
Protection and Food
Safety.
10117 Berlin, Mauerstrasse 39-42
T: +49-301844410000
F: +49-(0)301844410009
e-mail: gerd.fricke@bvl.bund.de

PRESIDENTE DEL CCMAS

Prof. Dr. Árpád Ambrus

Hungarian Food Safety Office
Gyáli út 2-6.
Budapest, HU-1097
T: +36 1 439 0356
F: +36 1 387 9400
e-mail arpad.ambrus@mebih.gov.hu

SECRETARÍA CONJUNTA DE LA FAO Y DE LA OMS

Selma H. Doyran

Oficial superior de normas alimentarias
Programa conjunto FAO/OMS sobre normas
alimentarias
FAO - Viale delle Terme di Caracalla
00153 Rome (Italia)
T: +39 06 570 55826
F: +39 06 570 54593
e-mail: selma.doyran@fao.org

ESTADOS MIEMBROS

ARGENTINA

Ing. Agr. Perla Godoy

Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca –
Dirección de Biotecnología
Av. Paseo Colón 922, piso 2, of. 247 C1063ACW,
Buenos Aires
T: +54-11- 4349-2200
F: +54-11- 4349-2178
e-mail: pgodoy@minagri.gob.ar

Ing. Agr. Gabriela Catalani

Punto Focal del Codex Alimentarius
Dirección de Relaciones Agroalimentarias
Internacionales
Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca.
Av. Paseo Colón 922 Oficina 29
Tel.: (+5411) 4349-2549 Fax.: (+5411) 4349-2244
gcatal@minprod.gov.ar

Dr. Moisés Burachik

Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca –
Dirección de Biotecnología
Av. Paseo Colón 922, piso 2, of. 247 C1063ACW,
Buenos Aires
T: +54-11- 4349-2074
F: +54-11- 4349-2178
e-mail: mburac@minagri.gob.ar

Lic. Verónica María Torres Leedham

Director de Laboratorios y Control Técnico –
SENASA SAGYP
Paseo Colón 315 – 5TO Piso B,
Buenos Aires C 1063ACD
T: +541141215028
F: +541141215029
e-mail: vtorres@senasa.gov.ar

Nora Angelini
Coordinadora Científico Técnica
Dirección de Laboratorios y Control Técnico-
SENASA
Secretaria Alterna CCMAS – Argentina
nangelin@senasa.gov.ar

Lic. Cecilia Llabrés
Dirección de Relaciones Agroalimentarias
Internacionales
Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca
e-mail: cllabr@minagri.gov.ar

Dra. Ximena Pastorino
CICVyA - INTA
Buenos Aires
T: +54-11- 4621-1278/1447 int. 152

AUSTRALIA

Mr. Richard Coghlan
National Measurement Institute
P.O. BOX 385 Pymble, NSW 2073
T: +61294490111
F: +61294491653
e-mail: richard.coghlan@measurement.gov.au

Dr. Kerry Emslie
National Measurement Institute
1 Suakim st., Pymble
T: +61-2-9449-0141
F: +61-2-9449-1653
e-mail: kerry.emslie@measurement.gov.au

Dr. Wolfgang Korth
Department of Agriculture, Fisheries & Forestry
18 Marcus Clarke str. , 2601 Canberra
T: +61 2 6272 4771
F: +61 2 6272 4023
e-mail: wolfgang.korth@daff.gov.au

Mrs. Karina Budd
Senior Scientist, National Residue Survey
Australian Government Department of
Agriculture,
Fisheries and Forestry
18 Marcus Clarke str. 2601 Canberra
T: +61 2 6272 5795
F: +61 2 6272 4023
e-mail: karina.budd@daff.gov.au

Mr John Widdowson
Manager, Chemical Testing
National Association of Testing Authorities
Australia
71-73 Flemington Road, North Melbourne Vic
3057
T: + 613-93291633
F: +613-93265148
e-mail: John.Widdowson@nata.asn.au

Robert Munro
Manager Veterinary Residues,
Australian Pesticides and Veterinary Medicines
Authority.
PO Box 6182
Kingston ACT 2611, Australia
Tel: +61 2 6210 4832
Fax: +61 2 6210 4741
e-mail: robert.munro@apvma.gov.au

BÉLGICA

Mr. Rudi Vermeylen
Laboratories' Administration
Belgian Federal Agency for the Safety of the Food
Chain
Kruidtuinlaan 55, 1000 Brussel
tel.:+32 2 211 87 32
fax:+32 2 211 87 39
e-mail: rudi.vermeylen@favv.be

BRASIL

Shirley Abrantes
Head of Brazilian delegation
Researcher of Oswaldo Cruz Foundation
Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro,
Brazil
CEP 21040-900
tel: +552125603427 or +552138655124
e-mail: shirley.abrantes@incqs.fiocruz.br

CANADÁ

Barbara Lee
Director, Food Laboratory Services
Laboratory Operations
T: (613) 773-5297
e-mail: barbara.lee@inspection.gc.ca

Bertrand Gagnon
Deputy Director- Codex and Food Safety
Coordination
T: (613) 773-6092
e-mail: bertrand.gagnon@inspection.gc.ca

COLOMBIA

Adriana Castaño Hernandez
Bióloga M.Sc - Programa OGM
Subdirección de Alimentos y Bebidas Alcohólicas
INVIMA
e-mail: acastanoh@invima.gov.co

Javier David Castellanos Pulido
Microbiólogo M.Sc
Laboratorio Central Interinstitucional de
Detección y Monitorio de OGM
INVIMA
e-mail: jcastellanosp@invima.gov.co

COMUNIDAD EUROPEA

Mr Niall Gerlitz
European Commission, DG Health and Consumers,
Policy Officer
B-1049 Rue Breydel 4, Brussels
T: +3222951618
F:+3222956043
e-mail: niall.gerlitz@ec.europa.eu

Dr. Jérôme Lepeintre
European Commission, DG Health and
Consumers,
Head of Unit
Rue Froissart 101 (02/62), B-1049, Brussels
T: +32 2 299 3701
F:+32 2 299 8566
e-mail: Jerome.lepeintre@ec.europa.eu

ALEMANIA

Dr. Lutz Grohmann
Bundesamt für Verbraucherschutz
und Lebensmittelsicherheit
Federal Office of Consumer Protection
and Food Safety (BVL)
Mauerstrasse 39-42
10117 Berlin, Germany
T: +49 (0)30 18444-40510
F: +49 (0)30 18444-40099
e-mail: Lutz.Grohmann@bvl.bund.de

Mr. Hermann Broll
Federal Institute for Risk Assessment
Thielallee 88-92
14195 Berlin, Germany
Tel.: +49 (0)30 8412-3639
Fax: +49 (0)30 8412-3685
E-Mail: hermann.broll@bfr.bund.de

GHANA

Prof. Victoria Dzogbefia
Professor of Biochemistry
Faculty of Biosciences
Kwame Nkrumah University of Science &
Technology
Kumasi, Ghana
Email: vicdzogbefia@yahoo.com

Prof Kwame Offei
College of Agric & Consumer Science
University of Ghana
Legon, Ghana
Email: offei@ug.edu.gh

JAPÓN

Mr Taku Oohara
Assistant Director
Inspection and Safety Division, Department of
Food Safety,
Ministry of Health, Labour and Welfare
T:(+ 81) 3 5253-1111
e-mail: codexj@mhlw.go.jp

Dr Hidetaka Kobayashi
Associate Director
Food Safety and Consumer Policy Division,
Food Safety and Consumer Affairs Bureau,
Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries
1-2-1 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo
T: +81-3-3502-5722
F: +81-3-3597-0329
e-mail: hidetaka_kobayashi@nm.maff.go.jp

Dr Akemi Yasui
Technical adviser
National Food Research Institute
(+ 81) 3 5253-4112
e-mail: ayasui@affrc.go.jp

Dr Takahiro WATANABE
National Institute of Health Sciences
Division of Foods Section Chief
Email:tawata@nihs.go.jp

KENYA

Mr. Robert Koigi
Analytical Chemist
Kenya Plant Health Inspectorate Service
(KEPHIS)
P.O BOX 49592-00100 Nairobi
T: +254-020-3597201
F: +254- 020-3536175
e-mail:rkoigi@kephis.org

Abed Kagundu Mathagu
Senior Plant Inspector
Kenya Plant Health Inspectorate Service,
KEPHIS
Officer in charge, KEPHIS - Plant Quarantine
Station
Member to the National Biosafety Committee
(NBC)
Chairman of the Kenya Bureau of Standards
Committee on rDNA
Member: National Steering Committee on
Creation of Awareness in Biotechnology,
P.O BOX 49592-00100 Nairobi
T: +254-020-3597201
F: +254- 020-3536175
e-mail: akagundu@kephis.org

Roselida Achieng Owuor
Scientist
Senior Science Secretary
NCST KENYA
e-mail: aroselida@ncst.go.ke

Mr. George Oyamo Osanjo
Department of Pharmacology and
Pharmacognosy,
University of Nairobi
P. O. Box 30197, Nairobi
e-mail: gosanjo@yahoo.com
Tel: 0733-893296

MALASIA

Mrs. Jasbeer Kaur
Head Genetically Modified Organism (GMO)
Unit,
Biotechnology Section
Department of Chemistry Malaysia
Ministry of Science, Technology and Innovation
Jalan Sultan, 46661 Petaling Jaya, Selangor
MALAYSIA.
Tel: +603 7985 3000
Fax: +603 7985 3028
E-mail: jasbeer@kimia.gov.my;
ccp_malaysia@moh.gov.

