



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE ALGODÓN
GENÉTICAMENTE MODIFICADO POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE LA
REACCIONEN CADENA DE LA POLIMERASA (qPCR)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

MIRIAM LÓPEZ OCHOA



MÉXICO, D.F.

AÑO 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. Francisco J. Plasencia de la Parra

VOCAL: Dr. Francisco Ruiz Terán

SECRETARIO: M. en C. Abraham I. Acatzi Silva

1er. SUPLENTE: Dra. Maricarmen Quirasco Baruch

2° SUPLENTE: M. en C. Verónica García Saturnino

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA EN DETECCIÓN DE ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS, CARRETERA FEDERAL MÉXICO-PACHUCA KM 37 CP. 55740, TECAMAC EDO. DE MÉXICO.

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. Abraham Itzcoatl Acatzi Silva



SUPERVISOR TÉCNICO:

QFB. Karina Montés Rodríguez



SUSTENTANTE:

Miriam López Ochoa





ÍNDICE

1. Resumen	01
2. Marco teórico	03
2.1 Organismos Genéticamente Modificados	03
2.1.1 Nivel de especie/taxón	05
2.1.2 Nivel de secuencia blanco o elemento específico	06
2.1.3 Nivel de construcción específica	06
2.1.4 Nivel de análisis de Evento Específicos	07
2.2 Algodón	07
2.2.1 Algodón OGM	08
2.3 Regulación de Organismos Genéticamente Modificados	14
2.3.1 Centro Nacional de Referencia en Detección de Organismos Genéticamente Modificados	15
2.4 ¿Qué es monitoreo de OGM?	16
2.4.1 ¿Cómo detectar y/o cuantificar OGM?	17
2.4.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	17
2.4.2.1 PCR cuantitativa en tiempo real	20
2.4.2.2 Fundamento de las sondas Taqman®	21
2.5 Validación	22
2.6 Requerimientos analíticos y criterios de aplicación	24
2.6.1 Extracción de ADN	24
2.6.1.1 Concentración de ADN	24
2.6.1.2 Pureza de ADN	24
2.6.1.3 Especificidad de la reacción	25
2.6.2 Detección y Cuantificación de OGM	25
2.6.2.1 Límite de Detección	25
2.6.2.2 Límite de Cuantificación	26
2.6.2.3 Intervalo dinámico	26
2.6.2.4 Eficiencia de Amplificación	26
2.6.2.5 Coeficiente de Correlación R^2	27



2.6.2.6 Precisión [RSDr/R]	27
2.6.2.7 Incertidumbre	28
2.6.2.8 Robustez	28
2.7 Factores que influyen en el resultado de la validación	29
2.8 Materiales de referencia	30
3. Objetivo	31
3.1 Objetivo General	31
3.2 Objetivos Particulares	31
4. Estrategia Experimental	32
5. Metodología y materiales	33
5.1 Acondicionamiento de la materia	33
5.2 Generación de mezclas GM	33
5.3 Extracción de ADN	33
5.4 Determinación de Pureza de ADN	34
5.5 Prueba de especificidad de reacción.....	36
5.6 Determinación de Límite de Detección (LD).....	37
5.7 Determinación de Límite de Cuantificación (LC)	39
6. Resultados y Discusión	40
6.1 Molienda y generación de muestras GM	40
6.2 Extracción, Cuantificación y estandarización de ADN.....	40
6.3 Pureza de ADN	42
6.4 Especificidad de la reacción	47
6.5 Límite de Detección.....	48
6.6 Intervalo dinámico, Eficiencia de amplificación y R^2	52
6.7. Cuantificación de mezclas GM (LC)	56
6.7.1 Precisión [RSDr/R]	59
6.7.2 Incertidumbre	63
6.7.3 Robustez	69
7. Conclusión	71
8. Bibliografía	73
9. Anexos	78



1. Resumen

Mediante las técnicas modernas de ingeniería genética y de la genómica, es posible aislar o sintetizar genes de cualquier origen. Los genes son segmentos de las moléculas de ácido desoxirribonucleico (ADN) que es el material genético de todos los seres vivos. Con estos genes es posible construir organismos genéticamente modificados (OGM), con el propósito de desarrollar mejores sistemas biológicos y tecnología biológica, para la producción de medicamentos y alimentos (Bolívar, 2003).

La Ley de Bioseguridad de OGM, en el Artículo 3 define OGM como “cualquier organismo vivo, con excepción de los seres humanos, que ha adquirido una combinación genética novedosa, generada a través del uso específico de técnicas de la biotecnología moderna, siempre que se utilicen técnicas que se establezcan en esta Ley o en las normas oficiales mexicanas que deriven de la misma” (LBOGM, 2005).

Con fundamento en el Artículo 13 fracción III de la LBOGM, “Es competencia de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) resolver y expedir permisos para realizar actividades con OGM, así como establecer y dar seguimiento a las condicionantes y medidas de bioseguridad a las que se deben sujetar los permisionarios...”, para ejecutar la LBOGM, la SAGARPA, a través del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), estableció al Centro Nacional de Referencia en Detección de Organismos Genéticamente Modificados (CNRDOGM), como la entidad encargada de proveer resultados técnico-científicos que coadyuven con la toma de decisiones en materia de Bioseguridad de OGM (LBOGM, 2005).

Para ello el CNRDOGM desarrolla y utiliza los métodos de análisis moleculares que son en la actualidad instrumentos reconocidos para la determinación de analitos de ADN, un ejemplo de ello es el uso de la técnica de la Reacción en



Cadena de la Polimerasa (PCR) que es una de las más utilizadas en la detección de OGM.

El CNRDOGM implementa un sistema de gestión de calidad con base a la NMX-EC-17025-IMNC-2006 para tener confiabilidad en sus resultados donde se describe que “la validación de los métodos es la confirmación atreves del examen y aporte de evidencias objetivas para uso específico previsto.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo experimental fue la realización de la validación de la metodología para el análisis de algodón (*Gossypium hirsutum*) genéticamente modificado, con el evento específico MON-88913-8 que le confiere tolerancia al herbicida glifosato por la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR), donde se realizó el análisis cualitativo y cuantitativos bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad con parámetros analítico como: intervalo dinámico, precisión, eficiencia de amplificación, coeficiente de correlación, robustez e incertidumbre.

Los ensayos se llevaron a cabo por qPCR con diferentes equipos de termocicladores, los cuales detectan la presencia de la modificación por medio de fluorescencia en el material a utilizar, por medio de amplificaciones permitiendo la detección y cuantificación del porcentaje de OGM. Para ello, se utilizaron mezclas de algodón genéticamente modificado (GM) a diferentes porcentajes (0.025, 0.1, 1.0, 10. 100%).

Dicha validación permitió saber si los parámetros analíticos cumplen con los valores establecidos conforme a lo descrito por la NMX-EC-17025-IMNC-2006 y con base en la normatividad internacional vigente, permitiendo la evaluación de la técnica en diferentes matrices y su posterior incorporación en las actividades rutinarias del CNRDOGM.



2. Marco teórico

2.1 Organismo Genéticamente Modificados

La biotecnología moderna se puede definir como una actividad multidisciplinaria, cuyo sustento es el conocimiento de frontera generado en diversas disciplinas (entre otras, biología molecular, ingeniería bioquímica, microbiología, inmunología, bioquímica, genómica, bioinformática, ingeniería de proteínas), que permite el estudio integral y la manipulación de los sistemas biológicos (microbios, plantas y animales) (Bolívar, 2003).

A partir del conocimiento de la célula viva y su funcionamiento, mediante estas disciplinas, la biotecnología ha coadyuvado a satisfacer demandas en la solución de problemas relevantes en diversos sectores como el de la salud, el agropecuario, el industrial y el del medio ambiente (Bolívar, 2003).

Mediante las técnicas modernas de la ingeniería genética y de la genómica, es posible aislar o sintetizar genes de cualquier origen. Los genes son segmentos de las moléculas de ácido desoxirribonucleico (ADN) que es el material genético de todos los seres vivos. Con estos genes es posible construir organismos genéticamente modificados (OGM), con el propósito de desarrollar mejores sistemas biológicos y tecnología biológica, para la producción de medicamentos y alimentos (Bolívar, 2003, Mussin V, 2006).

Se ha introducido el término «organismos genéticamente modificados» (OGM) para describir a los organismos cuyo material genético se ha modificado de una forma que no se da en la naturaleza en condiciones normales de hibridación o recombinación natural. El OGM debe ser una unidad biológica capaz de multiplicarse o transmitir material genético. Aplicado a los vegetales, el término se refiere a plantas en cuyo genoma (hospedador) se han introducido de forma estable uno o varios genes procedentes de otras especies, mediante técnicas de transferencia genética y cuando en la mayoría de los casos se ha comprobado que tales genes introducidos hacen que se obtenga un producto génico (una proteína), (Querici M., 2007).



En los últimos años se ha incrementado a nivel mundial la aplicación de la ingeniería genética en vegetales con diversos propósitos, como el de aumentar la producción de la actividad agrícola, la vida en anaquel de los productos perecederos y su resistencia a plagas y enfermedades (Bolívar, 2003).

Los OGM, son cultivados con fines comerciales desde 1994, cuando Estados Unidos aprobó el uso y liberación al ambiente de un tipo de tomate denominado “FlavSavr®”, el cual tenía la cualidad de maduración tardía. En el año 2010 aproximadamente 10% de la superficie total mundial de cultivos fue plantada con OGM (James, 2011).

En el año 2011, en México se plantaron 161,500 hectáreas de algodón transgénico, lo que equivale a una tasa de adopción del 87% y 14,000 hectáreas de soya para un total de 175,500 hectáreas del país, en comparación con 71,000 hectáreas en 2010; con un aumento de 146% (James, 2011).

En la Unión Europea y muchos otros países el análisis de OGM es visto como el procedimiento completo que parte de una muestra y que incluye serie de pasos llamados “niveles” para determinar la presencia, identificación y cuantificación de los OGM en productos tales como alimentos, forrajes o semillas; hasta que finalmente la medición se proporciona un resultado (Figura. 1) (Holst A, *et al* 2012).

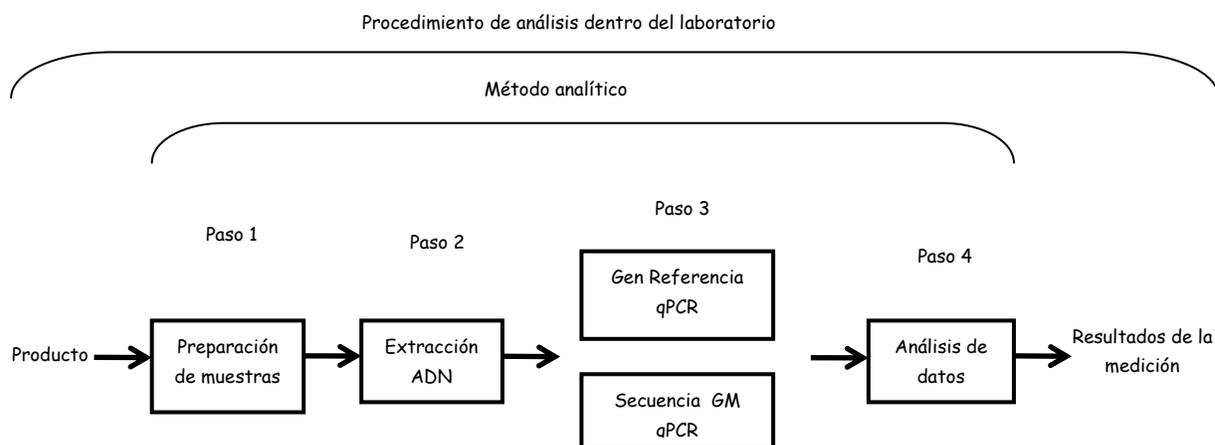


Figura 1. Enfoque modular en el análisis de OGM. (Holst A, *et al* 2012).



Las ventajas de un enfoque modular, son principalmente una mayor flexibilidad y un potencial para el diseño de las validaciones. El enfoque modular ha aplicado principalmente el análisis de ADN utilizando la tecnología de la PCR, pero el enfoque es teóricamente aplicable también a otros objetivos que el ADN. Existen diversos niveles de análisis que van de mayor a menor especificidad, la PCR es común para discriminar entre cuatro niveles de especificidad (Figura. 2).

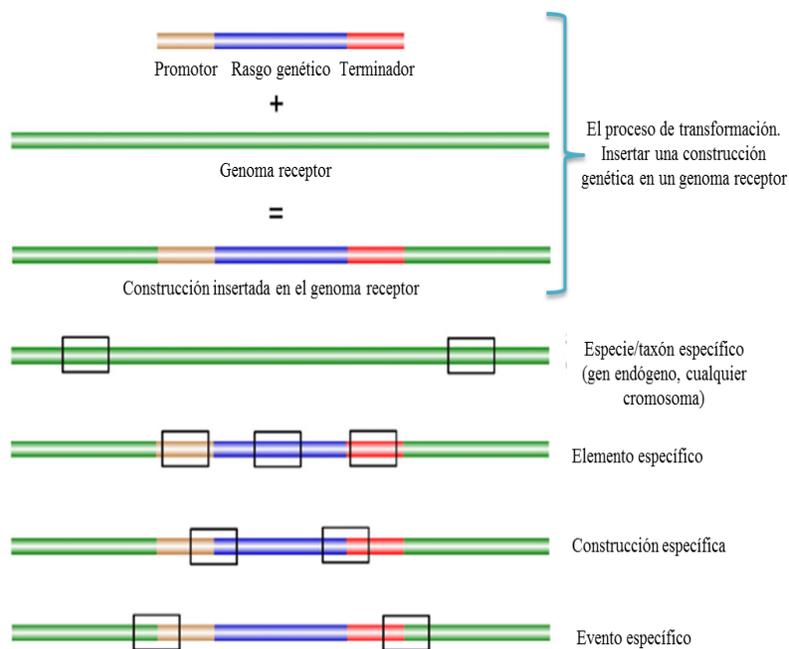


Figura 2. Proceso de transformación y los cuatro niveles de especificidad de análisis dirigidos a secuencias de ADN, (Holst A *et al.* 2012)

2.1.1 Nivel especie/taxón específicos

El primero de los pasos es detectar una secuencia conocida por ser específico para la especie objetivo / taxón (gen endógeno de la especie/taxón). La secuencia blanco está constantemente presente en la especie/taxón y ausente en otros grupos taxonómicos (Hernández *et al.*, 2004; Papazova *et al.*, 2010). Aunque el nivel está pensado para propósitos cuantitativos, la presencia de la secuencia endógena debe encontrarse en una sola copia en el genoma seleccionado. La cantidad del número de copias de material GM entre el material endógeno proporciona el porcentaje de OGM presentes en el material analizado, como se



requiere en los reglamentos de la Unión europea (UE) (Comisión Europea, 2003b; 2011).

2.1.2 Nivel de secuencia blanco o elemento específico.

El nivel de análisis de elemento específico va dirigido a un inserto de una secuencia motivo de ADN. Este motivo puede ser un promotor, un terminador, intrón o la parte que codificación de un gen. Este nivel es adecuado para determinar si una muestra es probable que contenga OGM o no. Ambos elementos reguladores, tales como promotores y terminadores, así como los rasgos y genes marcadores de selección y elementos de vector de clonación puede ser objetivo con un elemento módulo específico de la PCR. La mayoría de los elementos individuales son hasta la fecha, derivados de los donantes naturales (no GM), tales como virus, bacterias y plantas. Por lo tanto, la presencia de elementos individuales no siempre proporciona pruebas concluyentes de la presencia de OGM. En muchos casos es necesario, incluir como un control de un nivel específico de la PCR para detectar la presencia del organismo donante. Este nivel de control pertenece a los niveles específicos del taxón (Holst A., *et al*, 2012).