MÉXICO

Michelle Vizueth Chávez
Codex Contact Point Mexico
e-mail: codexmex@economia.gob.mx

Sandra Patricia Piña Salinas
Inter-Secretarial Commission on
Biosafety of Genetically Modified Organisms
spina@conacyt.mx

Sol Ortiz García
Inter-Secretarial Commission on
Biosafety of Genetically Modified Organisms
sortiz@conacyt.mx

Natalhie Campos Reales Pineda
Inter-Secretarial Commission on
Biosafety of Genetically Modified Organisms
ncampos@conacyt.mx

Martha Elva Germán Sánchez
Inter-Secretarial Commission on
Biosafety of Genetically Modified Organisms
mgerman@conacyt.mx

NUEVA ZELANDIA

Dr. Paul Dansted
New Zealand Food Safety Authority
68-86 Jervois Quay
PO Box 2835 Wellington, NZ
T: +64 4 894 2500
F: +64 4 894 2501
e-mail: paul.dansted@nzfsa.govt.nz

NORUEGA

Mrs. Marianne T. Werner
Scientist
National Veterinary Institute
PoBox 750 Sentrum
T: +47 23 21 62 21
F: +47 23 21 62 01
e-mail: Marianne.werner@vetinst.no

Mr. Knut Berdal
Senior Researcher
National Veterinary Institute
PoBox 750 Sentrum
T: +47 23 21 62 21
F: +47 23 21 62 01
e-mail: knut.berdal@vetinst.no

Ms. Solbjørg Hogstad
Senior Adviser
Norwegian Food Safety Authority/
P.O.Box 383, N-2381, Brumunddal
e-mail: solbjorg.hogstad@mattilsynet.no

Ms. Astrid Nordbotten
Senior Adviser
Norwegian Food Safety Authority
P.O. Box 383, N-2381, Brumunddal
T: +4723216698
F: +4723217001
e-mail: asnor@mattilsynet.no

POLONIA

Zbigniew Sieradzki

National Veterinary Research Institute
Department of Hygiene of Animal Feeding stuffs
57 Partyzantow St., 24-100 Pulawy, POLAND
e-mail: zbigniew.sieradzki@piwet.pulawy.pl

Robert Karpinski

Meat and Fat Research Institute
4 Jubilerska St., 04-190 Warszawa, POLAND
e-mail: robert.karpinski@ipmt.waw.pl

PORTUGAL

Rogério Mendes

Investigador Auxiliar
Unidade de Valorização dos Produtos da Pesca e
Aquicultura
Instituto Nacional de Recursos Biológicos - INRB
I.P./L-IPIMAR
Av. Brasília, 1449-006 Lisboa, PORTUGAL
T:+351 21 302 70 36/ 21 302 70 00
F:+351 21 301 59 48
e-mail: rogerio@ipimar.pt

Helena Silva

IPIMAR oficial researcher.
e-mail: hsilva@ipimar.pt

REPÚBLICA ESLOVACA

Dr. Miriam Filipová

State veterinary and Food Institute
National Reference Laboratory for GMO in Food
and Feed
T:+421 43 5837 132,
F:+421 43 5837 153
e-mail: filipova@svpudk.sk

SUDÁFRICA

Malose Daniel Matlala

Deputy Director: Inter-agency Liaison and
Regulatory Nutrition
Department of Health
Directorate: Food Control
Private Bag X828
Pretoria 0001
SOUTH AFRICA
T: +27-12 312 0158
F: +27-12 312 3180
e-mail: CACPSA@health.gov.za

Ms Renusha Chanda

Assistant Director: Food Control
National Department of Health
Private Bag X828, Pretoria, 0001
South Africa
Tel: +27 12 312 3161
Fax: +27 12 312 3162
e-mail: chandr@health.gov.za

Chantal Arendse

Department of Agriculture
Tel: +012 3196199
e-mail: DB@nda.agric.za

Gillian Christians

Department of Agriculture
email: GillianC@daff.gov.za

TAILANDIA

Ms. Chanchai Jaengsawang

Expert, Department of Medical Sciences, Ministry
of Public Health
email: chanchai48@ymail.com;
chanchai@dmsc.moph.go.th

Ms. Usa Bamrungbhuet

Senior Standards officer
National Bureau of Agricultural Commodity and
Food Standards
Ministry of Agriculture and Cooperatives.
email: usa@acfs.go.th

Ms. Sasiwimon Tabyam

Standards officer
Fish and Fishery Products Standard Group
Office of Commodity and System Standards
National Bureau of Agricultural Commodity and
Food Standards
e-mail: sasiwimon@acfs.go.th

PAÍSES BAJOS

Henk Van der Schee

Food and Consumer Product Safety Authority
Hooogte Kadijk 401, 1018BK Amsterdam
T:+0031 20 5244702
F:+0031 20 5244700
e-mail:henk.van.der.schee@vwa.nl

Dr Saskia Van Ruth

Manager Research Cluster Authenticity and
Identity RIKILT - Institute of Food Safety
PO BOX 230, Wageningen 6700AE
T: +31317480250
F: +31 317 417717
e-mail: Saskia.vanruth@wur.nl

Emile Laurensse
Senior Scientist
Voedsel en Waren Autoriteit NW
Hoogte Kadijk 401
1018 BK Amsterdam
Nederland
Tel. 020 5244675
e-mail: emile.laurensse@vwa.nl

ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

Donald Kendall
*U.S. alternate delegate to the Codex
Committee on Methods of Analysis and
Sampling - Deputy Director, Technical Services
Division, U.S.DA. Grain,
Inspection, Packers & Stockyards Administration*
e-mail: Donald.C.Kendall@usda.gov

Dr. Gregory Diachenko
*Director, Division of Analytical Chemistry, Food
and Drug Administration (HFS-706)*
5100 Paint Branch Parkway College Park,
Maryland 20740
T: +01-301-436-1898
F: +01-301-436-2634
e-mail: Gregory.diachenko@fda.hhs.gov

Dr. Michael Wehr
*Food and Drug Administration Center for Food
Safety and Applied Nutrition*
5100 Paint Branch Parkway, (HFS-550), College
Park, Maryland 20740
T: +301-436-1724
F: + 301-436- 2618
e-mail: michael.wehr@fda.hhs.gov

Michael Sussman Ph.D.
Director
Field Laboratory Services
Agricultural Marketing Service/USDA
801 Summit Crossing Place, Suite B
Gastonia, NC 28054
T: 704-833-1509
e-mail: michael.sussman@usda.gov

ORGANIZACIONES GUBERNAMENTALES INTERNACIONALES

FAO

Masami Takeuchi, Ph.D
Food Safety and Quality Officer
Food Quality and Standards Service
Viale delle Terme di Caracalla 00153 Rome
ITALY
Tel : +39-06-5705-3076
Fax : +39-06-5705-4593
e-mail: Masami.Takeuchi@fao.org

IICA

Bryan Muñoz Castillo
*Hemisferic Specialist in Biotechnology and
Biosafety*
San José, Costa Rica
e-mail: Bryan.munoz@iica.int

ORGANIZACIONES NO GUBERNAMENTALES INTERNACIONALES

AOCS (American Oil Chemists' Society)

Dr. Raymond Shillito
External Coordination Manager, BioAnalytics
Bayer CropScience - BioScience
2, T.W. Alexander Drive, Durham NC 27517
Research Triangle Park NC 27709
T: +1 919 549 2210
F: +1 919 549 3907
e-mail: ray.shillito@bayercropscience.com

Dr. Richard Cantrill
*American Oil Chemists' Society Technical
Director*
2710 S Boulder Drive
Urbana IL, 61803-7190, USA
T: +1 217 693 4830
F: +1 217 351 8091
e-mail: richard.cantrill@aocs.org

BIO (Biotechnology Industry Organization)

Michael Watch

Managing Director, Science and Regulatory Affairs

Food and Agriculture Department

Biotechnology Industry Organization

1201 Maryland Avenue SW, Suite 900

Washington, DC 20024

Desk: 202-962-6645

Fax: 202-488-6301

e-mail: mwach@bio.org

Janet Collins

Government Affairs, Global Biotech Acceptance

e-mail: Janet.E.Collins@usa.dupont.com

CROPLIFE INTERNATIONAL

Dr. Craig Rickard

Director of Advocacy and Regulatory Affairs, Biotechnology

CropLife International

c/o CropLife America Offices

1156 15th Street NW, Suite 400

Washington DC, 20005

T: + 1-202-631-9737

F: + 1-202-872-3878

e-mail: craig.rickard@croplife.org

Ms. Lucyna Kurtyka

Global Lead, International Organizations,

Monsanto Company,

1300 I Street, NW, Suite 450 East, Washington,

D.C. 20005

T: +202-351-9526

F: +202-789-1748

e-mail: lucyna.k.kurtyka@monsanto.com

ICGMA

Ms. Shannon Cole

Director of Science Operations, Grocery

Manufacturers Association

1350 I Street. NW, Suite 300, Washington, DC

20005

T: +202- 639-5979

F: +202- 639-5991

e-mail: scole@gmaonline.org

Peggy S. Rochette

Director of International Affairs

Grocery Manufacturers Association (GMA)/

Secretariat ICGMA

1350 I Street NW

Washington, DC 20005

(202) 639-5921

(202) 639-5991

e-mail: prochette@gmaonline.org

prochette@fpa-food.org

IFT

Rosetta Newsome

Director, Science and Communications

Institute of Food Technologists

525 W Van Buren Suite 1000

Chicago, IL 60607

312.604.0228 Ph

312.782.8348 Fax

e-mail: rlnewsome@ift.org

ILSI

Dr. Marci Levine

Senior Staff Scientist

ILSI International Food Biotechnology Committee

Washington, DC 20005,

United States of America

e-mail: mlevine@ilsil.org

Dr. Guomin Shan

Technical Leader

Biotech Regulatory Sciences

Dow AgroSciences LLC

9330 Zionsville Road

Indianapolis, IN 46268

USA

T: +1 317 337 4118

F: +1 317 337 3235

e-mail: gshan@dow.com

ANEXO II

ANTEPROYECTO DE DIRECTRICES SOBRE CRITERIOS PARA LOS MÉTODOS DE DETECCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE SECUENCIAS ESPECÍFICAS DE ADN Y DE PROTEÍNAS ESPECÍFICAS, EN PARTICULAR EN ALIMENTOS DERIVADOS DE LA BIOTECNOLOGÍA MODERNA

[Título alternativo I:

ANTEPROYECTO DE DIRECTRICES SOBRE CRITERIOS DE RENDIMIENTO Y VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS DE DETECCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE SECUENCIAS ESPECÍFICAS DE ADN Y DE PROTEÍNAS ESPECÍFICAS EN LOS ALIMENTOS]

[Título alternativo II:

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

SECCIÓN 1 – INTRODUCCIÓN

1. Los métodos de análisis molecular e inmunológico son en la actualidad los instrumentos reconocidos para la determinación de los analitos de ADN y proteínas en los alimentos [obtenidos por medios biotecnológicos modernos]. Sin embargo, para que los resultados obtenidos por tales métodos en diferentes laboratorios obtengan amplia aceptación y confianza por su fiabilidad, es necesario que los métodos de análisis cumplan determinados criterios de calidad.
2. Estas directrices proporcionan criterios adecuados para validar el rendimiento de métodos elaborados con el fin de detectar secuencias específicas de ADN o proteínas específicas en los alimentos.
3. La información relativa a las consideraciones generales para los métodos de validación para el análisis de secuencias específicas de ADN y de proteínas específicas figura en la primera parte de las presentes Directrices. Se ponen a disposición anexos específicos que contienen información sobre definiciones, validación de métodos de PCR cuantitativos, validación de métodos de PCR cualitativos, validación de métodos basados en proteína y ensayos de aptitud.

SECCIÓN 1.1. - FINALIDAD Y OBJETIVOS

4. El objetivo de este documento es apoyar el establecimiento de métodos moleculares e inmunológicos para la detección, la identificación y la cuantificación en los alimentos [obtenidos por medios biotecnológicos modernos] de secuencias específicas de ADN y de proteínas específicas que generen resultados con reproducibilidad comparable cuando se lleven a cabo en laboratorios diferentes.
5. Las directrices van dirigidas a dar orientación sobre cómo establecer métodos para detectar e identificar secuencias de ADN y proteínas específicas en los alimentos definiendo criterios de validación adecuados y si un método cumple o no dichos criterios a partir de las características de rendimiento de un método. En las directrices se concretarán los criterios pertinentes y se explicará cómo considerar tales criterios, es decir:
 - dando la explicación para los criterios más pertinentes y
 - mostrando cómo averiguar si un método cumple o no los requisitos de los criterios de que se trate.

SECCIÓN 1.2. ÁMBITO DE APLICACIÓN

6. Las presentes directrices proporcionan información con miras a la validación de métodos para la detección, la identificación y la cuantificación de secuencias específicas de ADN y de proteínas específicas en alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos. Estas Directrices pueden también proporcionar información sobre la validación de métodos para otras secuencias de ADN y proteínas específicas de interés en otros alimentos.

6 Alternativa [Estas directrices proporcionan criterios de información para la validación de métodos de análisis de los alimentos que conlleven la detección, la identificación y la cuantificación de secuencias específicas de ADN y de proteínas específicas de interés que puedan encontrarse en alimentos y que utilizarán los laboratorios responsables del análisis de alimentos. Estos métodos pueden proporcionar planteamientos moleculares e inmunológicos para, entre otros usos, ensayos de autenticidad de alimentos y biomarcadores para alimentos que contengan material derivado de organismos de ADN recombinante.]

SECCIÓN 3 – DEFINICIONES

7. Existen algunos términos relacionados con los métodos de análisis en el Manual de procedimiento del Codex y en otras fuentes que también es posible aplicar al análisis de [secuencias de ADN y proteínas de interés en alimentos] [alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos]. En el Anexo II se presentan las definiciones propuestas de estos términos.

SECCIÓN 4 – VALIDACIÓN DE MÉTODOS

8. 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, existen pocos métodos de análisis que hayan sido validados completamente. Por lo tanto, el Codex también ratifica mediante referencias protocolos de validación de un solo laboratorio. 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 el análisis de [secuencias de ADN y proteínas] [alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos] 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.

Sección 4.1 – Enfoque por criterios

9. La Comisión del Codex Alimentarius ha aceptado el “enfoque por criterios” para los métodos de análisis. Es necesario asegurar la incorporación de este enfoque en las presentes directrices.

Sección 4.2 – Criterios generales de método

10. Los criterios convencionales adoptados por el Codex para la evaluación de los métodos de análisis son:
- conformidad
 - aplicabilidad (matriz, grado de concentración y preferencia atribuida a los métodos “generales”)
 - límite de detección
 - límite de cuantificación
 - la precisión; la repetibilidad en el mismo laboratorio, la reproducibilidad entre laboratorios (en el mismo y en otros laboratorios)
 - selectividad
 - sensibilidad
 - linealidad
 - solidez.

Sección 4.3 – Proceso de validación

11. 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.

12. 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.

13. 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 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.

SECCIÓN 5 – CONSIDERACIÓN ESPECÍFICA PARA LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE DETECCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE [SECUENCIAS DE ADN Y PROTEÍNAS] [ALIMENTOS OBTENIDOS POR MEDIOS BIOTECNOLÓGICOS MODERNOS]

Sección 5.1 – Desde la elaboración del método a la validación formal

14. Antes de que se acepte su uso, los métodos deben ser validados con objeto de garantizar su adecuación para un fin dado.

15. Las metodologías comunes para el análisis basado en el ADN (Anklam *et al.*, 2002; Poms *et al.*, 2004) son métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizados para detectar una secuencia específica (determinada) de ADN (ISO21570:2005; Asensio 2007; Holst-Jensen & Berdal, 2004; Lipp *et al.* 2005; Miraglia *et al.*, 2004). Los enfoques comunes para la proteína utilizan ELISA y mecanismos de flujo laterales (ISO21572:2004; Grothaus *et al.*, 2006). 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 que alcanzan el mismo objetivo, en caso de que se validaran adecuadamente. En el presente documento se examinan los enfoques basados en ADN y los basados en proteína.

Sección 5.1.1 – Criterios para la aceptación de los métodos (condición exigida para la validación completa)

16. 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.

17. El método será evaluado con arreglo a la información que se haya proporcionado. La evaluación debe verificar el cumplimiento de los requisitos previos de principio para utilizar el método a efectos del Codex. En esta sección se describen los criterios de aceptación del método que este debe cumplir para que se pueda llevar a cabo una validación previa y un ensayo completo en colaboración.

Sección 5.1.2 - Aplicabilidad del método

18. La aplicabilidad de los métodos podría determinarse confirmando si los métodos pueden utilizarse en los alimentos deseados con el rendimiento exigido y ello debería hacerse constar con claridad. En particular, en el análisis de las secuencias de ADN y de la proteína, un método que puede aplicarse a una sola matriz de materia prima no puede necesariamente aplicarse a las matrices complejas o a los alimentos elaborados, ya que el ADN y la proteína se desnaturalizarán con facilidad.

19. [Este es un criterio muy importante en el análisis de los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos]. En principio, el método debería ser aplicable a la matriz pertinente en el sistema del Codex. Cuando [el método se utiliza para analizar secuencias de ADN y proteínas, se debería proporcionar información] [se trata de un alimento obtenido por medios biotecnológicos en particular, es adecuado exigir a aquellos 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 [secuencias de ADN y proteínas] [alimentos obtenidos por medios biotecnológicos] en una serie de matrices de alimentos, debería haber disponible al menos un método de extracción aplicable a una matriz general de alimentos.

20. La cantidad y la naturaleza del ADN y la proteína diana medibles y presentes en los alimentos y sus ingredientes podrían verse afectadas considerablemente por las 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 deberían 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 y grano de maíz y trigo), pero 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 capacidad para detectar el ADN diana.

Sección 5.1.3 – Condición de principio

21. Los métodos basados en el ADN deberían detectar, identificar y cuantificar los niveles relativos de secuencias específicas de ADN diana específicas de cada taxón, en tanto que los métodos basados en la proteína deberían detectar y cuantificar el nivel de proteína específica en el producto.

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

22. En la ejecución del ensayo, deberían emplearse materiales de referencia que se han preparado a partir de una matriz que contenga el analito específico cuando este se encuentre disponible. Cuando no se encuentren disponibles muestras de control o materiales de referencia, podría desarrollarse y emplearse como control adecuado un plásmido que contenga las secuencias diana de ADN adecuadas y específicas al taxón si está disponible la información sobre la secuencia diana de ADN.

23. Actualmente, el método de detección basado en ADN suele consistir en la metodología de la PCR e incluye:

- un protocolo que describe un método de extracción que es aplicable a una matriz pertinente;
- 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;
- una descripción de las secuencias cebadoras del oligonucleótido que amplifican de manera inequívoca la secuencia de ADN diana;
- si procede, una descripción de las secuencias de sonda del oligonucleótido fluorescente que identifican de manera inequívoca la secuencia de ADN diana;
- una descripción de las secuencias cebadoras del oligonucleótido que amplifican una secuencia de ADN específica al taxón la cual debería estar presente en la matriz convencional del alimento independientemente de la presencia del analito específico a fin de diferenciar un resultado negativo de los procesos fallidos de extracción o amplificación y para cuantificar la cantidad del ADN diana en relación con el ADN específico al taxón;
- si procede, una descripción de las secuencias de sonda del oligonucleótido fluorescente que identifican de manera inequívoca la secuencia de ADN específica al taxón;
- una descripción del método utilizado para detectar el ADN al emplear un método basado en gel;
- muestras y normas de control apropiadas;

- descripciones de las operaciones realizadas para calcular el resultado.

24. 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.

25. La cuantificación se realiza comparando la cantidad de proteína específica encontrada en la extracción o las extracciones con la cantidad total de proteína extraíble que está presente en la extracción o el total de proteína en la matriz del alimento. Tal vez sea necesario corregir esta medida por la eficiencia de la extracción.

26. 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.

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

- los métodos basados en la proteína deberían permitir la detección, identificación o cuantificación inequívocas de un antígeno o epítipo determinado;
- los métodos de examen basados en el ADN que se utilizan para detectar múltiples incidencias de transformación deberían permitir la detección e identificación inequívocas de una secuencia diana de ADN que sea común a varias incidencias de transformación;
- los métodos basados en el ADN específicos para la diana que se utilizan para la detección o la cuantificación relativa de una sola incidencia de transformación deberían permitir la detección, identificación y cuantificación inequívocas de una secuencia diana de ADN que sea única o específica para esa incidencia de transformación;
- los métodos basados en el ADN específicos para un taxón que se utilizan para la detección o la cuantificación relativa de un ADN diana deberían permitir la detección, identificación y cuantificación inequívocas de una secuencia diana de ADN que sea única o específica para dicho taxón;
- en el caso de los métodos específicos para la diana y el taxón utilizados en la cuantificación relativa, se recomienda identificar el fragmento amplificado, por ejemplo mediante hibridación con sonda o cualquier otro método apropiado equivalente.

[27 alt. De elegirse el PCR como método analítico, el método debería orientarse a una secuencia de ADN que no esté presente en el alimento objeto de examen. Actualmente, la mejor opción en lo que respecta a la especificidad de un método en relación con una incidencia es la PCR, ya que se centra 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 de cada transformación, la relacionada con la confluencia de la inserción recombinante y el ADN genómico huésped 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.]