2.1.3 Nivel de construcción específica

Un nivel de construcción específica de la PCR se dirige al inserto de una secuencia motivo de ADN compuesto de al menos dos elementos que no se encuentran naturalmente. En otras palabras, en una secuencia quimérica el 5' y 3' de la secuencia motivo se derivan a partir de dos elementos separados. Un nivel específico constructo se aplica dos iniciadores diferentes que habrán de hibridarse con uno de los extremos en la quimera. Construir los niveles específicos que sean adecuados para la detección y cuantificación que proporcionen pruebas irrefutables de la presencia de OGM cuando se obtiene un resultado positivo (Holst A., *et al*, 2012).



2.1.4 Nivel de análisis de eventos específicos

El objetivo de un nivel de la PCR Evento Específico (E.E) va dirigido a una secuencia motivo única, de un solo OGM. La secuencia motivo específica de eventos es la firma inequívoca, o una etiqueta, de un determinado OGM. En la mayoría de los casos el E.E. se crea cuando el constructo está integrado en el genoma receptor. Las secuencias motivos son generalmente, pero no siempre, la integración de las regiones continuas, es decir, la secuencia de fusión compuesta por los pares de bases terminales del ADN insertado y los pares de bases adyacentes del genoma huésped receptor en el área de inserción. Una construcción específica no puede ser considerada como evento específico ya que la misma construcción puede ser usada varias veces para desarrollar un OGM. Los niveles de la PCR de E.E. son especialmente adecuados para la identificación y cuantificación de OGM, y representa la base jurídica en la autorización de un OGM para su uso comercial como alimento/forraje en la mayoría de las naciones. Para autorizar el uso comercial de un OGM, la Unión Europea (UE) pide al promovente proporcionar un método de detección específico al OGM, así como sus materiales de referencia control (European Commission, 2011).

2.2 Algodón

El algodón pertenece al género **Gossypium**, familia **Malvaceae**, el cual comprende un amplio número de especies y es la planta textil de fibra suave más importante del mundo.

El algodón es la principal planta cultivada para producción de fibra en el mundo, de gran importancia como materia prima para la fabricación de tejidos y prendas de vestir. Como subproducto, una vez removida la fibra, queda la semilla que es procesada para la extracción de aceite comestible y el material restante se usa en la fabricación de alimentos concentrados para animales. Inclusive, las fibras cortas, que quedan luego de remover la totalidad de la fibra, son procesadas para obtener productos dietéticos de alto contenido de fibra y algunos usos alimenticios que



incluyen forros para embutidos y para mejorar la viscosidad de ciertos productos como pasta dental y helados, entre otros (CONABIO).

La especie cultivada en México se llama ***Gossypium hirsutum L.***, es originaria de nuestro país y América Central. Actualmente existen zonas de producción en diversos estados del norte del país. Los estados en los que el algodón se cultivó con éxito durante 2011 fueron: Sinaloa, Sonora, Baja California, Chihuahua, Tamaulipas, Coahuila y Durango. De acuerdo con el Comité Nacional Sistema Producto Algodón, A.C., la producción en México entre 2010 y 2011 fue de 287.43 miles de hectáreas (CIBIOGEM, 2011).

A mediados de la década de 1990, la producción en México desapareció prácticamente debido al ataque de plagas. A partir de 1996, el gobierno mexicano aprobó la introducción de biotecnología en el cultivo de algodón, por lo que inició la siembra con semillas genéticamente modificadas.

En el año 2010, la superficie utilizada para cultivar algodón creció alrededor de 60%, al pasar de 72, 252, a más de 110,000 (CIBIOGEM, 2011).

2.2.1 Algodón genéticamente modificado

Desde hace 15 años, la ingeniería genética, se está aplicando para obtener plantas de algodón genéticamente modificadas (GM), resistentes a insectos y tolerantes a herbicidas existiendo un gran potencial para introducir otras características deseables en la planta. El método de transformación comúnmente utilizado en algodón, es a través de la bacteria del suelo ***Agrobacterium tumefaciens***. Esta nueva tecnología es considerada como un instrumento alternativo para modificar y mejorar los cultivos, particularmente en el caso del algodón donde las pérdidas por insectos y malezas son altamente significativas. El alto costo del control químico de los insectos y las malezas, justifica el desarrollo de plantas genéticamente modificadas, no solo para reducir el costo de producción, sino también el deterioro del medio ambiente (AngerBio 2011, CIBIOGEM, 2011).



El algodón pertenece a la primera generación de cultivos modificados genéticamente que ha dado como resultado el desarrollo de cultivares con un potencial importante para aumentar la productividad del cultivo, reducir el impacto ambiental al disminuir el uso de insecticidas y herbicidas; y mejorar la calidad del producto a través de la introducción de resistencia a insectos y de tolerancia a herbicidas o de una combinación de estas dos características en una misma variedad o eventos apilados (“stacked trait product”) (CIBIOGEM, 2011).

Estatus del cultivo de algodón GM en México

La siembra del algodón GM está altamente posicionada en el mercado, lo que ha motivado a distintos agricultores a regresar a este cultivo.

Incremento en las hectáreas sembradas de algodón GM; de 107,000 en el 2010 a más de 180,000 en el 2011 (AgroBio, 2012).

Se ha aprobado la comercialización de hasta 340.000 hectáreas de algodón biotecnológico, especialmente en el norte del país (AgroBio, 2012).

La industria algodonera del país tiene un valor de 2,000 millones de pesos al año, impulsada por el uso de semillas genéticamente modificadas (AgroBio, 2012).

Durante 2010 México rebasó las 500 mil toneladas de producción del cultivo, cifra record para este cultivo. Actualmente, el algodón genéticamente modificado se cultiva en fase piloto, en los estados de: Sonora, Coahuila, Durango, Baja California, Tamaulipas y Chihuahua, en un total de 172 mil hectáreas (AgroBio, 2012).

Los niveles de importación se han reducido: en el año 2000 se importó el 97% para satisfacer el mercado interno, diez años más tarde las cifras bajaron al 70%.

En 2010, Chihuahua inició con la adopción de esta tecnología, lo que le permitió incrementar la producción 136%. Actualmente produce el 59% del algodón en México (AgroBio, 2012).



Para el año 2011, el área total solicitada de algodón genéticamente modificado resistente a insectos lepidópteros y tolerante a los herbicidas con glufosinato de amonio y con glifosato fue de 892,930 hectáreas. Esta superficie de siembra está distribuida en seis Estados del norte del país: Chihuahua, Coahuila y Durango (Comarca Lagunera), Sonora, Tamaulipas, Sinaloa, Valle de Mexicali- San Luis Río Colorado, Baja California Norte (Figura 3) (CIBIOGEM, 2011)

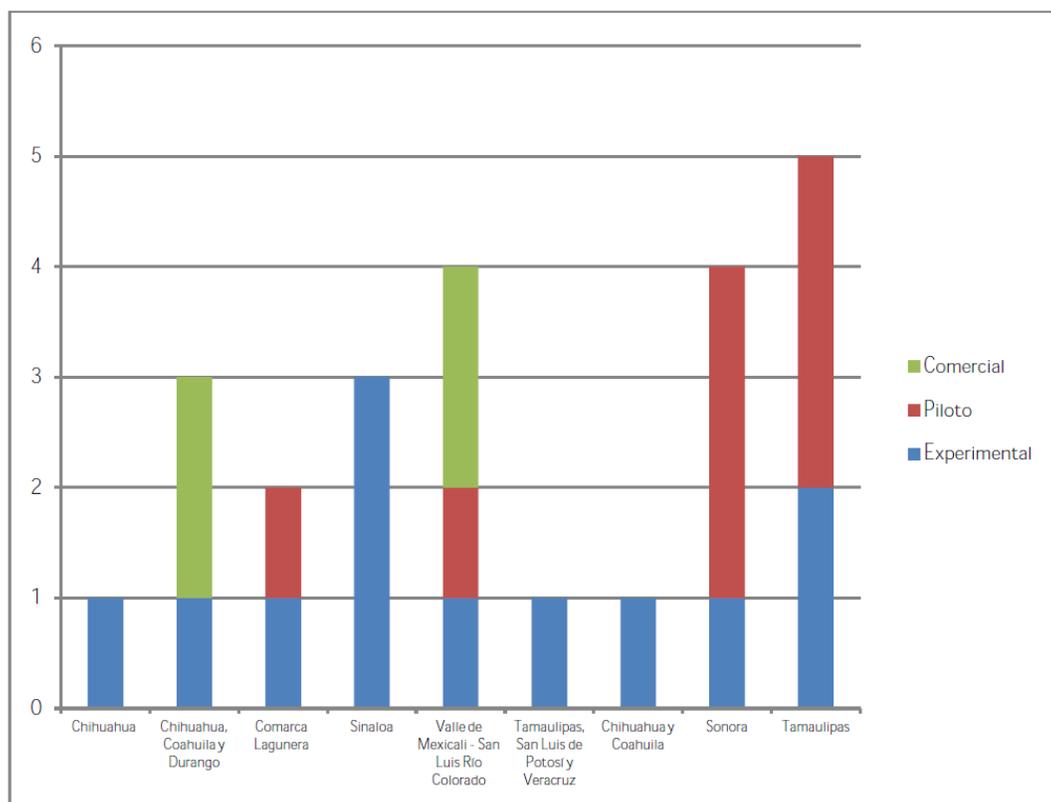


Figura 3. Relación del tipo de solicitud de liberación al ambiente y el número de solicitudes permitidas para la siembra de algodón GM, en diferentes localidades de los Estados del norte del país. (CIBIOGEM, 2011)

El algodón con E.E. MON-88913-8 se desarrolló para permitir el uso de glifosato, el ingrediente activo en el herbicida Roundup®, como una opción de control de malas hierbas en la producción de algodón. Esta variedad de algodón transgénico contiene una forma tolerante al glifosato de la planta enzima 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), aislada de la bacteria del suelo *Agrobacterium tumefaciens* cepa CP4, en lo sucesivo denominado CP4 EPSPS (Center for Environmental Risk Assessment, 2012).



La enzima EPSPS es parte de la vía de shikimato que está implicado en la producción de aminoácidos aromáticos y otros compuestos aromáticos en las plantas. Cuando las plantas convencionales son tratadas con glifosato, el herbicida se une a EPSPS, evitando de este modo la síntesis de los aminoácidos aromáticos necesarios para el crecimiento de la planta. La enzima CP4 EPSPS en algodón con E.E. MON-88913-8 tiene una afinidad reducida por el glifosato; su actividad enzimática, no se ve obstaculizada por el herbicida (Center for Environmental Risk Assessment, 2012).

El algodón con E.E. MON-88913-8 fue desarrollado por la introducción de dos copias del gen CP4 EPSPS en las secuencias de codificación usando la variedad de algodón mediante el método de transformación *Agrobacterium tumefaciens*.

En la Figura 4 se muestra la construcción de los elementos que constituyen dicho evento.

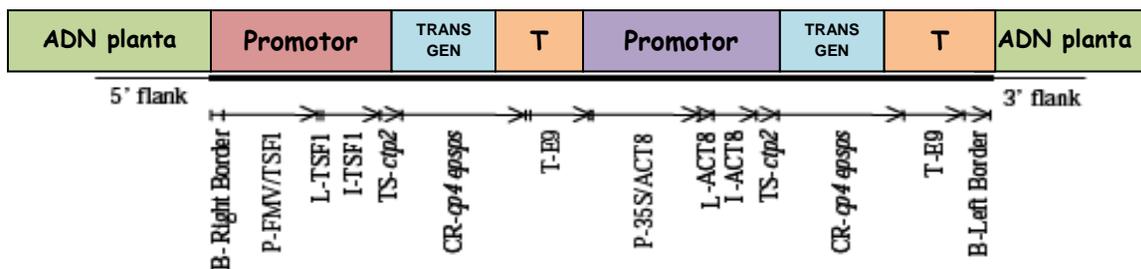


Figura 4. Construcción de los elementos que constituyen el algodón GM con E.E. MON-88913-8, *Gossypium hirsutum*, confiere tolerancia a herbicida glifosato, método de transformación por *Agrobacterium tumefaciens* (GMDD).

En la Tabla 1 se presenta la construcción que constituye el E.E. MON-88913-8.



Tabla 1. Elementos que constituye al E.E. MON-88913-8

cp4 epsps cassette	Promotor	P-FMV/TSF1: promotor quimérico que contiene el promotor de <i>A. thaliana</i> el gen TSF1, que codifica el factor de elongación EF-1alfa, contiene secuencias potenciadoras de promotor de virus del mosaico de la Escrofularia 35S, así como el líder y secuencias del intron del gen de <i>A. thaliana</i> TSF1.
	Región de codificación	Codificación de 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa
	Terminador	Derivada de la secuencia de ADN T-E de <i>Pisum savitum</i> , que contiene la región no traducida de 3' de la caboxilasa ribulosa-1,5 bifosato (Rubisco) de genes de pequeña subunidad E9
cp4 epsps cassette	Promotor	Está regulado por P-35S/ACT8, un promotor quimérico a partir del gen act8f de <i>A. thaliana</i> con secuencias potenciadoras del promotor 35S del virus del mosiaco de la coliflor, el líder y secuencias de intron del gen de act8f de <i>A. thaliana</i>
	Región de codificación	Codificación de 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa
	Terminador	Derivada de la secuencia de ADN T-E de <i>Pisum savitum</i> , que contiene la región no traducida de 3' de la caboxilasa ribulosa-1,5 bifosato (Rubisco) de genes de pequeña subunidad E9

(Agbios, 2012)

En México durante el año 2011 se procedió a solicitar permiso para cultivar de manera liberada algodón GM con E.E. MON-88913-8 principalmente en Chihuahua, Coahuila, Durango, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas las cuales están en etapa experimental y/o etapa piloto (CIBIOGEM, 2011).

En cuanto al herbicida glifosato es una molécula formada por una fracción de glicina y un radical aminofosfato unido como sustituyente de uno de los hidrógenos del grupo a-amino (Figura 5).

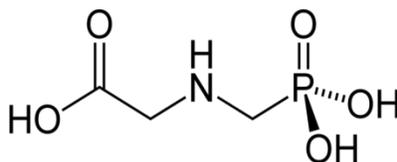


Figura 5. Formula química del Glifosato

Como producto protector de cultivos, constituye uno de los descubrimientos agroquímicos más importantes de este siglo, siendo el herbicida de mayor uso en



el mundo por ser efectivo, seguro y por que permite su aplicación de diversas maneras.

El glifosato actúa como herbicida post-emergente de amplio espectro, no selectivo y «seguro» desde el punto de vista ambiental (baja toxicidad para organismos no blanco, bajo movimiento en el agua subterránea y persistencia limitada). Es un herbicida inhibidor de la síntesis de aminoácidos en plantas, bacterias, algas, hongos, a través de la inhibición de la enzima EPSPS (5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato sintetasa). La EPSPS es codificada por el núcleo celular y transportada al cloroplasto a través de un péptido de transporte, y es en el cloroplasto donde participa de la ruta metabólica del ácido shikímico. En esta vía se emplea un 20% del carbono fijado durante la fotosíntesis. Esta enzima está asociada a la síntesis de tres aminoácidos esenciales cromáticos: fenilalanina, tirosina y triptofano. Además, este trayecto está relacionado a la síntesis de compuestos aromáticos como ligninas, alcaloides, flavonoides, ácidos benzoicos y hormonas vegetales, puesto que los aminoácidos sintetizados son precursores de estos compuestos secundarios. Ya en el cloroplasto, la EPSPS enlaza primero una molécula de shikimato-3-fosfato (S3P), inmediatamente después una molécula de PEP se enlaza al sitio activo de la enzima. La EPSPS cataliza entonces una reacción de condensación para producir 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato. Queda claro que PEP no presenta afinidad por EPSPS a menos que una molécula de S3P se enlace primero (Herbicide Tolerant Cotton).