Sección 5.1.4 – Enfoque modular de la validación del método

28. El término “método” hace referencia a todos los procedimientos experimentales necesarios para estimar el mesurando en una matriz en particular. Para un material determinado, puede comprender los procesos para la extracción del ADN o la proteína y la cuantificación final en un sistema de PCR o ELISA, o la determinación de la presencia o ausencia del analito a través de un método cualitativo. En tal caso, toda la cadena comprendida entre la extracción y la etapa de análisis constituye un método. Sin embargo, se puede utilizar el mismo método de preparación de la muestra (por ejemplo: molido) en combinación con el mismo proceso de aislamiento del ADN o la proteína para varios análisis posteriores diferentes (Chapela *et al.*, 2007; Holst-Jensen & Berdal, 2004; Turci *et al.*, 2009) con el fin de obtener eficiencias económicas, siempre que se mantengan sin variación los procesos validados del método.

29. Resultaría inadecuado introducir procesos alternativos, como por ejemplo un proceso diferente de aislamiento del ADN o de la proteína, en un método validado sin realizar estudios adicionales para poner de manifiesto que la sustitución no afecta al rendimiento del método.

Sección 5.2 – Requisitos de las pruebas en colaboración

Sección 5.2.1 – Información general

30. 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.

31. Se deberían 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 del rendimiento y del alcance del método.

32. Para los fines del Codex, se ha adoptado la norma ISO 5725:1996 o el Protocolo armonizado AOAC/IUPAC (Horwitz, 1995). 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.

Sección 5.2.2 – Requisitos mínimos de rendimiento

33. 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 debería evaluar el cumplimiento de los criterios de sensibilidad, repetibilidad o reproducibilidad, las desviaciones típicas y la conformidad.

34. Además de los criterios de aceptación del método, se deberían 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.

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

Sección 5.2.3 – Materiales del ensayo en colaboración

36. 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.

37. Los efectos de los materiales o de las matrices sobre la fase de extracción de un protocolo son importantes para cualquier análisis. Cuando se comunican los resultados de un estudio de validación es importante que el informe incluya detalles de la matriz analizada e indique si se empleó una proteína o un ADN purificado como diana del análisis.

Sección 5.2.4 – Información específica sobre la validación de los métodos

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

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

Sección 5.3 – Unidad de medida

40. Deberían especificarse las unidades adecuadas de medida (por ejemplo: número de copias de la diana por mg de alimento, equivalentes molares, etc.), los criterios de rendimiento y de comunicación de los datos para cada método antes de su uso. Para los análisis cualitativos, los resultados pueden darse como presente (+) o ausente (-), no habiendo por tal motivo unidad de medida.

41. Las mediciones se pueden expresar explícitamente como peso/peso o por porcentaje relativo. Sin embargo, en ninguno de los métodos actuales (basados en el ADN o en proteína) se pueden hacer estas mediciones directamente. En el caso de un método basado en el ADN utilizado para cuantificar un ADN específico, se suele tener la posibilidad de medir los equivalentes del genoma. Obsérvese que estos pueden registrar la influencia de algunos factores biológicos (Grothaus *et al.* 2007; Holst-Jensen & Berdal, 2004), en función de la parte de la semilla utilizada originalmente para la preparación de la harina o de otros componentes del alimento (por ejemplo: endosperma, germen) y de si se retiene en esa porción el ADN o la proteína. Los métodos basados en proteína miden la cantidad de una proteína en particular que está presente y pueden verse influidos por la eficiencia en la extracción.

Sección 5.4 – Incertidumbre de la medición

42. Según se menciona en las Directrices del Codex sobre la incertidumbre de la medición (CAC/GL54-2004), se exige que los laboratorios calculen la incertidumbre de sus mediciones cuantitativas. La preparación de la muestra y los métodos analíticos constituyen dos fuentes importantes de error que deberían 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.

43. Para obtener mayores detalles se pueden consultar las Directrices del Codex sobre la incertidumbre de la medición (CAC/GL54-2004), y la parte titulada *Utilización de resultados analíticos: planes de muestreo, relación entre los resultados analíticos, la incertidumbre en la medición, los factores de recuperación y las disposiciones de las normas del Codex* en el Manual de procedimiento del Codex y Trapman *et al.*, (2009).

SECCIÓN 6 – REQUISITOS SOBRE EL CONTROL DE CALIDAD

Sección 6.1 – Calidad de los laboratorios

44. 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 las secuencias y proteínas del ADN] [de los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos].

45. Se exige que los laboratorios observen prácticas de control de calidad normalizadas con el fin de evitar la contaminación cruzada de material, que podría dar lugar a resultados positivos falsos. Se dispone de varios ejemplos al respecto (Dieffenbach & Dveksler, 1993; Kwok & Higuchi, 1989; Mifflin, 2007; Newton, 1995). Otras orientaciones pertinentes para los métodos basados en el ADN pueden constituir las normas ISO 21569:2005 e ISO 21570:2005.

Sección 6.2 – Orientación sobre la organización y el funcionamiento de los laboratorios

46. Los métodos basados en el ADN para el análisis de [secuencias y proteínas del ADN] [alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos] exigen un instrumental y técnicas de manipulación específicas que difieren de la mayor parte de los métodos químicos analíticos. El uso de métodos basados en ADN aumenta consistentemente en otras áreas de detección, como la microbiología de los patógenos de los alimentos. Es necesario facilitar información e instrucciones sobre las diferencias esenciales en la organización de los laboratorios y en las técnicas de manipulación. Se dispone de ejemplos al respecto (ISO/DIS 24276:2006).

47. Los métodos de análisis inmunológico (basados en proteína) son bien conocidos, se usan en muchos laboratorios para diferentes análisis y a menudo tienen forma de *kit*, lo que facilita su utilización; no obstante, se deberá observar que los límites de la detección basada en proteína son inferiores a los de los métodos basados en ADN.

48. Además del tema de la contaminación cruzada estudiado en la sección anterior, se recomienda el cumplimiento de las directrices mínimas necesarias sobre bioseguridad (OMS, 2004).

Sección 6.3 – Material de referencia

49. Normalmente, se exige un material de referencia adecuado para validar un método. Se pueden utilizar diferentes matrices para elaborar materiales de referencia o normas de funcionamiento para los métodos de detección de [secuencias y proteínas de ADN] [alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos]. Cada una de ellas tiene sus propias ventajas e inconvenientes para cada fin. La forma física del material de referencia determina su adaptabilidad para ser usado 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 a la eficiencia de extracción de la proteína diana o del ADN y a la reproducibilidad del método, debido a un error de muestreo.

50. Al analizar secuencias de ADN vegetal específicas de la diana y del taxón, se recomienda utilizar un material de referencia preparado a partir de material 100 % homogéneo o con un nivel certificado de cigocidad, de ser esto posible. Sin embargo, otros materiales podrían ser adecuados, en función de cada caso.

51. 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.

52. Cuando no estén disponibles materiales de referencia adecuados, se podría recurrir a materiales de control de calidad procedentes de sistemas de comprobación de la competencia o del uso de ADN plásmido o amplicón. El empleo de ADN plásmido o amplicón exige la atenta consideración de la elección del ADN específico de la diana o del taxón que va a incorporarse en el plásmido o el amplicón con el fin de asegurar que el ADN plásmido o amplicón corresponda a la finalidad requerida.

SECCIÓN 7 – REFERENCIAS

Allmann M, Candrian U, Hoefelein C y Luethy J (1993). Polymerase Chain Reaction (PCR): a possible alternative to immunochemical methods assuring safety and quality of food. *Lebensm. Unters. Forsch* 196:248-251.

Anklam E, Gadani F, Heinze P, Pijnenburg H y Van den Eede G (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.

- Asensio L (2007). Review: PCR-based methods for fish and fishery products authentication. *Trends in Food Science & Technology* 18(11): 558-566.
- Asensio L, Gonzalez I, Garcia T y Martin R (2008). Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control* 19:1-8.
- Carnegie, PR (1994). Quality control in the food industries with DNA technologies. *Australas. Biotechnol.* 4(3):146-9.
- Chapela MJ, Sotelo CG, Pérez-Martín RI, Pardo MA, Pérez-Villareal B, Gilardi P y Riese J (2007). Comparison of DNA extraction methods from muscle of canned tuna for species identification. *Food Control.* 18(10):1211-1215
- Manual de Procedimiento de la Comisión del Codex Alimentarius (17.^a edición). Utilización de 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.
- CAC/GL 54-2004. Directrices del Codex sobre la incertidumbre de la medición.
- Colgan S, O'Brien LO, Maher M, Shilton N, McDonnell K y Ward S (2001). Development of a DNA-based assay for species identification in meat and bone meal. *Food Research International* 34(5):409-414.
- Dahinden I, von Büren M y Lüthy J (2001). A Quantitative competitive PCR system to detect contamination of wheat, barley or rye in gluten-free food for coeliac patients. *European Food Research and Technology* 212(2):228-233.
- Dieffenbach CW y Dveksler GS (1993). Setting up a PCR laboratory. *PCR Methods Appl.* 3(2):S2-7.
- ISO 5725:1996 Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results. Ginebra: Organización Internacional de Normalización.
- ISO 21569:2005 Foodstuffs - Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - Qualitative nucleic acid based methods. Ginebra: Organización Internacional de Normalización.
- ISO 21570:2005. Foodstuffs - Methods for the detection of genetically modified organisms and derived products - Quantitative nucleic acid based methods. Ginebra: Organización Internacional de Normalización.
- ISO/DIS 24276:2006. Foodstuffs - Nucleic acid based methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - General requirements and definitions. Ginebra: Organización Internacional de Normalización.
- ISO/IEC Standard 17025:2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Ginebra: Organización Internacional de Normalización.
- Grothaus GD, 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, pp 780-786.
- Holst-Jensen A. y Berdal KG (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):927-36.
- Horwitz E. ISO/AOAC/IUPAC Harmonized Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies (1995). *Pure and Applied Chemistry* 67:331-343.
- Kwok S e Higuchi R (1989). Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339(6221):237-238.