La utilización de algodón GM permite controlar las malezas con glifosato que, a diferencia de los herbicidas utilizados en la agricultura tradicional, es más barato y de fácil degradación en el suelo, lo que evita efectos residuales que puedan perjudicar a futuros cultivos, así como la contaminación del medioambiente.



2.3 Regulación de Organismos Genéticamente Modificados

Los OGM tuvieron su primera incursión formal en México en el año 1988, al ingresar a la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV), la primera solicitud para importar y liberar en campo tomate. En 1989 se formó el Comité Nacional de Bioseguridad Agrícola (CNBA) denominado posteriormente como Subcomité Especializado en Agricultura (SEA). En 1996 se publicó la Norma Oficial Mexicana NOM-056-FITO-1995 que estableció los requisitos fitosanitarios para la movilización nacional, importación y establecimiento de pruebas con OGM. En el 2000, México firmó el Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica y éste entró en vigor en 2003.

Mediante el Protocolo de Cartagena, los países firmantes se comprometieron a establecer las regulaciones y medidas necesarias para evaluar los movimientos transfronterizos de los OGM que pudieran tener efectos adversos sobre la conservación y la utilización sostenible de la diversidad biológica o sobre la salud humana (Protocolo Cartagena, 2000).

La Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM) se publicó en marzo del 2005 y tiene como objetivo regular las actividades de utilización confinada, liberación experimental, liberación en programa piloto, liberación comercial, comercialización, importación y exportación de organismos genéticamente modificados. Con el fin de prevenir, evitar o reducir los posibles riesgos que estas actividades pudieran ocasionar a la salud humana o al medio ambiente y a la diversidad biológica o a la sanidad animal, vegetal y acuícola (LBOGM, 2005).

La LBOGM define, en el Capítulo I Artículo 3 a un OGM “como cualquier organismo vivo, con excepción de los seres humanos, que ha adquirido una combinación genética novedosa, generada a través del uso específico de técnicas de la biotecnología moderna, siempre que se utilicen técnicas que se establezcan en esta Ley o en las normas oficiales mexicanas que deriven de la misma.



La LBOGM declara que son autoridades competentes en materia de bioseguridad: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), y la Secretaría de Salud (SSA).

El Artículo 13 fracción III de la LBOGM menciona que, “Es competencia de la SAGARPA resolver y expedir permisos para realizar actividades con OGM, así como establecer y dar seguimiento a las condicionantes y medidas de bioseguridad a las que se deben sujetar los permisionarios...”. Para ejecutar la LBOGM, la SAGARPA, a través del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), estableció al Centro Nacional de Referencia en Detección de Organismos Genéticamente Modificados (CNRDOGM), como la entidad encargada de proveer resultados técnico-científicos que coadyuven con la toma de decisiones en materia de Bioseguridad de OGM.

2.3.1 Centro Nacional de Referencia en Detección Organismos Genéticamente Modificados (CNRDOGM)

Con la publicación de la LBOGM en 2005, se hace patente la necesidad de fortalecer la capacidad analítica de las instancias competentes en materia de bioseguridad.

En el 2006, ante la necesidad de atender el creciente tema de OGM en México, con la LBOGM publicada y con su reglamento en incipiente nacimiento, se ponen en marcha varios mecanismos para fortalecer esta área.

- Entre los años 2006-2008, financiado por el Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD) mediante el proyecto “Creación de capacidades institucionales y técnicas para la toma de decisiones en materia de bioseguridad” y con la finalidad de desarrollar capacidades y equipar un laboratorio de detección de OGM en México, se comenzó a operar en el inmueble del SENASICA-Viveros un Laboratorio de Detección de OGM.



- En el 2009 que se sometió a aprobación al SENASICA un proyecto para la creación de un laboratorio de análisis de OGM que pudiera fungir como Centro Nacional de Referencia en Detección de Organismos Genéticamente Modificados en México, aprobándose y ejecutándose dicho proyecto el mismo año, es decir, a finales del 2009 se concluyeron los trabajos de construcción y equipamiento del laboratorio que se ubicó en el complejo de laboratorios pertenecientes a SENASICA localizado en Tecámac, Estado de México.
- El 1^{ro} de marzo del 2010 se trasladó oficialmente e inició sus actividades de análisis en las nuevas instalaciones.
- En diciembre de 2011 obtuvo la acreditación que otorga la Entidad Mexicana de Acreditación (EMA) como reconocimiento a su competencia técnica y confiabilidad de sus resultados cumpliendo los requisitos establecidos en la norma NMX-EC-17025-IMNC-2006 y su equivalente internacional ISO-EC-17025 (SAGARPA, SENASICA, 2012).

2.4 ¿Qué es Monitoreo de OGM?

El monitoreo de OGM es el Conjunto de actividades desarrolladas para detectar la presencia de OGM no permitidos, liberados intencional o accidentalmente en sitios de cultivo agrícola; para vigilar el correcto cumplimiento de LBOGM; generar la información técnica para la toma de decisiones; implementar las medidas de urgente aplicación e iniciar los procedimientos administrativos de manera oportuna y eficaz (Red de monitoreo, 2012).

El SENASICA realiza actividades de monitoreo de OGM, en zonas agrícolas de las diferentes regiones dentro del territorio nacional, para detectar la presencia de OGM en cultivos ya establecidos en el ambiente mediante el uso de pruebas inmunológicas de campo. Así mismo, en el CNRDOGM se realiza la detección para OGM en muestras de los cultivos monitoreados, lo anterior con el objeto de salvaguardar los recursos genéticos y la sanidad animal, vegetal y acuícola del país (SENASICA, 2012).



2.4.1 Como Detectar y/o Cuantificar OGM.

Las plantas genéticamente modificadas se caracterizan por la inserción de un nuevo gen (o de un nuevo conjunto de genes) en sus genomas. El nuevo gen o genes se traducen y la nueva proteína se expresa. Esto proporciona a la planta una característica nueva, como la resistencia a determinados insectos o la tolerancia a ciertos herbicidas. La base de todas las técnicas de detección de OGM consiste en explotar la diferencia entre la variedad no modificada y la planta GM. Esto puede hacerse detectando el nuevo ADN genéticamente modificado que se ha insertado, la nueva proteína expresada, o (si la proteína actúa de enzima) utilizando el análisis químico para detectar el producto de la reacción enzimática (Querci M., 2007).

Hay dos técnicas que se utilizan generalmente en la actualidad para detectar modificaciones genéticas en plantas como la soya, el maíz, el algodón y otras. Uno es el **ELISA** (ensayo de inmunoabsorción enzimática), con el que se estudia la presencia de proteínas específicas explotando la especificidad de la unión entre un antígeno expresado y un anticuerpo específico; el otro es la **PCR** (reacción en cadena de la polimerasa), basada en la detección de secuencias nuevas de ADN insertadas en el genoma de la planta. Estos métodos muestran la ausencia o presencia del OGM en la muestra, pero a veces también pueden dar una indicación cuantitativa (porcentaje) sobre la muestra estudiada (Querci M., 2007).

2.4.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR se basa en el mecanismo de la replicación *in vitro* del ADN: el ADN bicatenario se desenrolla y pasa a ADN monocatenario, se duplica y se vuelve a enrollar. La PCR es un proceso múltiple con ciclos consecutivos de tres diferentes temperaturas donde el número de moléculas de secuencia blanco crece exponencialmente al número de ciclos (Lees, 2003). Esta técnica consiste:

- **Desnaturalización:** la secuencia blanco de doble hélice se desnaturaliza parcialmente para dar ADN monocatenario, y se detienen todas las



reacciones enzimáticas (es decir, la extensión de un ciclo anterior). Las dos cadenas complementarias se separan por el aumento de la temperatura. Para obtener la desnaturalización del ADN, la temperatura suele aumentarse hasta unos 93 – 96 °C. De esta manera se rompen los fuertes puentes de H⁺ y aumenta el número de bases desapareadas.

- **Alineación de iniciadores:** la unión o rehibridación de las hebras de ADN se efectúa a una temperatura inferior (generalmente, entre 55 y 65 °C), esto permite el alineamiento de los iniciadores a la secuencia blanco. La hibridación de los iniciadores es favorecida sobre la hibridación ADN/ADN molde, por el exceso de moléculas de iniciadores.
- **Elongación o alargamiento:** La elongación se lleva a cabo usando una polimerasa a temperatura óptima de 72 °C hasta obtener una nueva cadena recién sintetizada (Dorak, 2006).

Los iniciadores consisten en oligonucleótidos de ADN cuya longitud varía entre 18 y 25 unidades, que son diferentes entre sí y complementarias de los sitios de reconocimiento que flanquean el segmento de ADN blanco que debe amplificarse. Las fases de desnaturalización del ADN molde, alineamiento del iniciador y extensión del iniciador constituyen un «ciclo» del método de amplificación por la PCR (Costa, 2004). La Figura 6 ilustra las tres fases principales del proceso de amplificación por PCR.

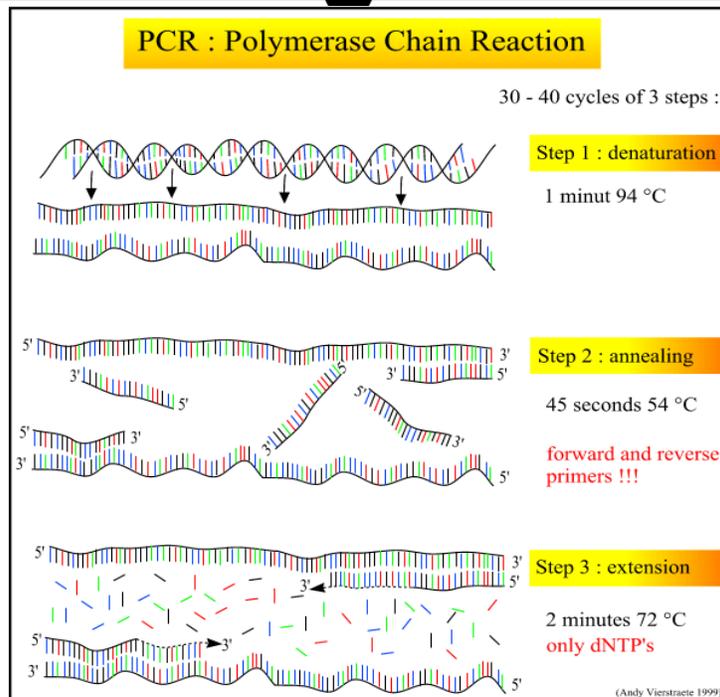


Figura 6. Fases de la amplificación por PCR (Vierstraete A., 1999).

Tras cada ciclo, las hebras de ADN recién sintetizadas pueden servir de ADN molde para el ciclo siguiente. Como se indica en la Figura 7, el producto principal de esta reacción exponencial es un segmento de ADN bicatenario cuyos extremos vienen definidos por los extremos 5' de los oligonucleótidos iniciadores y cuya longitud viene dada por la distancia entre los iniciadores. Los productos de una primera ronda de amplificación efectiva son moléculas de ADN de diferentes tamaños, cuyas longitudes pueden superar la distancia entre los sitios de unión de los dos iniciadores. En la segunda ronda, estas moléculas generan hebras de ADN de longitud definida que se acumulan de forma exponencial en rondas posteriores de amplificación y constituyen los productos dominantes de la reacción. Así, la amplificación, que es el número final de ejemplares de la secuencia blanco, se expresa con la siguiente ecuación:

$$(2^n - 2n)x$$

Donde n es el número de ciclos, $2n$ es el número de moléculas del primer producto obtenidas tras el primer ciclo y de los segundos productos obtenidos tras el



segundo ciclo con longitud indefinida, x es el número de ejemplares del ADN molde original. (Querici M. 2007).

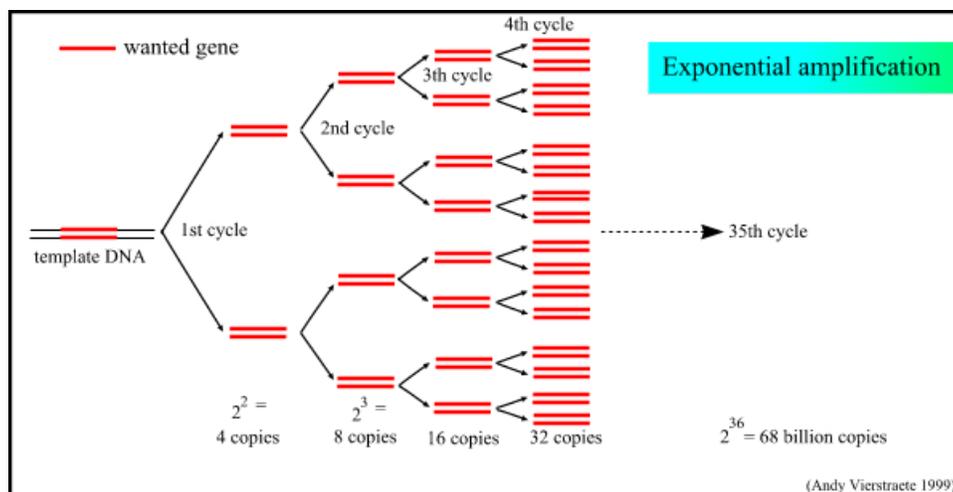


Figura 7. La amplificación exponencial del ADN mediante PCR. (Andy Vierstraete, 1999).

2.4.2.1 PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR)

La PCR en tiempo real (qPCR) es una técnica que permite la medición continua de la señal fluorescente de una o más reacciones en cadena de la polimerasa sobre un intervalo de ciclos. La PCR cuantitativa es la conversión de las señales fluorescentes de cada reacción dentro de un valor numérico para cada muestra, permitiendo la cuantificación de la secuencia blanco utilizado de manera más precisa (Kirtin, 2004). Es un método de amplificación y cuantificación simultánea, utilizada en biología molecular para analizar o cuantificar secuencias de ácidos nucleicos (ADN/ARN) (Applied Biosystems, 2011).

- La acumulación del producto se monitorea mientras se lleva a cabo la amplificación.
- Analiza ciclo a ciclo los cambios de señal fluorescente generada durante las tres etapas de PCR.
- Entre mayor sea la cantidad de ADN de la muestra, menos serán los ciclos necesarios para obtener una señal fluorescente detectable.



Los primeros ensayos efectuados en la qPCR fueron reportados por Higuchi 1993, utilizando bromuro de etidio, como agente intercalante, utilizando un termociclador modificado que permitiera irradiar las muestras con luz ultravioleta y detectar la fluorescencia. Sin embargo, tenía algunas desventajas, como la baja sensibilidad del bromuro de etidio y la falta de especificidad.

Las características que los agentes detectores o reporteros deben cumplir son:

- La fluorescencia generada debe ser directamente proporcional al número de copias obtenidas en cada ciclo de la qPCR.
- La molécula fluorescente no debe inhibir o disminuir la eficiencia de la amplificación durante la reacción de la qPCR.

Actualmente los agentes reporteros más comunes y utilizados para qPCR son:

- SYBER Green que al igual que el bromuro de etidio es un intercalante de bases de ADN.
- Sondas Taqman® son fragmento de ADN específicos unidos a un fluoróforo y un apagador (quencher) (Applied Biosystems, 2011).

2.4.2.2 Fundamento de las sondas Taqman®

Una sonda Taqman® es un oligonucleótido cuya secuencia específica a la región central del amplicón tiene una secuencia de 13 a 16 nucleótidos que presenta en el extremo 5' una marca fluorescente (reportero) y en el extremo 3' un apagador (quencher), cuando estas dos moléculas se encuentran unidas por la sonda, toda fluorescencia emitida por el reportero es absorbida por el apagador, por lo que la fluorescencia global observada es igual a cero, a esto se le conoce como Förster (o fluorescent) Resonant Energy Transfer (FRET) (Applied Biosystems, 2011) como se muestra en la Figura 8.

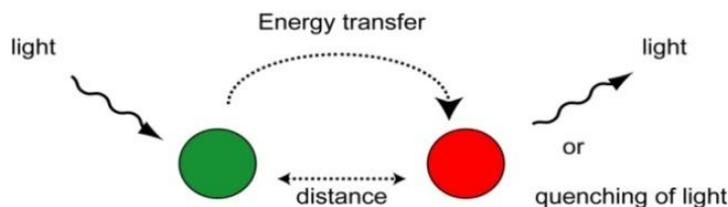


Figura 8. Efecto FRET (Marras, 2012)



Las sondas Taqman® tienen una T_m mayor a los iniciadores por lo que, durante la etapa de alineación, la sonda se une a su secuencia blanco específica antes que los iniciadores. De esta manera cuando la ADN polimerasa se une al extremo 3' del iniciador y principia la elongación, en su paso se encuentra con la sonda y la degrada dada su actividad exonucleasa 5'-3'. Al ser degradada, libera al reportero del apagador lo que suprime el fenómeno FRET y la fluorescencia emitida puede ser determinada por el sistema de detección del instrumento (Figura 9). La fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de sonda y ésta a su vez es proporcional a la cantidad de secuencia blanco generada este sistema permite visualizar el incremento de la secuencia blanco a lo largo de la reacción de PCR (Applied Biosystems, 2011).

PCR quantitative par la méthode TaqMan

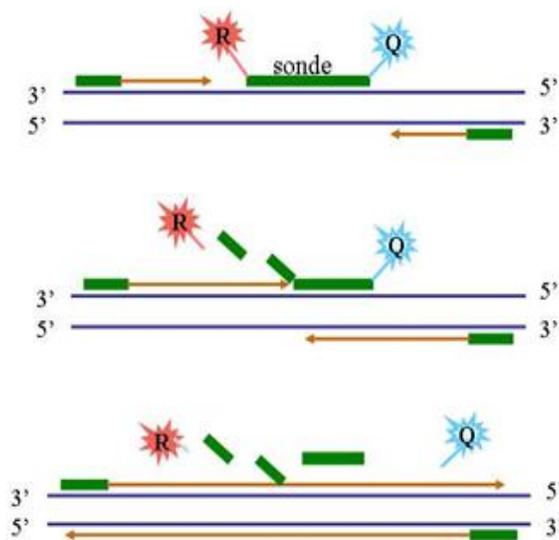


Figura 9. Florescencia de las sondas TaqMan®, (Mornet, 2012).

2.5 Validación

El CNRDOGM implementa un sistema de gestión de calidad con base a la NMX-EC-17025-IMNC-2006 y trabaja en la validación de los métodos, es decir, “es la confirmación a través del examen y aporte de evidencias objetivas para uso específico previsto.”



De acuerdo al punto 5.4.5.2 de la NMX-EC-17025-IMNC-2006 “el laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los métodos que diseña o desarrolla, los métodos normalizados empleados fuera del alcance previsto, así como las aplicaciones y modificaciones de los métodos normalizados, para confirmar que los métodos son aptos para el fin previsto. La validación debe ser tan amplia como sea necesaria para satisfacer las necesidades del tipo de aplicación o del campo de aplicación dados.”

La validación del método analítico, garantiza la calidad del sistema utilizado y resultados confiables, seguridad en el método analítico y en la calidad de los resultados, también permite un conocimiento profundo del método, así como las características de su funcionamiento con la finalidad de disminuir el número de variabilidad, fallas y repeticiones (CRL, 2009, Zel, 2006).

Los métodos de análisis moleculares e inmunológicos en la actualidad son instrumentos reconocidos para la determinación de los analitos de ADN y proteínas en materias primas y en alimentos, 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.

Se deben tomar medidas apropiadas para asegurarse de que es capaz de proporcionar resultados de calidad. Tales medidas incluyen, (CRL, 2009):

- Métodos validados de análisis
- Procedimientos internos de control de calidad
- Participar en ensayos de aptitud
- Ser acreditado de una norma internacional.



2.6 Requerimientos analíticos y criterios de aplicación determinantes para la validación de la metodología para el análisis de OGM por la técnica de qPCR.

El procedimiento de validación incluye dos módulos:

2.6.1 Extracción de ADN

El ADN servirá como sustrato en las reacciones de la PCR, debe estar libre de sustancias que produzcan inhibición de estas reacciones debido a que esta técnica es fundamentalmente para la identificación de secuencias dentro de un genoma. La obtención de ADN con alto peso molecular favorece la identificación de secuencias específicas dentro de un genoma por que disminuye la probabilidad de que se presenten falsos negativos por efecto de la degradación de ADN. Por lo tanto es importante que el método de extracción elegido garantice obtener un producto de alta pureza y calidad, para llevar a cabo los análisis moleculares posteriores (CRL, 2009).

2.6.1.1 Concentración de ADN

Es la Cantidad de analito (ADN) por unidad de volumen.

Criterio de aplicación: El método de extracción de ADN será el apropiado para obtener una cantidad de ADN requerido para los subsecuentes análisis. La concentración de ADN será medida como peso de analito por volumen de disolución y tendrá que ser mayor a la indicada en el protocolo de detección.

Ejemplo: Si el protocolo indica 40 ng/ μ L como la concentración que deberá de ser adicionada a la mezcla de reacción, entonces la concentración de la extracción de ADN tendrá que ser ≥ 40 ng/ μ L (CRL, 2009).

2.6.1.2 Pureza de ADN extraído

Es la ausencia de compuestos (dentro de la disolución de ADN extraído) que puede afectar la eficiencia de las reacciones de PCR y que conducen a un retraso en la aparición de la fase exponencial en el perfil de amplificación.



Criterio de aplicación: En la prueba de inhibición, la diferencia (ΔCt) promedio entre el valor de Ct y el valor obtenido a partir del Ct extrapolado de la primera dilución de la muestra tendrá que ser <0.5 . $[(Ct \text{ medido}-Ct \text{ extrapolado})] <0.5$ y la pendiente de la prueba de inhibición tendrá valor entre -3.1 y -3.6.

Un gen de referencia blanco debe ser realizado para determinar cuando la extracción de ADN es de suficiente calidad (largo e integridad estructural), pureza y cantidad para permitir la detección y cuantificación de un OGM. Esto podría ser de particular relevancia cuando el ADN se extrae de compuestos o matrices dañadas (CRL, 2009).

2.6.1.3 Especificidad de la reacción.

Se evalúa la especificidad de las sondas e iniciadores utilizados. Es la propiedad del método para responder exclusivamente a las características o al analito de interés.

Criterio de aplicación: El método no debe producir señal de amplificación con secuencias de ADN diferentes a las complementarias de los iniciadores y sondas diseñados. Esto debe ser demostrado por medio de la busca de la similaridad en las bases de datos y con resultados empíricos de no amplificación de pruebas con el uso de diversos eventos transgénicos y material no genéticamente modificado de la misma especie. Para la detección de eventos genéticamente modificados, la secuencia blanco será un evento específico (CRL, 2009).

2.6.2 Detección y cuantificación de OGM por PCR

Se evalúa el intervalo dinámico, la eficiencia de amplificación, el coeficiente de correlación, el límite de detección, el límite de cuantificación, la incertidumbre y robustez.

2.6.2.1 Límite de Detección (LD)

Es la mínima cantidad o concentración del analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, demostrada en un estudio colaborativo u otra validación apropiada.



Criterio de aplicación: El LD tendrá que ser al menos la vigésima parte del valor de la concentración del GM. Experimentalmente, los métodos cuantitativos pueden detectar la presencia del analito al menos el 95% de las veces, (CRL, 2009, Scholtens, 2010).

2.6.2.2 Límite de cuantificación (LC)

Es la mínima cantidad o concentración del analito en que una muestra puede ser cuantificada con un nivel aceptable de precisión y exactitud, demostrada en un estudio colaborativo u otra validación apropiada.

Criterio de aplicación: El LC tendrá que ser al menos una décima parte del valor de la concentración de la muestra con un RSDr $\leq 25\%$. Ejemplo: para un valor de 2% el LC será de 0.2% (CRL, 2009, Scholtens, 2010).

2.6.2.3 Intervalo dinámico

Es el intervalo de concentraciones sobre el cual el método desarrollado mantiene un nivel lineal aceptable de veracidad y precisión (repetibilidad y Reproducibilidad).

Criterio de aplicación: El intervalo dinámico del método debe incluir la décima parte y al menos 5 veces la concentración de la secuencia de ADN blanco. La concentración de la secuencia blanco estará en función del umbral establecido. EL intervalo de la curva patrón para PCR deberá permitir una prueba de ensayo de muestras a ciegas en todo el intervalo dinámico, incluyendo los extremos inferior y superior (CRL, 2009).

2.6.2.4 Eficiencia de amplificación

El valor teórico de la pendiente en una curva de calibración es de -3.32 lo cual da valor de 100% de eficiencia de amplificación. La eficiencia de amplificación en cada reacción puede ser calculada con la siguiente ecuación:

$$Eficiencia = \left[\left(10^{(-1/m)} \right) \right] \times 100$$

Donde: m es la pendiente



Criterio de aplicación: Se acepta una curva de calibración cuando obtenga una eficiencia de aplicación de 90-110% (CRL, 2009).

2.6.2.5 Coeficiente de correlación R^2

Es el coeficiente de correlación de la curva de calibración obtenido mediante un análisis de regresión lineal.

Criterio de aplicación: El promedio del valor de coeficiente R^2 será ≥ 0.98 (CRL, 2009).

2.6.2.6 Precisión (desviación estándar relativa de la Reproducibilidad [RSDR] y desviación relativa de la repetibilidad [RSDr])

Se refiere al grado de concordancia existente entre los propios resultados obtenidos. La precisión del método de medición se expresa en términos de la desviación estándar relativa obtenida bajo condiciones de repetibilidad y/o reproducibilidad que se describe a continuación:

Repetibilidad: Proximidad de la concordancia entre los resultados de las mediciones sucesivas del mismo mensurando con las mediciones realizadas con la aplicación de la totalidad de las siguientes condiciones:

- Mismo analito
- Mismo lugar
- Mismo observador
- Mismo procedimiento de medición
- Misma matriz vegetal
- Mismos instrumentos de medición
- La repetición dentro de un periodo corto de tiempo

Reproducibilidad: Proximidad de la concordancia entre los resultados de las mediciones del mismo mensurando, con las mediciones realizadas haciendo variar las condiciones de medición. Las condiciones de reproducibilidad son:



- Mismo analito
- Mismo procedimiento de medición
- Mismo lugar
- Dos analistas
- Diferente equipo de medición
- Diferente matriz vegetal
- Mismo material de referencia
- Tiempo de análisis (diferentes días)
- Mismo método de medición (PCR)

Criterio de aplicación: La desviación estándar obtenida de repetibilidad tendrá que ser $\leq 25\%$ en todo el intervalo dinámico del método. Un estimado de la desviación estándar obtenido bajo condiciones de repetibilidad tiene que ser obtenido a partir de un número suficiente de pruebas, al menos 8 (CRL, 2009, Scholtens, 2010).

2.6.2.7 Incertidumbre (U)

Parámetro asociado al resultado de una medición que se caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atributos al analito (CRL, 2009, Scholtens, 2010).

Criterio de aplicación: no existe ningún criterio de aplicación debido a que la estimación del parámetro dependerá del método aplicado y de los componentes asociados a la contribución de la estimación de la incertidumbre, por lo cual los estimados serán internos del método.

2.6.2.8 Robustez

Es medido como la capacidad de permanecer inafectado por pequeñas pero deliberadas desviaciones a partir de las condiciones experimentales descritas en el procedimiento. La adecuación de la prueba de robustez necesita ser demostrada sobre el método base. En consecuencia, para un método de PCR los siguientes factores y su origen/fuente pueden ser tomados en cuenta, diferente modelo de termociclador, la ADN polimerasa, la n-uracilglicosidasa, la concentración de



cloruro de magnesio, la concentración de alguno de los iniciadores, la concentración de las sondas, el programa de amplificación y la concentración de los nucleótidos (CAC/GL74-2010).

Criterio de aplicación: La respuesta de un ensayo con respecto a pequeños cambios no se desviara más de un $\pm 30\%$ (CRL, 2009, Scholtens, 2010).

2.7 Factores que influyen en el resultado de la validación

Los siguientes factores son algunos puntos que afectan el resultado de la metodología y/o causan variabilidad en el resultado de los ensayos sean cualitativos y cuantitativos:

- Matriz de análisis
- Tamaño de partícula
- Extracción de ADN
- Homogeneidad de la muestra
- Cuantificación de ADN
- Calidad y pureza de ADN
- Agentes de dilución
- Inhibidores de PCR
- Equipo para PCR
- Condiciones de PCR
- Instrumentos para la PCR
- Calibraciones
- Tipos de calibrantes
- Resultados de medición de PCR
- Análisis de datos
- Concentración de OGM
- Manipulación de la muestra (tiempo, temperatura, conservación), (CRL, 2009).



2.8 Materiales de referencia

Los materiales de referencia certificados (MRC) son materiales con una o más propiedades que han sido suficientemente cuantificadas para que puedan utilizarse en la calibración de métodos de análisis.

Al utilizar el MRC como punto de referencia de la trazabilidad de los resultados analíticos, la cadena de pruebas que se realicen tendrá trazabilidad al sistema internacional.

Los materiales de referencia en el análisis de OGM sirven como controles positivos y negativos, y como calibradores para análisis cuantitativos y son producidos por instituciones con competencias como el IRMN y el Centro Nacional de Metrología (CENAM).

La trazabilidad depende también del supuesto de que las características de rendimiento del método de análisis son las mismas en el caso del MRC que en el de las matrices del material de ensayo. Teniendo en cuenta que la variedad de MRC actualmente disponibles es limitada, rara vez es posible procurarse un MRC equiparado con una matriz. En estas condiciones, lo único que cabe hacer es buscar pruebas de las diferencias en el rendimiento analítico que dependen de la matriz (por ejemplo, interferencias, diferencias en la recuperación), y, si no se encuentran, aceptar el supuesto (FAO, 2012).



3. **Objetivos:**

3.1 **Objetivo general:**

Desarrollar la validación de la metodología asociada al el análisis de algodón genéticamente modificado (*Gossypium hirsutum*) mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR).