- 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):36-155.
- Meyer R, Candrian U (1996). PCR-based DNA Analysis for the Identification and Characterization of Food Components. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. 29(1-2):1-9.
- Mifflin TE (2007) Setting Up a PCR Laboratory. *Cold Spring Harbor Protocols* 14 (doi:10.1101/pdb.top14)
- Miraglia M, Berdal KG, Brera C, Corbisier P, Holst-Jensen A, Kok EJ, Marvin HJP, Schimmel H, Rentsch J, van Rie JPPF y Zagon J (2004). Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. *Food and Chemical Toxicology* 42:1157-1180.
- Newton CR, Herbitter A y Gubler U (1995). PCR: Essential Data. Hoboken (NJ): J. Wiley & Sons.
- Olexova L, Dovičovičová L, Švec M, Siekel P, Kuchta T. (2006). Detection of gluten-containing cereals in flours and “gluten-free” bakery products by polymerase chain reaction. *Food Control* 17(3):234-237 .
- Poms, RE; Klein CL, Anklam E (2004). Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Addit. Contam.* 21(1):1-31.
- Trapmann S, Burns M, Broll H, Macarthur R, Wood RKS, Žel Jana (2009). Guidance document on measurement uncertainty for GMO testing laboratories. *EUR - Scientific and technical research series*. Luxemburgo: Oficina de Publicaciones Oficiales de las Comunidades Europeas.
- Turci M, Sardaro MLS, Visioli G, Maestri E, Marmiroli, M y Marmiroli N (2010). Evaluation of DNA extraction procedures for traceability of various tomato products. *Food Control*. 21(2):143-149.
- Williams R. (2005). Gene tests served up to tell fine foods from fakes. *Nature* 434:262.
- WHO (2004). Laboratory Biosafety Manual, 3rd Edition. Ginebra: Organización Mundial de la Salud.
- Woolfe M y Primrose S (2004). Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trends in Biotechnology* 22(5):222-6.

ANEXO I: INFORMACIÓN REQUERIDA CUANDO SE ESTUDIA EL USO DE LOS MÉTODOS

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1. 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

2. El propósito del método debería indicarse en el mismo. El método debería ser adecuado para la finalidad buscada.

Base científica

3. 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).

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

4. Las técnicas basadas en ADN y proteína empleadas para detectar y cuantificar [secuencias y proteínas de ADN] [los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos] 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 el ADN diana 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.

5. Si el cálculo de los resultados depende de una relación matemática, se debería indicar y registrar este hecho (por ejemplo, el método $\Delta\Delta Ct$ 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.

INFORMACIÓN ESPECÍFICA EXIGIDA PARA LOS MÉTODOS BASADOS EN EL ADN

6. Se debería proporcionar, en particular, la siguiente información adicional para los procedimientos basados en ADN:

- *Longitud de amplicón*

7. 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 específica al taxón y la secuencia diana deberían tener un tamaño similar.

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

8. 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.

9. 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 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.

10. 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.

11. Si se toman todas las diferencias en consideración, no es adecuado 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.

12. 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 múltiple de la PCR*

13. La utilización de más de un conjunto cebador en una sola reacción se denomina PCR múltiple. La finalidad de este tipo de enfoque es reducir los costos y el tiempo para el análisis de diferentes dianas en una única muestra.

14. La información facilitada debería demostrar la solidez del método para la posibilidad de transferencia entre laboratorios. Con esto se quiere decir que el método debería haber sido objeto de comprobación por otro laboratorio, como mínimo, además del que lo ha desarrollado. Éste es un requisito importante para el éxito de la validación del método.

INFORMACIÓN ESPECÍFICA EXIGIDA PARA LOS MÉTODOS BASADOS EN PROTEÍNA

15. Se debería proporcionar la siguiente información adicional para los procedimientos basados en proteína:

Aplicabilidad del ensayo

16. La elaboración de alimentos llevará generalmente al deterioro o desnaturalización de la proteína diana, lo que puede dar lugar a un cambio sustancial en la inmunorreactividad. Los inmunoensayos deberían ser objeto de evaluación en cuanto a su aplicabilidad en los productos elaborados de que se trate. Se deberían proporcionar resultados prácticos de la prueba de aplicabilidad del método para los alimentos elaborados de que se trate.

Efecto de gancho

17. En un dispositivo de flujo lateral y en un ensayo sobre placa basado en anticuerpos, un efecto de gancho (de saturación) podría dar lugar a un falso resultado negativo. Es necesaria una demostración exhaustiva de que la gama de concentración de la prueba cubre cómodamente la necesidad práctica de muestras diana del análisis. Por tanto, se deberían facilitar resultados prácticos de ensayos del efecto gancho en matrices diana.

Método de confirmación

18. En el caso de un inmunoanálisis cuantitativo, los anticuerpos pueden presentar una reacción cruzada con otras proteínas presentes en la matriz; por tanto, es necesario demostrar la credibilidad de los ensayos. Pueden emplearse otros métodos, como HPLC, LC/MS, transferencia de proteínas o ensayo biológico, en calidad de confirmación. Pueden facilitarse resultados experimentales de ambos métodos con alícuotas de las mismas muestras analíticas de concentración conocida.

INFORMACIÓN ACERCA DE LA OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO

Pares de cebadores

19. En los métodos generales se deben proporcionar los pares de cebadores definidos y la secuencia a la que se dirigen, así como conjuntos diferentes de cebadores, si están disponibles. Se deben especificar claramente recomendaciones sobre la eficiencia o el uso del conjunto de cebadores, en particular si se pueden examinar o cuantificar.

Comprobación de la selectividad

20. El método debe ser claro sobre el uso de controles negativos adecuados, como el material de origen animal y vegetal, las cepas diferentes o la secuencia diana que debería emplearse con este fin, si se han definido.

21. Se deberían proporcionar los resultados prácticos de la comprobación del método con material de ADN procedente de especies o variedades no diana y de especies o variedades de referencia. Este ensayo debería incluir los materiales relacionados estrechamente y casos en que los límites de la sensibilidad se comprueben realmente. Además, podría ser adecuado, especialmente para el ADN específico al taxón, comprobar otras fuentes de alimentos similares para reducir la posibilidad de obtener un falso resultado positivo.

22. Asimismo, para los métodos de proteína, se deberían facilitar resultados prácticos de la comprobación del método con proteínas de especies/variedades/rasgos no diana y estrictamente pertinentes, así como de proteína diana purificada o de materiales positivos de control.

Comprobación de la estabilidad

23. 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 específico al taxón o la estabilidad de expresión de la proteína.

24. Para los métodos de proteína se deberían proporcionar resultados prácticos de la comprobación de los métodos con material diana y sus productos derivados o elaborados, según corresponda, para demostrar la estabilidad de la forma inmunorreactiva de la proteína.

Comprobación de la sensibilidad

25. Se deben proporcionar los resultados prácticos de la comprobación del método con distintas concentraciones para comprobar la sensibilidad del método. Se deben proporcionar los resultados empíricos de la comprobación del método con distintas concentraciones para comprobar la sensibilidad del método. Se deberían definir límites de detección utilizando muestras que solo comprendan ingredientes únicos. 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. Este efecto de disolución dependerá de la cantidad relativa de ADN específico al taxón (por ejemplo: ADN procedente de la soja) que se encuentre en el total de ADN después de la extracción a partir del producto alimentario. 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.

26. Los límites de detección deberían determinarse para cada método por separado.

27. En el caso de los análisis basados en proteína, el límite de detección debería comprobarse de acuerdo con procedimientos establecidos para los análisis inmunológicos de cada matriz.

Comprobación de la solidez

28. 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

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

Eficiencia de extracción

30. Se deberían proporcionar los resultados prácticos de las pruebas de la eficiencia de extracción sobre el método de la proteína para demostrar que la extracción es suficiente y reproducible. En el caso de la detección cuantitativa, tal vez sea necesario proporcionar el método de calibración para la extracción incompleta.

APLICACIÓN PRÁCTICA DEL MÉTODO

Aplicabilidad

31. 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

32. El equipo necesario para aplicar el método se debe indicar claramente, en relación con el propio análisis y la preparación de las muestras. También debería proporcionarse información sobre los costos, las dificultades prácticas y cualquier otro factor que pueda ser de importancia para los operadores.

Diseño de los experimentos

33. Se deben incluir el diseño del experimento y detalles sobre el número de muestras, réplicas, diluciones, etc.

Habilidades que deben poseer los operadores

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

CONTROLES ANALÍTICOS

35. 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.

36. Deberían declararse los elementos siguientes:

- Clases de controles analíticos utilizados:
 - i. controles positivos y negativos;
 - ii. el control interno utilizado, si procede (competitivo o no competitivo);
 - iii. otras clases de controles, como el de matriz (para confirmar que se añadió una muestra a la PCR) o la elaboración de la extracción;
- Muestras de control
- Materiales de referencia utilizados.

VALIDACIÓN Y RENDIMIENTO DEL MÉTODO

37. 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, eficiencia de extracción y paralelismo o linealidad) y una evaluación de que los métodos serán adecuados para el fin.

ANEXO II: DEFINICIONES APLICABLES AL ANÁLISIS DE [LAS SECUENCIAS Y PROTEÍNAS DE ADN] [LOS ALIMENTOS OBTENIDOS POR MEDIOS BIOTECNOLÓGICOS MODERNOS]

Exactitud

La exactitud se define como el grado de concordancia entre el resultado de un ensayo o la medición del resultado y el valor verdadero. 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.

Ensayo

Operación técnica que consiste en la determinación de uno o más rasgos de un producto, proceso o servicio de acuerdo con un procedimiento específico.

Aplicabilidad

Los analitos, matrices y concentraciones para los cuales puede utilizarse un método de análisis³.

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.

Autenticación

Confirmación de la fuente biológica del material de la prueba.

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 veracidad.

Identificación

Conjunto de operaciones que tiene por finalidad decidir que el objeto es el especificado.

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 veracidad, según lo demostrado por las validaciones⁴ satisfactorias realizadas mediante ensayos en colaboración o en un único laboratorio⁵. También se puede tomar el último valor con datos fiables para determinar el límite de cuantificación.

Linealidad

La capacidad de una prueba para obtener resultados (dentro de una gama dada) que varían de manera directamente proporcional a los cambios en la concentración (cantidad) del analito de la muestra o mediante una transformación matemática bien definida.

³ Ligeramente modificada con respecto a la definición proporcionada en el documento Codex CX/MAS 02/4: Anteproyecto de Directrices para la evaluación de métodos de análisis aceptables. Versión de noviembre de 2002.

⁴ Por ejemplo Thompson et al. 2002. IUPAC Technical Report: Harmonised guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. Pure Appl. Chem. 74(5): 835-855.

⁵ Ligeramente modificado con respecto a EN/ISO 24276:2006 (E).

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 especificado⁶.

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

Precisión

El grado de concordancia entre los resultados independientes de ensayos o mediciones independientes obtenidos en condiciones establecidas.

Material de referencia

Material o sustancia que tiene valores de una o más propiedades que son suficientemente homogéneos y bien conocidos como para permitir su uso en la calibración de un aparato, evaluando un método de medición y la atribución de valor a otros materiales.