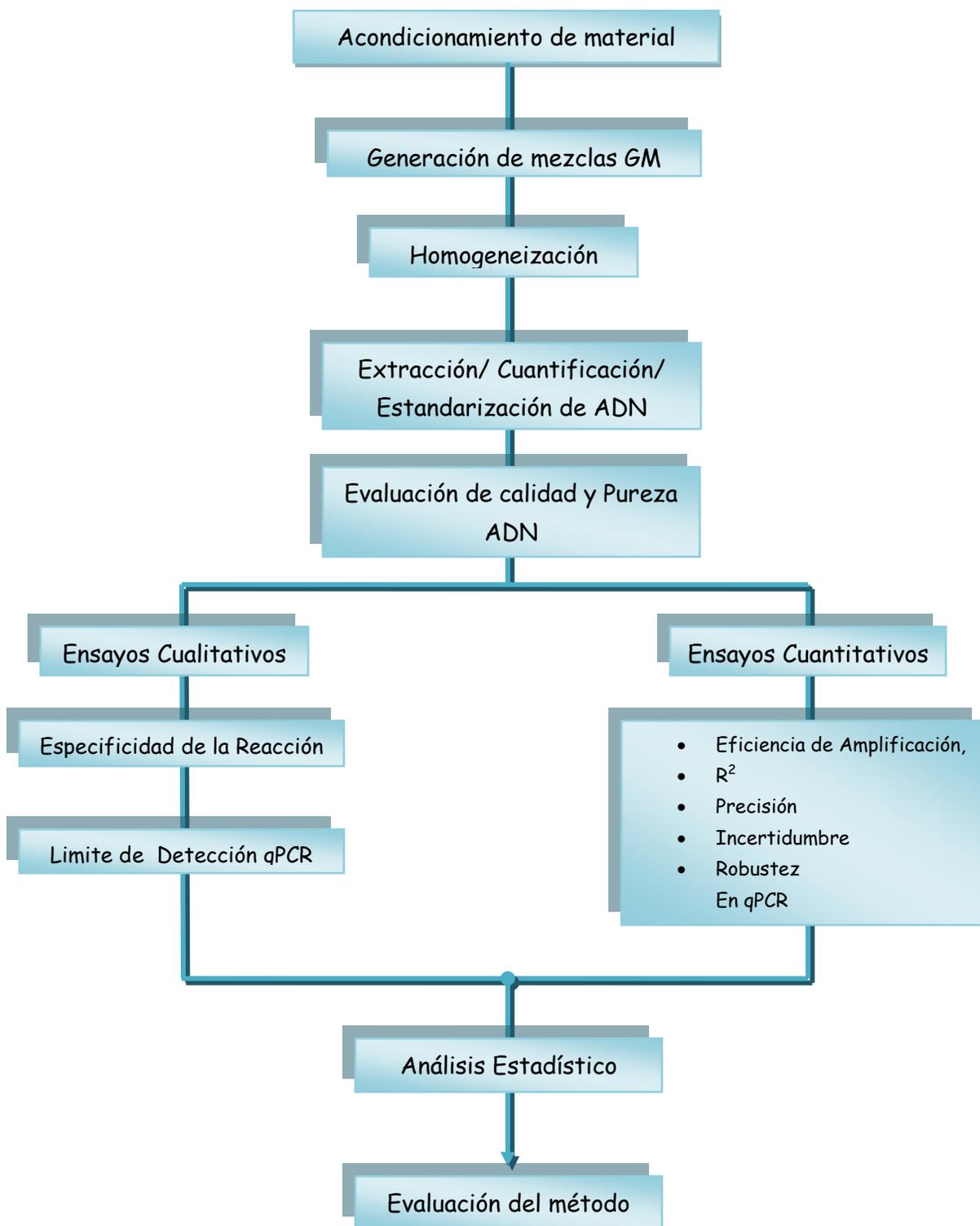
3.2 **Objetivos particulares:**

- ▶ Extraer el ADN de las mezclas de algodón GM con las concentraciones 0.025, 0.1, 1, 10 y 100% y evaluar su calidad y pureza.
- ▶ Evaluar los parámetros analíticos del método de análisis de OGM por qPCR como:
 - ▶ Especificidad de la reacción
 - ▶ Límite de detección
 - ▶ Límite de cuantificación
 - ▶ Intervalo dinámico
 - ▶ Eficiencia de amplificación
 - ▶ Coeficiente de Correlación (R^2)
 - ▶ Precisión
 - ▶ Incertidumbre
 - ▶ Robustez

- ▶ Análisis estadístico de los resultados y evaluación del método.



4. Estrategia experimental





5. Metodología

5.1 Acondicionamiento del materia

Se trabajó con algodón genéticamente modificado (GM) del evento específico (E.E) MON-88913-8, y materia de algodón convencional (no GM), para asegurar la trazabilidad de las muestras se le asignó un código con el cual se identificaron las muestras durante todo el estudio.

5.2 Generación de mezclas de algodón

Se congelaron las muestras para su conservación y para facilitar su molienda. Se trituraron las muestras en un vaso de licuadora de acero inoxidable, se depositaron en un contenedor, previamente etiquetado.

Posteriormente se mezclaron las cantidades dichas de harina GM y harina no GM. Se colocaron en contenedores previamente etiquetados.

Dichas mezclas se enviaron para su homogeneización al Centro Nacional de Metrología (CENAM). En el CENAM colocaron las mezclas de 0.025, 0.1, 1.0, 10, 100% GM de algodón en 20 frascos color ámbar de aproximadamente 2 g para cada porcentaje, a partir de este punto las mezclas de algodón se mantuvieron en congelación.

5.3 Extracción de ADN

La Extracción de ADN se realizó inmediatamente después del acondicionamiento empleando el método *FAST ID Genomic DNA extraction, utilizando el Kit de Genetic-ID* basado en ruptura celular por medio de detergentes iónicos, la purificación se da por unión específica del ADN en una membrana de sílica.

Se etiquetó tubos de 2 mL para cada porcentaje de GM, se tomaron al azar 4 frascos de cada porcentaje y se pesó por duplicado 200mg aproximadamente. La muestra se mezcló con 2 mL de *Genomic Lyse Buffer* (buffer de lisis) y se homogenizó, se colocó en un microtubo de 2 mL y se agregó 10 μ L de proteinasa



K a una concentración aproximadamente de 10 ng/μL, se colocó en vortex aproximadamente 15 s hasta obtener una solución homogénea. Se incubó a 65°C por 1 h con agitación cada 15 min, posteriormente las muestras se centrifugaron a 10000 rpm por 5 min en microcentrífuga para microtubos. Se recolectó 1 mL de sobrenadante en un nuevo microtubo de cada muestra por duplicado y se agregó cloroformo en relación 1:1, se homogeneizó y se centrifugo a 10000 rpm por 5 min, se recolectó la fase acuosa (parte superior) aprox. entre 900 y 1000 μL en microtubos y se agregó Genomic Bind Buffer (buffer de unión) y se colocó en el vortex 15 s. Se centrifugo a 10000 rpm por 3 min. El sobrenadante se pasó a través de una columna de unión de ADN en un Manifol con bomba de vacío (Qiagen) especial para columnas de unión a ADN, en el mismo equipo las columnas se lavaron con 800 μL de Genomic Wash Buffer (buffer de lavado) y posteriormente se realizaron tres lavados con 800 μL de etanol al 75%, se realizó una última centrifugación a 10000 rpm por 3 min. Se transfirió la columna a microtubos de 1.6 mL y se agregaron 50 μL de buffer 1x TE, se incubó por 5 min a 65 °C, pasados los 5 min se centrifugó a 10000 rpm por 3 min y se repitió una vez más el procedimiento comenzando con 50 μL de buffer 1x TE. Para obtener un volumen final de 100 μL de buffer 1x TE con ADN en suspensión.

La pureza y concentración se analizaron midiendo la absorbancia a 260 nm y 280 nm, por medio de espectrofotómetro (NanoDrop 2000). Posterior a la cuantificación las soluciones de ADN se estandarizaron a 50 ng/μL utilizando como disolvente agua estéril y se almacenaron en un ultracongelador a -20 °C.

5.4 Determinación de pureza da ADN por qPCR

Una vez que se estandarizó la muestra a 50 ng/μL para la secuencia GM de la especie de interés:

Se elaboró una curva estándar, para cada tubo de ADN en concentraciones de 100, 50, 25 y 12.5 ng de ADN que contenga la secuencia endógena. La curva se realizó con el material de 100% GM.



Se elaboraron las mezclas de reacción (Tabla 2) a utilizar con base en el número de reacciones y del termociclador:

Tabla 2. Concentración de los componentes para las reacciones de qPCR

Volumen de reactivos por reacción para cada equipo					
	Conc. inicial	Conc. final	Vol. Reactivos		
			ViiA7	L.C. 480	L.C. 2.0
H ₂ O			6.1 µL	6.1 µL	2 µL
Master Mix	2X	1x	10 µL	10 µL	5 µL
Primer F	10µM	300nM	0.6 µL	0.6 µL	0.3 µL
Primer R	10µM	300nM	0.6 µL	0.6 µL	0.3 µL
Sonda	5µM	180 nM	0.7 µL	0.7 µL	0.4 µL
ADN		100ng	2.0 µL	2.0 µL	2.0 µL
Vol. Final de reacción			20 µL	20 µL	10 µL

Para las reacciones de PCR de los ensayos cualitativos y cuantitativos, se utilizó la química TaqMan para qPCR y la Taq Polimerasa para PCR punto final, de igual manera para la amplificación de la PCR en los ensayos se utilizaron dos secuencias específicas; la secuencia del gen de referencia endógeno *acp-1* (*acyl carrier protein*) utilizado como normalizador y la secuencia del *E.E MON-88913-8*, la secuencia de iniciadores y sondas se muestra en la Tabla 3 (EURL-GMFF,2010, GMDD):

Tabla 3. Secuencias de iniciadores y sondas.

Nombre	Secuencia del oligonucleótido ADN
Secuencia objetivo gen de referencia <i>acp-1</i> (<i>acyl carrier protein</i>) Amplicon 76bp	
Iniciador forward	5'-ATTGTGATGGGACTTGAGGAAGA-3'
Iniciador reverse	5'-CTTGAACAGTTGTGATGGATTGTG-3'
Sonda	5'-FAM-ATTGTCCTCTTCCACCGTGATTCCGAA-TAMRA-3'
Secuencia objetivo OGM (<i>MON-88913-8</i>) Amplicon 94bp	
Iniciador forward	5'-CAAATTACCCATTAAGTAGCCAAATTAC-3'
Iniciador reverse	5'-GGCTTTGGCTACCTTAAGAGAGTC-3'
Sonda	5'-FAM-AACTATCAGTGTGTTGACTACAT-MGBNFQ-3'

Las mezclas de reacción se realizaron en microtubos nuevos de 2 mL, se distribuyeron al número de reacciones a preparar, posteriormente se adicionó el ADN. Una vez integrados los componentes, se distribuyó en la placa de 96 pozos



correspondiente al equipo, se realizó el sellado de la placa con cinta adhesiva óptica y se centrifugó a 3,400 rpm durante 2 min, posteriormente se introdujo al equipo termociclador en tiempo real, se programó con el software correspondiente al equipo utilizado, las condiciones se describen a continuación:

- Equipo ViiA7: 1 ciclo a 95 °C por 2 min, seguido de 1 ciclo a 95 °C durante 10 min y finalmente 40 ciclos de amplificación de 95 °C por 15 s; 60 °C por 1 min.
- Equipo LC 480: 1 ciclo a 95 °C por 10 min, seguido de 45 ciclos de 95 °C durante 10 s, 60 °C durante 30 s, 72 °C de 1 s. Seguido de 1 ciclo a 50 °C por 30 s.

Al término de la corrida se procedió a realizar el análisis de resultados a través de los software LC-480 y ViiA-7

5.5 Prueba de especificidad de la reacción

Se realizaron la prueba de especificidad de la reacción con las sondas e iniciadores de algodón GM, descrito en la Tabla 3 y se sometió a amplificación con ADN de algodón GM de los eventos, DAS24236, ACS-GH002, y con ADN de diferente matriz maíz., trigo a fin de evaluar su NO amplificación en estos materiales.

Las mezclas de reacción se realizaron en microtubos de 0.6 mL, posteriormente se distribuyeron al número de reacciones que se prepararon, después se adicionó el ADN. Una vez integrados los componentes, distribuirlos en la placa de 96 pozos correspondiente al equipo, se sello la placa con cinta adhesiva óptica y se centrifugó a 3,400 rpm durante 2 min, finalmente se introdujo al equipo termociclador en tiempo real. Se programó el termociclador en tiempo real por medio del software correspondiente:

- Termociclador LC 480: 1 ciclo a 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 10 s, 60 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 1 s. Seguido de 1 ciclo a 40 °C por 30 s.

Se procedió al análisis de resultados emitidos por el software de equipo LC-480.



5.6 Límite de Detección (LD)

Se elaboraron las mezclas de reacción (Master Mix) a utilizar con base en el número de reacciones a preparar (Tabla 3) para qPCR y para la PCR punto final se tomaron en cuenta los siguientes componentes de la Tabla 4:

Tabla 4. Componentes para las reacciones de PCR-pf

Volumen de reactivos por rx para cada equipo	
Equipo	ABI 9700
Solución amortiguadora	5 μ L
Primer F	2 μ L
Primer R	2 μ L
Enzima	0.25 μ L
ADN	2 μ L
dNTP's	1 μ L
H ₂ O	37.75 μ L
Vol. Final de reacción	50 μ L

Para cada ensayo de detección, se contempló una reacción de PCR por duplicado para el control positivo (ADN de material GM de la secuencia blanco a detectar y/o identificar), dos controles negativos (ADN de una secuencia no blanco) y dos controles de reactivos (NTC, *Not Template Control*, sin la adición de ADN), generando un total de 10 repeticiones para cada una de las mezclas. Para los termocicladores LC480 y ViiA7 se rotularon microtubos de 2 mL para la preparación de mezclas de master mix, cuyo volumen de mezcla debe corresponder al número de reacciones que se tenían en cuenta, dicha mezcla se distribuyó (de acuerdo al volumen de reacción establecido en el termociclador) en cada uno de los pozos de la placa de 96 y/o 386 cavidades (correspondiente al equipo) de acuerdo a la distribución de reacciones establecida.

Posteriormente se adicionó el ADN o agua en cada pozo, según corresponda, se realizó el sellado de la placa con la cinta adhesiva óptica y se centrifugó a 3400 rpm durante 3 min.

En cuanto al Termociclador ABI9700 (punto final) se distribuyó la mezcla de reacción directamente en los microtubos de 0.2mL nuevos. Posteriormente se adicionó el ADN, se cerraron los tubos, se agitó para homogeneizar la mezcla



reacción y se centrifugó (*spin*) con la ayuda de una microfuga, a fin de eliminar líquido de las paredes del microtubo.

Ya preparadas las mezclas de reacción y colocadas en su tubo o placa correspondiente, se introdujo al termociclador verificando que la orientación de los tubos, placa y/o capilares fuera la adecuada.

Para qPCR, se programó el termociclador (LC2.0, LC480 y ViiA7) por medio del software correspondiente a cada equipo, y para PCR punto final esto se realiza directamente en el equipo, a continuación se muestran las condiciones de termociclador.

- Termociclador ViiA7: 1 ciclo a 95 °C por 2 min, seguido de 1 ciclo a 95 °C durante 10 min y finalmente 40 ciclos de amplificación de 95 °C por 15 s; 60 °C por 1 min.
- Termociclador LC 480: 1 ciclo a 95 °C por 10 min, seguido de 45 ciclos de 95 °C durante 10 s, 60 °C durante 30 s, 72 °C de 1 s. Seguido de 1 ciclo a 50 °C por 30 s.
- Termociclador LC 2.0: 1 ciclo a 95 °C por 10 min, seguido de 45 ciclos de 95 °C durante 10 s, 60 °C durante 20 s, 72 °C de 1 s. Seguido de 1 ciclo a 45 °C por 10 s.
- Termociclador ABI 9700: (punto fina): 1 ciclo a 95 °C por 5 min, seguido de 45 ciclos 94 °C durante 30 s, 60 °C durante 30 s, 72 °C 30 s. Seguido de 72 °C durante 10 min.

Al término de la corrida de PCR punto final se realizó lo siguiente en el área de electroforesis se preparó un gel de agarosa al 2 % con solución amortiguadora *TE* 1X y se adicionó 1.5 µL de bromuro de etidio (concentración de 10 mg/mL) por cada 100 mL de gel preparado, una vez que el gel se solidificó se colocó en la cámara de electroforesis cubierto por completo con solución amortiguadora *TE* 1X, se incorporó el marcador de peso molecular y posteriormente las muestras se mezclaron con solución de carga. Se corrió la electroforesis a 100 v por 90 min. Se rebeló el gel en el fotodocumentador (Care stream).