Desviación típica de la repetibilidad

La desviación típica 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 tiempo⁷.

Desviación típica de la reproducibilidad

La desviación típica de los resultados de las pruebas obtenidos en condiciones de reproductibilidad. Las condiciones de reproductibilidad son aquellas 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 equipos⁸.

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 normalmente⁹.

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.

⁶ Adoptado de EN/ISO 24276:2006 (E).

⁷ Definiciones adoptadas a partir de ISO 3534-1.

⁸ Definiciones adoptadas a partir de ISO 3534-1.

⁹ Definición adoptada a partir del tema Q 2 A de la ICH “Validación de métodos de análisis: definiciones y terminología”. Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos. CPMP/ICH/381/95. Versión de noviembre de 1994. <http://www.emea.eu.int/pdfs/human/ich/038195en.pdf>

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.

Conformidad

La conformidad se define como el grado de coincidencia entre la media de un número infinito de valores repetidos de una cantidad medida y un valor de cantidad de referencia.

Nota: La medida de la conformidad suele expresarse en términos del sesgo o la proporción del promedio de un número infinito de valores repetidos de una cantidad medida con referencia a un valor de cantidad en este sector de análisis.

La conformidad se ha definido también como “exactitud de la media”. No se recomienda este uso.

En la práctica, se sustituye el valor aceptado de referencia por el valor verdadero.

La expectativa es el valor esperado de una variable aleatoria, p.ej. su valor asignado o promedio a largo plazo (ISO 5725-1).

Incertidumbre

Parámetro, asociado con el resultado de una medición, característico de la dispersión de los valores que podrían atribuirse razonablemente al resultado midiendo la magnitud.

ANEXO III: VALIDACIÓN DE UN MÉTODO CUANTITATIVO DE PCR

INTRODUCCIÓN

1. 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, y en ese caso debe especificarse la longitud mínima del segmento que puede medirse instrumentalmente). Las operaciones de elaboración de alimentos (por ejemplo: por el calor, las enzimas y el corte mecánico) pueden dar como resultado el deterioro o la reducción en la cantidad total de ADN. Los métodos deberían concebirse preferiblemente para amplificar secuencias de ADN diana o específicas al taxón relativamente cortas.

2. A menudo, los resultados de una determinación se expresan en forma de porcentaje de una secuencia de ADN específica de la diana en relación con una secuencia de ADN específica del taxón. En este tipo de ensayo cuantitativo, esta medición atañe en realidad a dos determinaciones basadas en la PCR: la de la secuencia de ADN específica de la diana (por ejemplo, una secuencia de ADN de otra especie) y la del endógeno, o secuencia específica del taxón (por ejemplo, una secuencia endógena de genes de maíz). Las dos determinaciones tienen sus propias incertidumbres y las dos podrían tener características de medición diferentes. En la mayor parte de aplicaciones, la secuencia de ADN de la diana estará presente en concentraciones bajas y la secuencia de ADN específica del taxón 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 deberían tomar en consideración estos factores para validar el método. Los resultados se pueden comunicar en otras unidades de medida, como los números de copias.

3. La consecuencia es que el análisis de ADN, especialmente en los alimentos elaborados, tiene por objeto detectar una cantidad muy pequeña de ADN específico de la diana, a menudo del orden de nanogramos/gramo o inferior. El resultado de un análisis cuantitativo de PCR se expresa a menudo en porcentaje como cantidad relativa del ADN diana con respecto a la cantidad total de ADN del taxón o especie de comparación en una determinada matriz de alimentos. La matriz de alimentos puede también contener cantidades importantes de ADN de otras muchas especies o taxones.

4. La validación de los métodos tiene dos etapas. La primera es una validación interna de todos los parámetros mencionados anteriormente excepto la reproductibilidad. La segunda es un ensayo en colaboración, cuyo principal resultado es la medición de la repetibilidad y la reproductibilidad 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, solo 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 entre laboratorios. Es importante indicar que el método debe ser validado en las mismas condiciones en las que se empleará en el futuro.

VALIDACIÓN

5. 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.

6. 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 conformidad, 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 estos se expresan.

7. *Nota: 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. Son aceptables los cálculos en peso y número de copias siempre que esto se exprese claramente al comunicar los resultados.*

8. 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 de la referencia y de la diana. Se enumeran por orden alfabético, no necesariamente en orden de importancia.

Conformidad

9. Al igual que para cualquier método, la conformidad de un método debería determinarse comparando resultados de análisis de un material de referencia con el valor conocido o asignado para dicho material de referencia. Debería tenerse en cuenta la repercusión de los efectos de la matriz de muestra, particularmente cuando esta difiere de la del material de referencia.

10. *Recomendación: La conformidad debe estar comprendida en $\pm 25\%$ 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.*

Aplicabilidad

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

12. Como ejemplo, se exige de un método de extracción, independientemente de la matriz a la que vaya a ser aplicado, que contenga ADN o proteína en suficiente cantidad, integridad estructural y pureza 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 o la detección de la proteína) (por ejemplo, Chapela et al. 2007; Turci et al. 2009).

13. En el análisis en tiempo real de la PCR, los valores Ct se pueden usar para estimar la eficiencia de la PCR. La eficiencia se puede comprobar, por ejemplo, estableciendo una serie de diluciones del ADN molde y determinando el valor Ct (el umbral de número de ciclos en el que la señal de fluorescencia que se mide cruza un valor umbral entre diluciones establecido por el usuario) para cada dilución. En la situación ideal, cuando la eficiencia de la amplificación es 100 %, una reducción doble en cantidad del ADN molde agregado a la PCR dará como resultado un incremento del valor Ct en uno. Por tanto, si el ADN se diluye 10X, la diferencia teórica en valores Ct entre ADN diluido y sin diluir debería aproximarse a 3,32. Los datos teóricos tal vez no se alcancen 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 (Cankar et al. 2006). Así sucede igualmente para las reacciones finales de la PCR realizadas utilizando cebadores fluorescentes.

Rango dinámico - rango de cuantificación

14. El alcance los métodos define el intervalo de concentración en el que se podrá determinar el analito con fiabilidad. La cantidad relativa de ADN específico del taxón con respecto al total en el extracto de ADN variará en función de si el ADN se extrajo de un solo ingrediente o de una matriz compleja de alimentos. Se debería 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 debería demostrar que la relación entre la respuesta y la concentración es continua, reproducible y lineal, después de la transformación apropiada.

15. El rango de un método cuantitativo específico de la diana puede variar desde un valor próximo a cero hasta el 100 % en relación con el ADN específico del taxón (p/p). Sin embargo, es común validar un método para un intervalo de concentraciones que sea pertinente 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). Aunque resulte fácil establecer una norma nominal de 100 %, es difícil general con fiabilidad soluciones normalizadas inferiores a 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 fiable (Huebner *et al.*, 2001; Horwitz, 1995; Kay & Van den Eede, 2001).

16. Si se elige el ADN para utilizarlo como calibrador, es importante que el mismo pueda ser rastreado (en el sentido metrológico) hasta una referencia del orden metrológico más elevado como, por ejemplo, un material de referencia certificado. El rango se determinará confirmando que el procedimiento de PCR proporciona un grado aceptable de linealidad y conformidad cuando se aplica a muestras que contienen cantidades de analito comprendidas dentro del rango especificado del procedimiento o en sus límites.

17. 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

18. Si la validación del ensayo cuantitativo de PCR muestra que el ensayo es capaz de medir [el ADN] [los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos] al (por ejemplo) 0,1 % con conformidad y precisión aceptables, a menudo no es necesario determinar los límites de detección y cuantificación, ya que el método solo se aplica por encima del rango en el que estos parámetros son pertinentes. 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.

19. 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.

20. Si es necesario disponer del límite de detección, es práctica corriente asumir que este equivale a la fuerza de la señal de una muestra testigo aumentada en tres veces la desviación típica 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 inferior al 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, este 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). En combinación con el porcentaje de falsos resultados positivos, son los únicos parámetros necesarios para cualquier método cualitativo, aparte de la selectividad y la repetibilidad.

21. 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. Es necesario determinar el límite de cuantificación experimentalmente, ya que la medición de la distribución para la PCR cuantitativa no suele distribuirse. 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 típica 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 carezca de importancia. 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.

22. 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 (como ± 2 SD desde el dato de calibración más bajo, etc.). 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 debería 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 del analito. 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 [las secuencias o proteínas de ADN] [los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos].

Practicabilidad

23. Se debería demostrar la practicabilidad del método.

Desviación típica de la repetibilidad

24. *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 típica de la reproducibilidad

25. *Recomendación: La desviación típica 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

26. 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 pertinentes. 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.

27. 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, si procede).

Sensibilidad

28. Para un método cuantitativo de PCR, se debe obtener una relación lineal del valor Ct como una función del logaritmo de la concentración del molde 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 %.

29. Además de informar sobre los parámetros de la curva, se propone definir qué rango de pendiente resulta aceptable a fin de realizar la cuantificación, ya que también es importante calcular la eficiencia de la reacción. (Por ejemplo, -2,9 a -3,3 para la detección de ADN o los valores óptimos correspondientes, que indican una eficiencia de la amplificación cercana a 100 %).

30. En los casos en los que un laboratorio emplee el método Δ CT en lugar 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

31. La especificidad diana del análisis del ADN diana debería demostrarse proporcionando pruebas experimentales al respecto. Dicha demostración debería incluir muestras que contengan el ADN diana y muestras en las que se comprueben realmente los límites de la detección (en caso de ser adecuados para el rango dinámico). Puesto que el método debería ser específico para el ADN diana, solo debería dar un resultado positivo con una matriz de alimentos que contenga el ADN diana.

32. Un ensayo específico de un taxón no debería reconocer ninguna secuencia correspondiente a especies relacionadas filogenéticamente y debería dar valores Ct similares, no diferentes estadísticamente, cuando se amplifican cantidades iguales de ADN de variedades o cultivares diferentes de orígenes muy distintos del mismo taxón.

33. Un ensayo específico de una especie no debería reconocer ninguna secuencia correspondiente a especies relacionadas filogenéticamente y debería dar valores Ct similares, no diferentes estadísticamente, cuando se amplifican cantidades iguales de ADN de variedades o cultivares diferentes de orígenes muy distintos de la misma especie.

34. La adecuación del ensayo debe ser analizada método por método.

35. El punto de partida de un método es el diseño de cebadores y sondas. Los cebadores y las sondas deberían comprobarse con respecto a la secuencia conocida de la diana para cuya detección se ha concebido el ensayo y con respecto a conjuntos de datos de secuencias pertinentes en busca de posibles homólogos o con respecto a secuencias de organismos o de patógenos diana conocidos. Tras la realización de tal evaluación teórica de la especificidad, se debería demostrar la selectividad experimentalmente.

36. Para los ensayos específicos del ADN diana. Las pruebas experimentales de la especificidad del ADN diana deberían comprender los siguientes elementos:

- Ensayos de al menos diez muestras de diferentes lotes de alimentos o ingredientes que carezcan de secuencias del ADN diana, aunque las muestras deberían contener ADN específico del taxón. Todos estos ensayos deberían tener un resultado negativo. Por ejemplo, si el ADN diana corresponde a una transformación específica de una planta de ADN recombinante, podrían tomarse muestras de otras incidencias de transformación (no correspondientes a la diana), así como de plantas de ADN no recombinante que pertenezcan a la misma especie vegetal.
- Debería someterse a ensayo una muestra de cada fuente (un número apropiado de muestras de ADN).
- Deberían analizarse dos réplicas para cada muestra de ADN, que darán resultados dentro de un valor Ct de 0,5.

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

38. Para los ensayos sobre secuencias endógenas (específicas del taxón) de ADN. Las pruebas experimentales de especificidad para los ensayos sobre secuencias endógenas o específicas del taxón deberían incluir los elementos siguientes:

- Ensayos de un mínimo de diez muestras de diferentes lotes de alimentos o ingredientes procedentes de organismos pertenecientes al taxón de interés, pero clasificados en distintos subtaxones. Todos estos ensayos deberían tener un resultado positivo. Por ejemplo, si la especificidad del taxón se corresponde presuntamente con una especie vegetal como el maíz, las muestras podrían corresponder a variedades de maíz con diferentes orígenes genéticos.
- Ensayos de un mínimo de diez muestras de diferentes lotes de alimentos o ingredientes similares procedentes de organismos no pertenecientes al taxón de interés, que pueden estar presentes en las matrices de alimentos pertinentes. Todos estos ensayos deberían tener un resultado negativo. Por ejemplo (y continuando con el ejemplo anterior), si los diez ensayos primeros se aplicaron a distintas

harinas de maíz, en el segundo grupo de ensayos podría resultar adecuado someter a prueba harinas de trigo, soja o arroz.

- Debería someterse a ensayo una muestra de cada fuente (un número apropiado de muestras de ADN).
- Deberían analizarse dos réplicas para cada muestra de ADN, que darán resultados dentro de un valor Ct de 0,5.

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

REFERENCIAS DEL ANEXO III

AOAC (2002). International Methods Committee: Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis.

Cankar K, Štebih D, Dreo T, Žel J, Gruden K (2006). Critical points of DNA quantification by real-time PCR-effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnol.* 6(37).

Horwitz E. ISO/AOAC/IUPAC Harmonized Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies (1995). *Pure and Applied Chemistry* 67:331-343.

Huebner P, Waiblinger HU, Pietsch K and Brodmann P (2001). Validation of PCR methods for quantitation of genetically modified plants in food. *Journal of AOAC International* 84(6):1855-1864.

Kay S y Van den Eede G (2001). The limits of GMO detection. *Nature Biotechnology* 19(5):504.

ANEXO IV – CRITERIOS ANALÍTICOS DE ACEPTACIÓN DE LOS CONTROLES, COMPROBACIÓN DE LA APTITUD E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS PARA LOS MÉTODOS CUANTITATIVOS DE PCR

1. 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.

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

- La media de las réplicas del control diana positivo del ADN en una concentración pertinente se desvía menos de 3 desviaciones típicas 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 \leq LD (por tanto, es importante determinar siempre el límite de detección para la validación del método). 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 lugar 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 este como sea posible.

3. Para aceptar el resultado de una muestra desconocida, la desviación típica relativa de las réplicas de la muestra debería ser \leq 35 % o un valor tan cercano a este como sea posible.

4. El proceso de amplificación utilizado en las determinaciones cuantitativas de PCR comienza a menudo con pequeños números de copias del ADN diana y el proceso de toma de muestras en esta fase inicial, junto con la naturaleza logarítmico-lineal de la función de calibración de la PCR, lleva a un sesgo positivo en los resultados. Como estaba previsto, los resultados del estudio siguen de manera coherente una distribución con un sesgo positivo (Thompson et al., 2006). 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 normal. La consecuencia de los sistemas de comprobación de la aptitud se resume en la publicación *RSC Analytical Methods Committee Technical Brief 18*.

REFERENCIAS DEL ANEXO IV

RSC Analytical Methods Committee Technical Brief 18 [en línea].
http://www.rsc.org/images/brief18_tcm18-25962.pdf.

Thompson M, Ellison SR, Owen L, Mathieson K, Powell J, Wood R y Damant AP (2006). Scoring in Genetically Modified Organism Proficiency Tests Based on Log-Transformed Results. *Journal of AOAC International* 89(1): 232- 239.,

ANEXO V: VALIDACIÓN DE UN MÉTODO CUALITATIVO DE PCR

Introducción

1. Un método cualitativo de PCR debería 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 a fin de describir la exactitud y la precisión de un ensayo cualitativo, para los ensayos microbiológicos (AOAC 2002). 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.

2. 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 veracidad 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

3. 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:

$$\% \text{ falsos resultados positivos} = \frac{\text{número total de muestras de ensayo negativas}}{\text{número total de muestras de ensayo negativas [incl. mal clasificadas]}}$$

Tasa de falsos resultados negativos

4. 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:

$$\% \text{ falsos resultados negativos} = \frac{\text{número total de muestras de ensayo negativas}}{\text{número total de muestras de ensayo positivas [incl. mal clasificadas]}}$$

Nota: algunos sectores emplean definiciones diferentes.

5. Para demostrar la tasa de falsos resultados negativos de un ensayo cualitativo, se debe analizar una serie de muestras con una concentración constante y conocida de material positivo en un conjunto de material negativo 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 lleva a la conclusión de que el nivel de falsos resultados negativos está por debajo del 4,5 % con un nivel de confianza del 99 % para la concentración objeto del ensayo.

Solidez

6. Como ocurre con todos los métodos validados, se deberían realizar esfuerzos razonables para demostrar la solidez del ensayo. Para ello, es necesario optimizar e investigar cuidadosamente la repercusión que tiene la introducción de pequeñas modificaciones en el método por razones técnicas.

Aplicabilidad

7. En el caso de los métodos cualitativos de PCR que emplean geles como método de obtención de datos, es aconsejable utilizar, si es posible, los métodos con niveles muy superiores a los límites de detección con el fin de asegurar que la interpretación de los datos sea fácil y tan objetiva como sea posible.

REFERENCIAS DEL ANEXO V

AOAC (2002). Official Methods Program Manual, Appendix X p14f. *AOAC International* [en línea]
<http://www.aoac.org/vmeth/omamannual/htm>.

ANEXO VI: VALIDACIÓN DE UN MÉTODO BASADO EN PROTEÍNA ENSAYO CUANTITATIVO

1. Los inmunoensayos cuantitativos se emplean para determinar niveles de analito de la proteína diana en productos alimentarios o materias primas específicas para la producción de alimentos. Para aplicar un método de detección inmunológica, como ELISA de microplaca, con el fin de determinar cuantitativamente un analito proteínico en muestras de alimentos o tejidos comestibles, es necesario obtener en primer lugar una muestra representativa del material diana de la matriz. 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 de la muestra 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 tensioactivos o aditivos como la albúmina de suero bovino (BSA) en función de los ensayos y las matrices validados. Es importante que los métodos de extracción no desnaturalicen las proteínas hasta el punto de hacerlas irreconocibles por los anticuerpos, salvo que el ensayo se haya concebido para detectar proteínas desnaturalizadas.

2. La descripción siguiente del procedimiento es solo una de las varias posibles para realizar un ensayo inmunológico de detección para las proteínas [de interés] [expresadas en organismos derivados de ADN recombinante].

3. En el ensayo inmunológico corriente de detección de proteínas, se mide la densidad óptica del producto de la reacción inmunológica. Se genera la curva típica trazando la densidad óptica en el eje y y la concentración de los estándares 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, la densidad óptica de las soluciones de muestra debe corresponder a 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 se calcula corrigiendo todo factor de dilución que se introdujo para preparar la muestra a efectos de 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.

4. Para obtener un valor cuantitativo preciso y exacto, la densidad óptica de las soluciones de muestra debería corresponder a la porción lineal de la curva de calibración. Si la densidad óptica es demasiado alta, la solución de muestra debería ser diluida hasta que la densidad óptica esté dentro del rango de cuantificación del ensayo. La concentración del analito proteínico en la muestra original se calcula corrigiendo todo factor de dilución que se introdujo para preparar la muestra a efectos de 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.

5. Se pueden utilizar diferentes controles para demostrar el rendimiento del ensayo. Puede introducirse en paralelo 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 (es decir, una solución de extracción de la matriz de la que se sabe que no contiene el analito) para demostrar todas las respuestas no específicas o los efectos de interferencia de la matriz que se producen en el ensayo. 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. Pueden realizarse muestras testigo, controles negativos, controles positivos, 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

6. Cuando procede, el material de referencia es la misma matriz que la muestra de análisis que va a ser objeto de ensayo. Suele incluir materiales de control negativo y de referencia positiva. Por ejemplo, si la matriz que va a ser objeto de ensayo es semilla de soja, el material de referencia normalizado sería la harina de soja que contenga una proporción conocida de [proteína de interés] [alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos]. 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 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

que se encuentran en la matriz de alimentos. Se debe utilizar material de referencia de la mejor calidad disponible para cumplir los reglamentos y los requisitos de los ensayos.

7. Cuando los productos positivos y negativos están disponibles, es bastante sencillo preparar una muestra de referencia con una proporción conocida del material diana. 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, el operador necesitará combinar materiales negativos de control y materiales positivos de referencia de tal manera que se pueda lograr una muestra homogénea de referencia que contenga una proporción conocida de la proteína. La estabilidad de estos materiales debería ser evaluada en condiciones de almacenamiento y de ensayo. De cualquier manera, resulta útil disponer de materiales de referencia negativos y positivos para utilizarlos como controles negativos y positivos.