5.7 Límite de Cuantificación (LC)

Una vez que se estandarizó la muestra a 50 ng/μL, para cuantificar la secuencia GM de la especie de interés: se planeó una curva estándar, contemplando reacciones de qPCR por triplicado para cada punto de la curva (concentraciones de 100, 10, 1 y 0.1 ng de ADN que contenga la secuencia a analizar). La curva se realizó con el material del algodón 100% GM. Las mezclas de reacción se realizaron en microtubos, se distribuyeron las mezclas correspondiente al número de reacciones a preparar, posteriormente se adicionó el ADN. Una vez integrados los componentes se distribuyeron en la placa de 96 y/o 384 pozos correspondiente al equipo, se selló la placa con cinta adhesiva óptica y se centrifugó a 3,400 rpm durante 2 min., posteriormente se introdujo al equipo termociclador en tiempo real. Se programó el termociclador en tiempo real por medio del software correspondiente de acuerdo a los siguientes pasos:

- Termociclador ViiA7: 1 ciclo a 95 °C por 2 min, seguido de 1 ciclo a 95 °C durante 10 min y finalmente 50 ciclos de amplificación de 95 °C por 15 s; 60 °C por 1 min.
- Termociclador LC 480: 1 ciclo a 95°C por 10 min, seguido de 50 ciclos de 95°C durante 10 s, 60 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 1 s. Seguido de 1 ciclo a 40 °C por 30 s.

Al término de la corrida se procedió a su análisis estadístico.



6. Resultados y Discusión

6.1 Molienda y Generación de muestras GM

Se trabajó con muestras de algodón GM con el E.E MON88913-8 y algodón convencional (No GM).

Se pesó la cantidad de algodón GM y algodón no GM para realizar las mezclas correspondientes al 100, 10, 1.0, 0.1, 0.025% de GM (Tabla 5) se colocaron en 20 frascos color ámbar para evitar degradación de material en aproximadamente 2 g de muestra para cada porcentaje, posteriormente se enviaron al CENAM para su homogeneización a través de un mezclador de polvos

Tabla 5. Composición de cada muestra genéticamente modificada.

Porcentaje de harina GM	Harina GM (g) (MON-88913-8)	Harina NO GM (g)
100%	100	0
10%	2	18
1.0%	0.2	19.8
0.1%	0.05	49.95
0.025%	0.05	199.95

6.2 Extracción, cuantificación y estandarización de ADN

Una vez homogeneizadas las mezclas, se realizó la extracción de ADN por el sistema de extracción Genetic ID, se realizaron 5 extracciones para cada mezcla (0.025, 0.1, 1, 10%) GM, 5 extracciones para control negativo (algodón convencional) y 5 extracciones para el control positivo, el cual se consideró como material 100% GM.

Obtenido el ADN extraído se cuantificó con un espectrofotómetro (NanoDorp®) el cual mide cantidad de analito por unidad de volumen de disolución (ng/μL). Los resultados de la cuantificación de ADN se muestran en la Tabla 6. Al final se estandarizó el ADN extraído a 50 ng/μL.



Tabla 6. Concentración de las mezclas de OGM de ADN extraído.

Muestra	Concentración inicial. (ng/ μ L)
MON-88913-8 100%	322.50
	364.60
	331.90
	271.70
	294.80
10%	640.78
	674.44
	538.14
	574.68
	514.11
1%	588.62
	560.87
	393.97
	604.83
	632.4
0.1%	464.19
	500.33
	402.99
	547.08
	414.27
0.025%	472.30
	462.00
	392.00
	408.10
	439.20
Algodón convencional (No GM)	206.40
	201.90
	178.90
	209.10
	205.60

Como se puede observar, se obtuvo ADN a una concentración mayor a 50 ng/ μ L, por lo cual, los resultados para la extracción de ADN son adecuados para el método de análisis de OGM por la técnica de qPCR debido a que la concentración para operar las reacciones de amplificación es de al menos 50 ng/ μ L en los protocolos correspondientes.



6.3 Pureza de ADN (Prueba de inhibidores)

Se evaluó la ausencia de inhibidores al realizar una dilución serial del ADN 1:2 utilizando iniciadores específicos para la amplificación de la secuencia del E.E. MON88923-8 y del gen endógeno con el material No GM, con un total de 10 curvas para cada ADN.

Al realizar una dilución 1:2 se esperaría amplificación de la secuencia blanco en cada ciclo, ya que de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$F.D = 2^n \quad \text{Ec. (1)}$$

Donde:

F.D: Factor de dilución

n: número de ciclo de amplificación,

Por lo tanto, despejando n se obtiene:

$$n = \frac{\ln FD.}{\ln 2} = \frac{\ln 2}{\ln 2} = 1 \quad \text{Ec. (2)}$$

Con este factor de dilución, el número de ciclos de amplificación sería uno, por lo tanto, se espera que la amplificación entre cada punto de la curva estándar sea aproximadamente de 1.

Para calcular el ΔC_t , se aplica la siguiente fórmula:

$$\Delta C_t = (C_{t_{extra\ polado}} - C_{t_{medido}}) \quad \text{Ec. (3)}$$

Donde C_t medido y valores de intercepto son proporcionados por el software de termociclador utilizado, y C_t extrapolado resulta de la ecuación de regresión lineal:

$$C_{t_{extrapolado}} = mx + b \quad \text{Ec. (4)}$$

Donde:

$$x = \log[C_{punto\ curva}] \quad \text{Ec. (5)}$$



La concentración que se ocupa es la de la primera dilución de la curva, es decir, el segundo punto de la curva, para determinar la ausencia de inhibidores (CRL, 2009). Por lo cual el ΔC_t es una medida indirecta de la presencia de inhibidores ya que la presencia de estas provoca un ΔC_t mayor a 0.5.

En la Tabla 7, se muestran los resultados obtenidos a partir del software de ViiA7 donde se observan los parámetros para establecer si la curva esta dentro de lo señalado por los criterios como la pendiente, eficiencia de amplificación y R^2 , en la Tabla 8 se presentan los resultados obtenidos por el software de LC-480 para la evaluación de la prueba de inhibidores del ADN extraído, tomando en cuenta que dichas curvas estándar cumplan con lo establecido en los requerimientos analíticos. En el Anexo I, se muestran los valores de amplificación obtenidos a partir del software del equipo ViiA -7 y LC-480.

Tabla 7. Evaluación de eficiencia de amplificación para la secuencia MON 88913-8

Replica	Valor de Ct en diluciones seriales				Pendiente	R^2	Eficiencia de Amplificación (%)
	01:01	01:02	01:04	01:16			
I	25.65	26.67	27.75	28.72	-3.42	1.00	95.95
II	25.54	26.52	27.67	28.72	-3.54	0.99	91.56
III	25.59	26.49	27.69	28.55	-3.35	0.99	98.99
IV	25.62	26.52	27.67	28.58	-3.33	0.99	99.70
V	25.62	26.53	27.70	28.62	-3.38	0.99	97.75
VI	25.69	26.56	27.68	28.68	-3.35	0.99	98.74
VII	25.69	26.58	27.70	28.69	-3.36	0.99	98.63
VIII	25.76	26.56	27.67	28.63	-3.23	0.99	104.08
IX	25.78	26.48	27.62	28.67	-3.25	0.99	103.13
X	25.75	26.50	27.61	28.70	-3.31	0.99	100.45



Tabla 8. Evaluación de eficiencia de amplificación Algodón No GM (secuencia endógena)

Replica	Valor de Ct en diluciones seriales				Pendiente	R ²	Eficiencia de Amplificación (%)
	01:01	01:02	01:04	01:16			
I	25.29	26.51	27.31	28.58	-3.54	0.99	91.60
II	24.68	25.64	26.89	27.79	-3.51	0.99	92.60
III	24.44	25.62	26.46	27.65	-3.47	0.99	94.20
IV	24.48	25.38	26.43	27.47	-3.33	0.99	99.50
V	26.36	27.71	28.54	29.61	-3.51	0.99	92.50
VI	25.63	26.62	27.61	28.66	-3.35	0.99	98.90
VII	22.09	22.99	24.17	25.18	-3.47	0.99	94.10
VIII	23.12	24.02	24.98	26.13	-3.32	0.99	100.20
IX	23.13	24.10	25.18	26.14	-3.37	1.00	98.20
X	24.02	24.93	25.96	27.03	-3.34	1.00	99.20

Con base a los resultados obtenidos representados en la Tabla 6 y 7 se cumple con lo señalado por los criterios de aplicación los cuales establecen que la pendiente debe estar entre -3.1 a -3.6 y está relacionada directamente al porcentaje de eficiencia obtenido, el cual esta debe estar entre 90-110 % por lo que ambos requerimientos son cumplidos ya que están dentro de los establecido. En cuanto al coeficiente de correlación, el cual establece que debe ser ≥ 0.98 se observa que todos se encuentran por arriba de lo previsto, por lo que la curva es aceptada ya que cumple con los criterios de linealidad. Por lo tanto, en relación al ciclo de amplificación entre cada punto de la curva es de aproximadamente 1 ciclo, por lo que se demuestra el factor de dilución.

A continuación se muestran un ejemplo de la curva estándar para cada material de algodón GM y no GM Figuras 10 y 11 respectivamente. En donde se observa la linealidad de las curvas, y se corrobora la integridad del ADN.

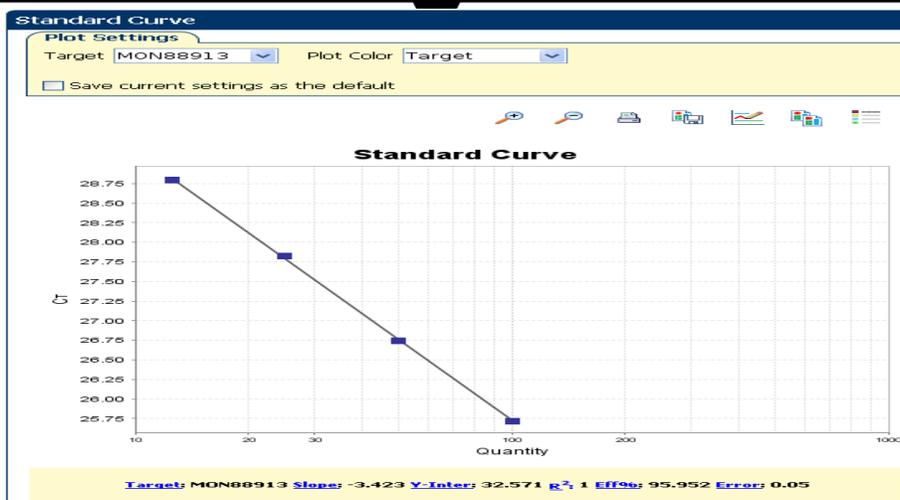


Figura 10. Curva estándar del E.E. MON-88913-8.

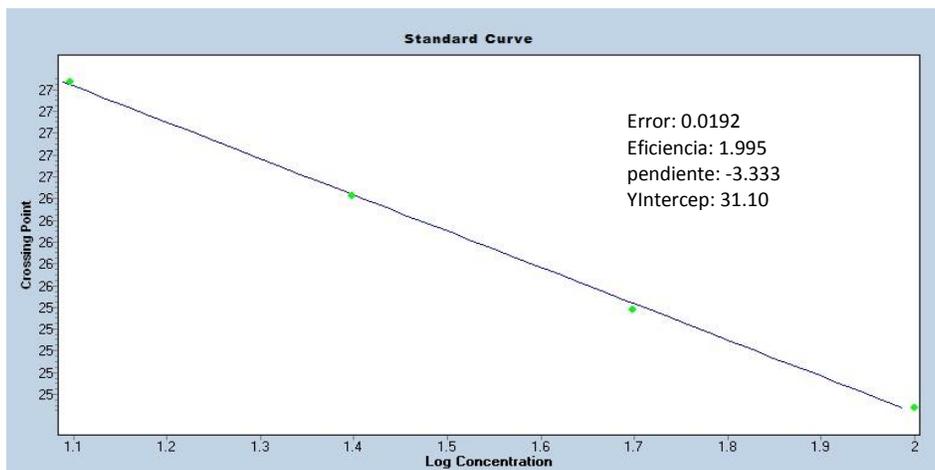


Figura. 11 Curva de estándar del algodón no GM.

Con los resultados arrojados por el software se procedió a realizar el análisis de prueba de inhibidores tomando en cuenta principalmente la pendiente, la concentración de la primera dilución, el intercepto, y con base en la ecuación 3, se realizó el cálculo del ΔCt .

En la Tabla 9 se muestran los resultados del ΔCt para el algodón GM y no GM.



Tabla 9. Valores de ΔCt obtenidos para la evaluación de ausencia de inhibidores, para algodón GM y no GM

	Y ($Ct_{teórico}$)	$Ct_{extrapolado}$	Ct_{medido}	ΔCt
Algodón GM (100%) Secuencia E.E. MON- 88913-8	32.57	26.76	26.67	0.09
	32.70	26.69	26.52	0.17
	32.36	26.67	26.49	0.19
	32.33	26.67	26.52	0.15
	32.42	26.68	26.53	0.15
	32.45	26.75	26.56	0.19
	32.46	26.76	26.58	0.17
	32.27	26.79	26.56	0.23
	32.21	26.69	26.48	0.20
32.33	26.70	26.50	0.20	
Algodón NO GM Secuencia endógena	32.41	26.76	26.51	0.25
	31.69	25.72	25.64	0.08
	31.42	25.53	25.62	-0.09
	31.10	25.44	25.38	0.06
	33.50	27.53	27.71	-0.18
	32.32	26.63	26.62	0.01
	29.98	23.08	22.99	0.09
	29.70	24.06	24.02	0.04
	29.95	24.23	24.10	0.13
	30.66	24.98	24.93	0.05

En la ecuación (3) se estableció que el ΔCt debe ser <0.5 para considerar la ausencia de inhibidores, en la Tabla 8 se observa que todos los resultados son menores a este valor por lo que se encuentra libre de inhibidores para poder realizar la qPCR sin que estén presentes inhibidores, y obtener resultados confiables para su análisis estadístico posterior. De esta forma se concluye que el método de extracción fue el indicado ya que el ADN se encuentra sin presencia de inhibidores y la integridad del ADN.



6.4 Especificidad de la reacción

La especificidad del método se evaluó mediante la amplificación de sondas e iniciadores correspondiente al E.E. MON-88913-8 mediante la preparación de reacciones de qPCR.

Se sometió al juego de sondas e iniciadores del E.E MON-88913-8 a una serie de amplificaciones con ADN de algodón que contienen otros eventos los cuales son ACS-GH002-5 y DAS-24236-5 y otro tipo de matriz en este caso se utilizó maíz convencional y trigo convencional de igual manera para el mismo algodón que contiene dicho evento MON-88913-8, esto se llevó a cabo en 8 reacciones de qPCR para cada ADN utilizado, cabe mencionar que se colocaron controles tanto positivos como negativos para las sondas del E.E. MON-88913-8 y un control de reactivos NTC. En la Tabla 10 se presentan los resultados cualitativos de la prueba de especificidad de sondas e iniciadores (MON-88913-8 en qPCR).

Tabla 10. Prueba de especificidad de la reacción de la sonda e iniciadores del E.E. MON-88913-8.