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO CUANTITATIVO BASADO EN PROTEÍNA

8. Los principios de validación del método definidos en la norma armonizada ISO/UIQPA/AOAC (Horwitz 1995) son de aplicación tanto a los métodos de PCR como a los de proteína. La ISO ha elaborado directrices internacionales específicas para la validación de inmunoensayos destinados a la detección y la cuantificación de productos alimenticios modificados genéticamente (ISO21572:2004). Estas directrices son igualmente pertinentes para otros productos alimenticios.

9. Los parámetros de validación de métodos cuantitativos comprenden la exactitud/conformidad, la eficiencia de la extracción, la sensibilidad, el rango de cuantificación, la precisión, la solidez, la aplicabilidad, la viabilidad y el paralelismo (Grothaus *et al.*, 2006).

10. 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).

11. La recuperación de proteínas [expresada en organismos obtenidos de ADN recombinante] debería determinarse comparando resultados de análisis de un material de referencia con el valor conocido o asignado para dicho material de referencia. Debería tenerse en cuenta la repercusión de los efectos de la matriz de muestra, particularmente cuando esta difiere de la del material de referencia.

Recomendación: la recuperación debería situarse entre 70 y 120 %.

12. Desviación típica de la repetibilidad

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

13. Desviación típica de la reproductibilidad

Recomendación: La desviación típica de la reproductibilidad 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 típica de la reproductibilidad relativa debe ser ≤ 50 % o un valor tan cercano como sea posible al extremo inferior del límite de cuantificación.

Eficiencia de extracción

14. 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 en porcentaje del analito recuperado de la muestra. 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 del analito de la proteína diana a partir 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).

15. Precisión: La precisión interna del ensayo describe el grado de variación que se produce en el mismo. 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 entre ensayos 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 de muestras que contienen el analito diana y una de las muestras de control. Si la proteína es estable en el extracto, puede almacenarse congelada. Posteriormente, se descongelaría una porción y se sometería 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).

16. La concordancia de la disolución o paralelismo se utiliza para evaluar que el ensayo pueda dar resultados equivalentes independientemente del punto en el que la densidad óptica de la muestra se interpola en el rango cuantitativo de la curva típica. A fin de realizar estos experimentos, en condiciones ideales las muestras que dan positivo para la proteína diana se diluyen de tal manera que en por lo menos tres disoluciones se obtengan valores que cubran el rango cuantitativo de la curva. El coeficiente de variación de los resultados ajustados de varias disoluciones de un solo extracto de la muestra debería ser de $\leq 20\%$ en condiciones ideales.

Sensibilidad

17. 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 típicas por encima de la absorción inicial (Rogan *et al.*, 1992). El límite de detección se podría expresar como la dilución más baja de la proteína de interés que puede ser detectada cuando se combina con la proteína restante extraída de la muestra (Rogan *et al.*, 1999).

Rango dinámico - rango de cuantificación

18. El alcance los métodos define el intervalo de concentración en el que se podrá determinar el analito con precisión. El intervalo deseado de concentración define las curvas típicas y se debería utilizar un número suficiente de estándares para definir adecuadamente la relación entre la concentración y la respuesta del ensayo. Se debería demostrar que la relación entre la respuesta y la concentración es continua, reproducible y lineal, después de la transformación apropiada.

19. Los métodos cuantitativos de proteína suelen dar una estimación de la concentración de la proteína de interés en la matriz. Para los organismos modificados genéticamente la interpretación de los valores de porcentaje (por ejemplo, el rango dinámico del 10 % al 500 % del valor buscado) puede resultar difícil cuando se emplean métodos cuantitativos debido a las variaciones en la expresión de la cantidad de proteína en diferentes tejidos vegetales o entre cultivares y en diferentes puntos dentro del mismo tejido. Se debería actuar con cautela cuando se utiliza un método que puede detectar la proteína específica 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 debería tener en cuenta la pérdida de señal provocada por los efectos de la elaboración de los alimentos.

20. Merece la pena observar que si se fijan un límite de detección o un límite cuantitativo muy inferiores al rango en el que se pretende utilizar el método, no es necesaria una determinación exacta. Así sucedería, por ejemplo, cuando el límite de detección se encontrase en el rango de 1 ng/kg, en tanto que el rango de la validación del método abarcase solo las concentraciones en g/kg.

Límite de detección

21. En el Anexo II se define el límite de detección. Las proteínas suelen estar presentes en los alimentos [obtenidos por medios biotecnológicos modernos] 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.

22. 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 típica 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

23. 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 típica 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 carezca de importancia. 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.

24. 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 han sido habitualmente de una desviación típica de la repetibilidad $\leq 20\%$ y de un 70-120 % de recuperación (Mihaliak & Berberich, 1995). Sin embargo, la recuperación de proteína podría ser complicada en algunas matrices, como féculas o aceites, y tal vez deba aceptarse que puede haber eficiencias de recuperación inferiores. Cuando la eficiencia de recuperación es baja, se debería 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 la diana. 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 proteína de interés] [los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos]. Los procedimientos para calcular el límite de detección y el límite de cuantificación de los métodos cuantitativos de PCR se tratan en los Anexos III y IV.

Reactividad cruzada

25. La reactividad cruzada o especificidad del ensayo es el grado en que los análogos u otras moléculas pueden unirse a los anticuerpos de la detección. Este concepto debería clasificarse y describirse en el método. La reactividad cruzada debería demostrarse mediante resultados experimentales de la comprobación del método con proteínas o moléculas de especies/variedades no diana y estrechamente relacionadas, así como de proteína diana purificada o de materiales de referencia positivos de control. La posibilidad de que se produzcan interferencias causadas por reactivos y el material de laboratorio se puede evaluar sometiendo a ensayo extracciones de material libre de analito.

Efectos de la matriz

26. 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 similares 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 (aunque menos deseable) para gestionar los efectos de la matriz consistiría en preparar las soluciones estándar en extractos de una matriz libre de analito. De esta manera se aseguraría que todo efecto de la matriz resultara coherente con los estándares y las muestras.

Solidez

27. 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 conformidad y la precisión de las muestras fortificadas empleando material de control de diversas fuentes.

ENSAYO CUALITATIVO (UMBRAL)

28. 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 deberían llevar a cabo una validación del método y proporcionar una descripción de las características de rendimiento del producto en el folleto del mismo, detallando en particular la sensibilidad, la especificidad, la aplicabilidad y el efecto de gancho. 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, siempre que el método se haya empleado de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 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 sistema 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.

29. A fin de establecer un procedimiento *in situ* de comprobación del umbral, se debería establecer en primer lugar el nivel del umbral. Para determinar que el dispositivo de flujo lateral puede diferenciar entre muestras que contienen una proteína diana por encima o por debajo del umbral, se deberían someter a un ensayo simultáneo una referencia negativa y una referencia de umbral que contengan una proporción conocida de la proteína diana. 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 (por ejemplo, USDA, 2004) 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 simultáneo las muestras de referencia negativa y de umbral.

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO CUALITATIVO BASADO EN PROTEÍNA

30. 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 fiable de los métodos de flujo lateral basados en proteína, no se realizan por duplicado en cada muestra. Sin embargo, en el ensayo ELISA (debido a su naturaleza cuantitativa) suelen emplearse pozos duplicados.

Aplicabilidad

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

32. La extracción de proteína puede suponer un factor esencial en el rendimiento de un método de proteína y los tampones también pueden afectar al rendimiento de la etapa de detección. Por tanto, es necesaria una optimización cuidadosa para asegurar la fiabilidad de los métodos de detección basados en proteína. En un método ELISA (por ejemplo) se debería apreciar una precisión razonable, un sesgo bajo y posibilidad de repetición con una desviación típica razonable de la reproducibilidad relativa. Se deberían establecer para el método los criterios para la determinación del límite de detección. El límite de detección del ensayo puede determinarse mediante lecturas de la absorción en algunos extractos de los que se sabe que no contienen la proteína diana (réplicas de dosis cero) o utilizando experimentalmente muestras con cantidades conocidas de la proteína diana (Keith et al., 1983). Además, debería resultar posible establecer una curva típica utilizando la proteína específica en la matriz que se está sometiendo a ensayo. En el caso de las matrices nuevas, se puede emplear una muestra de cada matriz fortificada con la proteína específica con el fin de establecer la eficiencia de la recuperación y puede utilizarse para estimar el límite de cuantificación (Keith et al., 1983). Probar la posibilidad de extracción de una proteína es difícil y ello puede establecerse por extracciones repetidas (en el caso de las proteínas relativamente estables) o empleando muestras añadidas con características bien conocidas.

33. Para la determinación del límite de detección de los ensayos cualitativos pueden utilizarse niveles de fortificación cercanos a dicho límite siempre que uno de los niveles utilizados cumpla el criterio de ser superior al nivel de detección aun estando cerca del mismo. Si bien estos procedimientos pueden dar una indicación del rendimiento del método, las muestras añadidas con características bien conocidas (de estar disponibles) son la mejor matriz a partir de la cual se puede determinar la aplicabilidad de un método.

Practicabilidad

34. Se debería demostrar la practicabilidad del método.

35. 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 VI

Grothaus GD, Bandla M, Currier T, Giroux R, Jenkins GR, Lipp M, Shan G, Stave JW y Pantella V. (2006). Immunoassay as an Analytical Tool in Agricultural Biotechnology. *AOAC International* 89:913-928

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.

Horwitz E. ISO/AOAC/IUPAC Harmonized Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies (1995). *Pure and Applied Chemistry* 67:331-343.

ISO 21572:2004. Foodstuffs-Methods for the detection of genetically modified organisms and derived products-protein based methods. Geneva: International Organization for Standardization.

Mihaliak CA y Berberich SA (1995). Guidelines to the Validation and Use of Immunochemical Methods for Generating Data in Support of Pesticide Registration, en: Nelson JO, Karu AE y Wong RB (eds.) *Immunoanalysis of Agrochemicals: Emerging Technologies. ACS Symposium Series 586:288-300.*

Stave JW (1999). Detection of the new or modified proteins in novel foods derived from GMO: future needs. *Food Control* 10:367-374.

Rogan GJ, Dudin YA, Lee TC, Magin KM, Astwood JD, Bhakta NS, Leach JN, Sanders PR y Fuchs RL (1999). Immunodiagnostic methods for detection of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in Roundup Ready(R) soybeans. *Food Control* 10(6):407-414.

USDA (2004). U.S. Department of Agriculture/Grain Inspection, Packers and Stockyards Administration Directive 9181.2. [en línea] <http://archive.gipsa.usda.gov/reference-library/directives/9181-2.pdf>.