SONDA	ADN						
	ACS-GH002-5	DAS-24236-5	MAIZ convencional	Trigo convencional	MON-88913-8 (C+)	Control negativo	NTC
MON-88013-8	-	-	-	-	+	*	-

Nota: (+) Amplificación positiva, (-) Amplificación negativa. (*) Amplificación en ciclos tardíos

Como se observa en la Tabla 9 la sonda de E.E MON-88913-8 responde al 100% en el ADN que tiene el E.E.MON88-913 y nula amplificación para los demás ADN sometidos con dicha sonda, corroborando la especificidad de la sonda al E.E. MON-88913-8, sin embargo, el control negativo presenta amplificación a ciclos tardíos pero se descarta la contaminación de la sonda e iniciadores debido a que el control de reactivos (NTC) no amplificó, por lo que el control negativo pudiera tener trazas de dicho E.E MON-88913-8, como se ha observado en pruebas de especificidad realizadas en el CNRDOGM.



En las Figura 12 se muestra gráficamente el comportamiento del juego de sonda e iniciadores sobre ADN que contiene el E.E MON-88913-8.

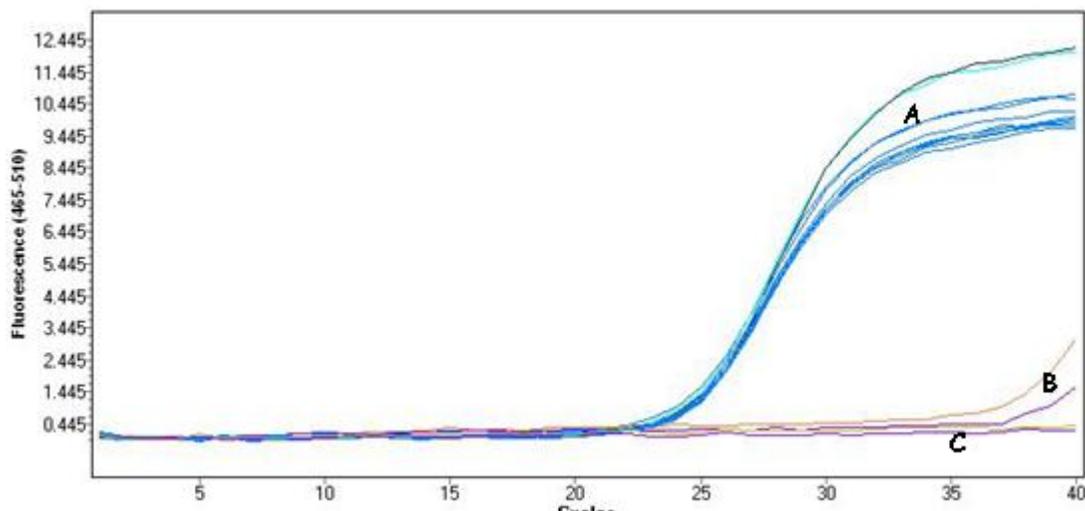


Figura 12. Sondas e iniciadores de MON-88913-8, donde, A) ADN con evento E.E MON88913-8, B) Control negativo algodón no GM, C) Control de reactivos NTC.

En la Figura 12 se observa la respuesta de la sonda con ADN de E.E MON-88913-8 en forma en amplificaciones las cuales se muestran de color azul presentado un Ct promedio de 24.4, también se observa amplificación tardía en los controles negativo el cual corresponde a algodón no GM y también se observa la nula amplificación de control de reactivos por lo que se descarta la contaminación de reactivos, lo que hace suponer que el control negativo pudiera tener trazas del E.E MON-88913-8.

6.5 Límite de Detección (LD)

Para determinar el límite de detección, el cual se interpreta como la cantidad mínima de analito (ADN) en una muestra que puede ser detectada pero no cuantificada, proveniente de las mezclas de algodón GM y no GM que presenta amplificación de la secuencia diana a analizar, se realizaron reacciones de qPCR en 3 diferentes termocicladores para comprobar la repetibilidad del ensayo de detección. Para lograr el objetivo específico, se ensayó un total de 10 reacciones



para cada mezcla de algodón GM, donde se esperaba cubrir 95% de respuesta para el porcentaje menor (0.025%).

En la Tabla 11 se muestran los resultados cualitativos obtenidos a partir de la prueba de límite de detección, la amplificación de las reacciones de qPCR se llevaron a cabo en los termocicladores ViiA-7, LC-480 y LC-2.0. Los resultados numéricos de la prueba se muestran en la sección de Anexos II y III.

Tabla 11. Resultados cualitativos de la prueba para evaluación del LD de las mezclas GM en los termocicladores LC-480, LC-2.0, ViiA-7

Prueba de Limite de Detección (LD)													
%OGM	Repeticiones										Ct promedio	Equipo	
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X			
100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	24.85	LC-480
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	27.81	
1.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	32.95	
0.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	34.33	
0.025	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	35.74	
100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	23.45	LC-2.0
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	26.57	
1.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	30.00	
0.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	32.70	
0.025	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	35.93	
100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	25.71	ViiA-7
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	29.16	
1.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	32.93	
0.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	35.07	
0.025	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	36.12	

Nota: En los equipos LC-480 y LC-2.0 se corrió a 45 ciclos, ViiA-7 se corrió a 40 ciclos

De acuerdo a los resultados presentados en la Tabla 11, es posible obtener amplificación positiva en su totalidad de las 10 reacciones de qPCR para todas las concentraciones de GM cubriendo así más del 95% de amplificaciones esperadas. Se observa que se obtuvo un Ct promedio similar en los tres termocicladores para cada una de las mezclas.



Debido a que se encontró amplificación positiva para las 10 reacciones en la concentración de OGM más baja, cumpliendo así con más del 95% de respuesta esperado, se concluye que el límite de detección es de 0.025% de OGM.

A continuación se presentan de forma ilustrativa (Figura 13) la amplificación de las curvas correspondiente al porcentaje menor a 0.025% OGM donde se estable la amplificación de la mezcla al 0.025% para los tres termocicladores.

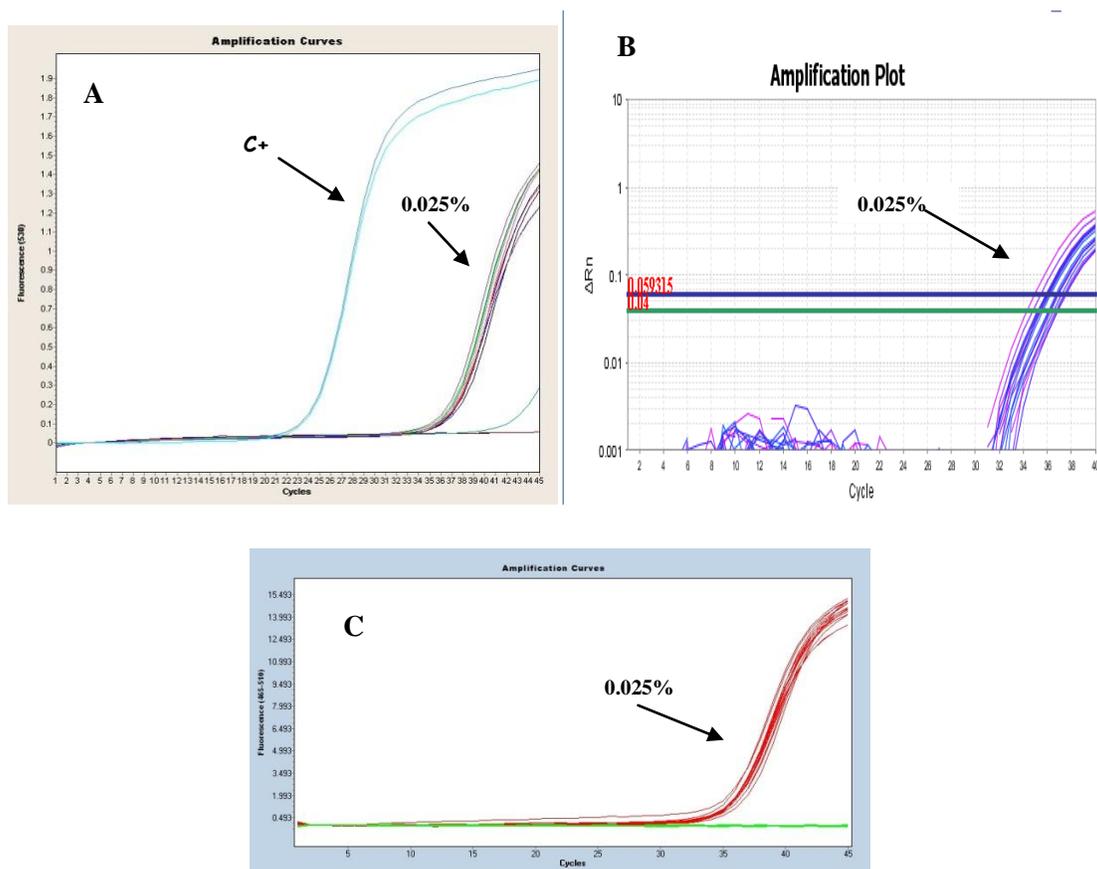


Figura 13. Amplificaciones de la concentración 0.025% GM en los 3 equipos: A) Equipo LC-2.0 se muestra la amplificación de a100% (color azul) y las que están debajo de esa a concentración al 0.025%, B)Curvas de amplificación en el equipo ViiA7, C) Curvas de amplificación en el equipo LC-480.

Además de la amplificación de qPCR, se llevó a cabo la comprobación de la amplificación de las mezclas, con el menor porcentaje, por la técnica de PCR punto final. Esta se llevó a cabo en el termociclador ABI-9700 bajo las condiciones descritas previamente en la metodología. Terminada la corrida se traslado al área



de electroforesis donde se realizó el gel de agarosa se colocaron las muestras y el marcador de peso molecular de 50 bp ya que el amplicón que se esperaba era de 94 bp aproximadamente, se corrió la electroforesis, terminada la corrida se rebeló en un fotodocumentador.

En la Figura 14 se presenta las 10 reacciones de PCR punto final en un porcentaje de 0.025% de OGM, las cuales resultaron positivas en todos los casos, cubriendo así más de 95% de reacciones positivas esperadas. En cuanto al control negativo se observa que también amplificó al igual que las muestras, sin embargo como se mencionó anteriormente, existe la posibilidad de contaminación de origen del material utilizado como control negativo se observó el mismo comportamiento, por lo que se podría esperar que en el gel amplificaran ya que el tamaño de amplicón son muy cercanos entre ellos el algodón GM un amplicón de 94 bp y el algodón no GM 74 bp, pero se observó que el NTC no amplificó por lo tanto se descarta la contaminación de los reactivos.

Debido a que el control negativo presenta amplificación se puede pensar que el ADN de algodón no GM contiene trazas del E.E. MON-88913-8, pero también se comprueba que la detección más baja de mezcla es de 0.025% OGM ya que presenta amplificación en su totalidad de 10 reacciones cubriendo así con más del 95% esperados.

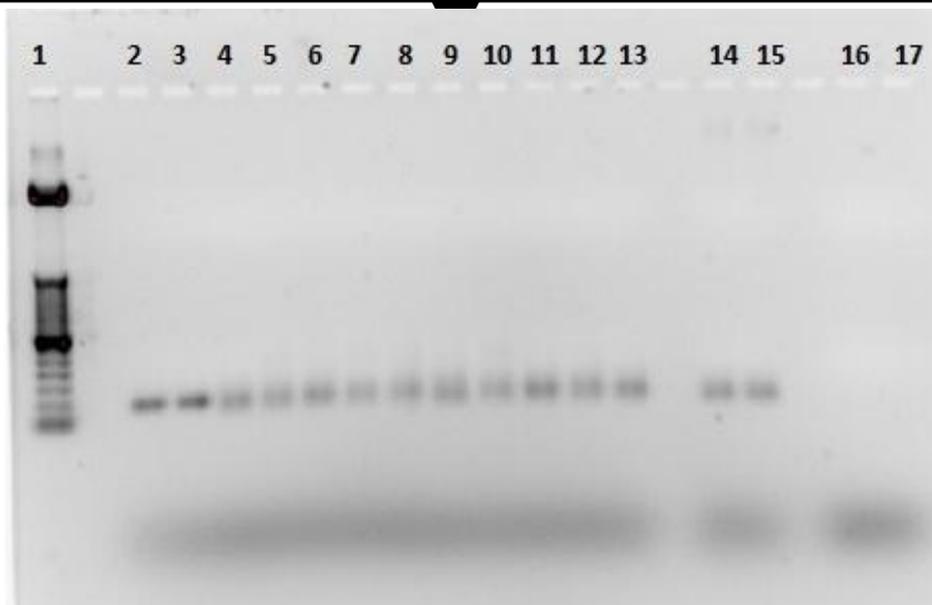


Figura 14. Amplificación del E.E MON-888913-8 en la mezcla 0.025% por PCR-pf, Carril 1 está el marcado de peso molecular, carriles 2 y 3: control positivo, Carriles 4 a 13: muestras de la mezcla 0.025%OGM, Carriles 14 y 15: control negativo y Carriles 16 y 17 NTC.

6.6 Intervalo dinámico, Eficiencia de amplificación, Coeficiente de correlación (R^2).

Se realizó la cuantificación de las mezclas de algodón construyendo una curva de calibración en cantidades de 100, 10, 1 y 0.1ng para la secuencia E.E. MON-88913-8 y para la secuencia endógena, los resultados se observan en las Tablas 12 y 13. Para poder realizar el análisis estadístico se tomó en cuenta los parámetros de eficiencia de amplificación, el cual está relacionado directamente con la pendiente, el coeficiente de correlación y el intervalo dinámico para poder establecer si existe linealidad en las curvas de calibración.

Para cumplir con el Intervalo dinámico, el cual describe las concentraciones sobre el cual el método desarrollado presente linealidad aceptable, tomando en cuenta la eficiencia de amplificación, la pendiente y el coeficiente de correlación, para estos parámetros se tomaron en cuenta los ensayos de cuantificación.



El parámetro de eficiencia de amplificación se evaluó a partir de ensayo de cuantificación en diferentes termocicladores, a partir del cálculo con la siguiente ecuación:

$$\%Eficiencia = \left(10^{-1/m} - 1\right) \times 100 \quad \text{Ec. (6)}$$

Donde:

m: es la pendiente de la curva

El valor del coeficiente de correlación (R^2) se obtuvo a partir de la regresión lineal de la curva, donde establece que debe ser mayor a 0.98 por lo que permite establecer la linealidad de la curva de calibración para poder aceptarla para proseguir con los análisis estadísticos posteriores.

En la Tabla 12 se presentan los resultados a obtenidos de los equipos LC-480 y ViiA-7, donde se muestra el porcentaje de la eficiencia de amplificación para la secuencia endógena y la secuencia GM, obtenidos por el cálculo de la ecuación 7 de igual manera se presentan los resultados de R^2 . Es importante mencionar que para el equipo LC480 se obtienen más datos ya que se trabajó con placas de 96 pozos por lo que se separó el ensayo de cuantificación ya que no cubría la placa todos los porcentajes de GM por lo cual para cada ensayo se tenían que realizar curvas de calibración para cada placa, en cuando para el equipo ViiA-7 se trabajó con placas de 384 pozos y en esta cabían todas las mezclas.



Tabla 12. Eficiencia de amplificación de la reacción de qPCR y coeficiente de correlación (R^2) obtenido de ensayos de cuantificación ejecutados en los termocicladores LC-480 y ViiA7

Equipo		Target	Pendiente	R^2	Eficiencia amplificación (%)
LC-480	Ensayo 1	MON-88913-8	-3.536	0.99	91.80
		acp-1	-3.527	0.99	92.10
		MON-88913-8	-3.556	0.99	91.10
		acp-1	-3.447	0.99	95.00
	Ensayo 2	MON-88913-8	-3.292	0.99	101.20
		acp-1	-3.163	0.99	107.10
		MON-88913-8	-3.556	0.99	91.10
		acp-1	-3.426	0.99	95.80
ViiA-7	Ensayo 1	MON-88913-8	-3.374	0.99	97.07
		acp-1	-3.463	0.99	94.42
	Ensayo 2	MON-88913-8	-3.378	0.99	97.73
		acp-1	-3.488	1.00	93.52

El valor de eficiencia de amplificación está relacionado directamente con el valor teórico de la pendiente de la recta la cual establece que debe estar entre -3.1 a -3.6 y donde se observa que el valor obtenido por el software demuestra que sí están dentro de lo señalado, de acuerdo al criterio de aceptación de eficiencia de amplificación de la reacción donde, el rango debe de estar entre 90 a 110% de eficiencia. Respecto a los cálculos obtenidos, se observan que los valores están dentro de lo establecido por el criterio de aplicación, por lo que la reacción se llevó de manera eficiente. De igual manera, se presenta el valor de coeficiente de correlación representando la linealidad del ensayo de qPCR, es decir, la relación existente entre una variable dependiente y una variable independiente, el R^2 de acuerdo al criterio de aplicación debe de ser mayor o igual a 0.98 y se observa que los valores están dentro del esquema de aplicación, siendo aceptable la linealidad en los ensayos cuantitativos realizados (Anexo III).

Con base en los resultados anteriores se corrobora que los parámetros están dentro del rango dinámico ya que para este parámetro se toman en cuenta las concentraciones mayores e inferiores donde establece que debe incluir la decima



parte y al menos 5 veces la concentración la secuencia blanco, y comprobando así la linealidad de las curvas, cumpliendo con lo señalado en el criterio.

En la Figura 15 se observa un ejemplo de la representación grafica de una amplificación de una curva de calibración obtenida de un ensayo para evaluar el límite de cuantificación, a través de la medición de evento específico MON-88913-8, utilizando como calibrante algodón GM (100%), los valores obtenidos de la medición en conjunto definen el intervalo dinámico, es decir, el rango de concentraciones. La curva sirvió para la aceptación del ensayo a partir de los criterios estadísticos correspondientes para el ensayo, se contemplaron concentraciones inferiores y superiores al umbral permisible de OGM, que es de 2% de acuerdo a la legislación (0.1, 1, 10 y 100 ng/ μ L), también se demostró mediante la amplificación de la curva de calibración la linealidad que mantiene dentro de ese rango de concentraciones para la secuencia endógena y para la secuencia GM, ya que se observa un coeficiente de correlación mayor a 0.98 y una pendiente entre -3.2 y -3.4, por consiguiente una eficiencia de amplificación entre los valores esperados de 90-110% y dando así que la curva es aceptable (Anexo III).

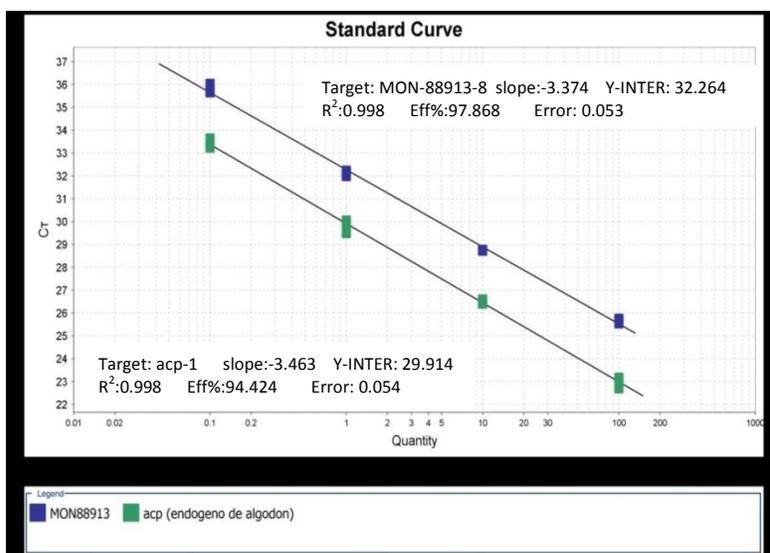


Figura 15. Imagen de un ensayo de cuantificación, como calibrante el ADN E.E MON-88913-8, ejecutado en el Termociclador ViiA7, los puntos verdes representan el endógeno y los puntos azules la secuencia GM.



6.7 Cuantificación de mezclas GM (LC).

Para realizar la evaluación de el Límite de cuantificación se utilizaron las mezclas de porcentaje de GM conocido (100, 10, 1, 0.1%) consideradas por que están dentro del esquema del intervalo dinámico, donde mantiene un nivel de precisión y linealidad para a el análisis de OGM por la técnica de qPCR, se determinó bajo condiciones de repetibilidad y/o Reproducibilidad, es decir, el mismo procedimiento, mismo analito, mismas condiciones, diferente DNA Polimerasa, Diferente Termociclador y dos analistas.

El límite de cuantificación fue evaluado mediante la construcción de una curva de calibración con dilución serial a 1:10 a partir del ADN de algodón 100% tanto para la secuencia E.E y para la secuencia endógena, la cual fue analizada previamente para corroborar que estén dentro de lo estableció de intervalo dinámico (Tabla 12), evaluando también la eficiencia de amplificación y R^2 .

El porcentaje de la secuencia GM de cada mezcla se calculo con la siguiente ecuación:

$$\%OGM = \left(\frac{\text{Cantidad de secuencia GM}}{\text{Cantidad del gen de referencia}} \right) \times 100 \quad \text{Ec. (7)}$$

Se realizó un total de 10 reacciones para cada mezcla de GM y 10 para el endógeno.

Se realizó en 2 termocicladores esto es para saber si el método es repetible y/o Reproducible, los termocicladores utilizados fueron LC-480 y ViiA7.

El cálculo de las concentraciones de algodón GM se realizó con base en los valores de amplificación emitidos por el software de cada equipo (AnexoIII).

Se realizaron dos ensayos para cada termociclador, por lo que a continuación se presentan los resultados por separado para cada termociclador.



En la Tabla 13 se presentan los resultados del ensayo para la determinación del límite de cuantificación con dos ensayos para el equipo de ViiA-7.

Tabla 13. Límite de cuantificación de mezclas de algodón GM equipo ViiA7

Equipo		ViiA-7							
		Ensayo 1				Ensayo 2			
Repeticiones	Mezcla 0.1%	Mezcla 1%	Mezcla 10%	Mezcla 100%	Mezcla 0.1%	Mezcla 1%	Mezcla 10%	Mezcla 100%	
I	0.10	0.83	10.41	123.34	0.10	0.9	8.56	93.00	
II	0.10	0.83	10.41	123.34	0.10	0.9	8.56	93.00	
III	0.09	0.84	9.81	102.51	0.06	0.5	9.63	93.00	
IV	0.09	0.84	9.81	102.51	0.06	0.5	9.63	93.00	
V	0.08	0.74	9.44	118.21	0.06	0.6	8.95	99.94	
VI	0.08	0.74	9.44	118.21	0.06	0.6	8.95	99.94	
VII	0.07	0.66	8.13	122.73	0.08	0.8	9.08	94.90	
VIII	0.07	0.66	8.13	122.73	0.08	0.8	9.08	94.90	
IX	0.06	0.66	10.27	98.38	0.06	0.5	8.68	94.22	
X	0.06	0.66	10.27	98.38	0.06	0.5	8.68	94.22	
Promedio	0.08	0.75	9.61	113.03	0.07	0.67	8.98	95.01	
RSDr (UA)	0.01	0.08	0.86	11.08	0.02	0.15	0.40	2.71	

En la Tabla 14 se presentan los resultados del ensayo para la determinación del límite de cuantificación obtenidos por el software LC-480, por las dos ensayos aplicando la ecuación (7) obteniendo los siguientes resultados.



Tabla 14. Límite de cuantificación de mezclas de algodón GM, equipo LC-480

Equipo	L.C-480							
	Ensayo 1				Ensayo 2			
Repeticiones	Mezcla 0.1%	Mezcla 1%	Mezcla 10%	Mezcla 100%	Mezcla 0.1%	Mezcla 1%	Mezcla 10%	Mezcla 100%
I	0.14	1.21	9.91	90.94	0.11	0.84	10.89	95.50
II	0.10	1.06	9.92	90.99	0.10	0.86	10.48	99.57
III	0.14	1.04	10.08	93.30	0.07	0.84	10.40	100.65
IV	0.14	1.00	9.92	96.00	0.07	0.76	10.99	100.33
V	0.12	1.08	10.50	90.47	0.10	0.84	11.03	101.95
VI	0.12	0.96	10.50	94.37	0.11	0.78	10.82	98.30
VII	0.12	0.96	10.26	93.17	0.10	0.90	10.95	97.26
VIII	0.14	0.94	9.91	97.36	0.10	0.81	11.01	94.82
IX	0.12	0.86	10.09	90.65	0.09	1.11	10.85	95.60
X	0.11	0.92	10.35	95.25	0.09	0.77	10.70	95.58
Promedio	0.12	1.00	10.14	93.25	0.09	0.85	10.81	97.96
RSDr (UA)	0.02	0.10	0.24	2.46	0.02	0.10	0.22	2.56

Los datos anteriores muestran el porcentaje de OGM determinado a partir de las mezclas de algodón GM.

Con base en resultados obtenidos de los ensayos en ambos equipos, se estableció que hay linealidad en las curvas de calibración a partir de la dilución serial 1:10 ya que los parámetros están dentro de lo establecido previamente, por lo tanto se pudo realizar el cálculo de porcentaje de OGM.

Como se observa en las Tablas 13 y 14 los resultados obtenidos son muy cercanos a los esperados ya que hay diferencia en decimales de los valores obtenidos de %OGM, en los ensayos se observa que los resultados no son dispersos ya que la desviación estándar (SDr/UA) es pequeña en casi todos los casos.

Por lo anterior se establece que la cantidad de OGM más pequeña que se puede cuantificar es de 0.1%, en condiciones de repetibilidad y nivel de confianza aceptable.



Parámetros evaluados a partir de LC:

Después de haber obtenido la cuantificación de las mezclas se procedió a realizar el análisis estadístico el cual está basado principalmente en la desviación estándar relativa, la estimación de la incertidumbre y Robustez, para poder saber si el método de qPCR es el indicado para la detección y cuantificación de OGM.

6.7.1 Precisión: Desviación estándar relativa de reproducibilidad y desviación estándar de Repetibilidad (RSDr/R).

La evaluación del parámetro analítico de la precisión de la metodología para el análisis de OGM por la técnica de PCR se determinó bajo condiciones Repetibilidad y Reproducibilidad mencionadas previamente.

El parámetro se obtuvo calculando la desviación estándar (SD) bajo las condiciones antes escritas con la siguiente ecuación:

$$SDr/R = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad \text{Ec. (8)}$$

Donde:

SDr/R: es la desviación estándar

s: es la desviación promedio de la serie de datos de cada medición

n: es el número de repeticiones de cada medición

Posterior al cálculo de la desviación estándar, se determinó la desviación estándar relativa (RSD) bajo condiciones de reproducibilidad y/o Repetibilidad con la Ec. (8) para evaluar la Precisión de la metodología:

$$RSDr/R = \frac{SD}{X} \times 100 \quad \text{Ec. (9)}$$

Donde:

RSDr/R: es la desviación estándar relativa

SD: la desviación estándar

X: es la media del contenido de GM en %m/m.



A continuación se presentan los resultados obtenidos a partir de ensayos de cuantificación de los termocicladores LC-480 y ViiA-7 bajo condiciones de repetibilidad.

En la Tabla 15 se presentan los resultados de desviación estándar relativa (RSDr), para los termocicladores LC-480 y ViiA-7, recordando que se realizaron dos ensayos para cada termociclador, bajo condiciones **de repetibilidad**.

Tabla 15. Resultados de desviación estándar relativa bajo condiciones de Repetibilidad, para ambos equipos.

Equipo		Ensayo 1				Ensayo 2			
		Mezcla 0.1%	Mezcla 1%	Mezcla 10%	Mezcla 100%	Mezcla 0.1%	Mezcla 1%	Mezcla 10%	Mezcla 100%
ViiA-7	Promedio	0.08	0.75	9.61	113.03	0.07	0.67	8.98	95.01
	RSDr (UA)	0.01	0.08	0.86	11.08	0.02	0.15	0.4	2.71
	SDr/R (u)	0.005	0.026	0.272	3.504	0.005	0.048	0.126	0.857
	RSDr	5.85	3.54	2.83	3.1	6.87	7.11	1.4	0.9
LC-480	Promedio	0.12	1.00	10.14	93.25	0.09	0.85	10.81	97.96
	RSDr(UA)	0.02	0.1	0.24	2.46	0.02	0.1	0.22	2.56
	SDr/R (u)	0.005	0.031	0.076	0.779	0.005	0.032	0.07	0.81
	RSDr	3.97	3.11	0.75	0.84	5.12	3.73	0.65	0.83

De acuerdo con los resultados obtenidos de la ecuación 9, y donde al criterio de aplicación de precisión establece que la desviación estándar relativa tendrá que ser $\leq 25\%$, bajo condiciones de repetibilidad, se observa en los resultados que ésta no rebaza el criterio de aplicación ya que existe concordancia entre los resultados de acuerdo al contenido de GM de cada mezcla, y por lo tanto el nivel de precisión es aceptado.

En la Tabla 16 se presentan los resultados de desviación relativa bajo condiciones de repetibilidad, tomando en cuenta los dos ensayos para cada termociclador, teniendo así desviación estándar relativa para cada equipo.



Tabla 16. Resultados de desviación estándar relativa bajo condiciones de repetibilidad, tomando en cuenta ambos ensayos de cada equipo.

Equipo	LC-480				ViiA-7			
	Mezcla 0.1%	Mezcla 1%	Mezcla 10%	Mezcla 100%	Mezcla 0.1%	Mezcla 1%	Mezcla 10%	Mezcla 100%
Promedio	0.11	0.92	10.48	95.6	0.08	0.71	9.3	104.02
RSDr (UA)	0.02	0.12	0.41	3.44	0.02	0.13	0.73	12.13
SDr/R (u)	0.005	0.028	0.092	0.769	0.003	0.028	0.163	2.712
RSDr	4.42	3.00	0.87	0.80	4.49	3.95	1.75	2.61

En la Tabla 16 se observa que el valor de desviación estándar relativa en todos los casos está por debajo de lo establecido por el criterio de aplicación dice que debe ser $\leq 25\%$, la precisión de ambos equipos es muy cercana por lo que existe concordancia entre los resultados, teniendo así un método preciso y confiable.

La parte de **Reproducibilidad** es evaluada para establecer la proximidad de concordancia entre las mediciones, y que al variar de analista pero utilizando el mismo método los resultados presenten correlación y no se vea afectada por ciertas condiciones de variables. Esta parte fue evaluada por otro técnico especialista en el análisis de OGM, donde los resultados numéricos se muestran en el Anexo IV.

En la Tabla 17 se muestran los resultados bajo condiciones de Reproducibilidad, obtenidos de ensayos de cuantificación de los termocicladores LC480 y ViiA-7.



Tabla 17. Resultado de desviación estándar relativa para los equipos LC480 y ViiA7

Equipo	L.C-480				ViiA-7			
	MON-88913-8	acp-1	MON-88913-8	acp-1	MON-88913-8	acp-1	MON-88913-8	acp-1
Pendiente	-3.416	-3.516	-3.453	-3.429	-3.496	-3.531	-3.368	-3.44
R ²	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99
% Efic.	96.20	92.50	94.80	95.90	93.21	91.96	98.11	95.32
Repeticiones	Mezcla 0.1%	Mezcla 1%	Mezcla 10%	Mezcla 100%	Mezcla 0.1%	Mezcla 1%	Mezcla 10%	Mezcla 100%
I	0.12	0.97	9.29	101.96	0.07	0.72	8.07	93.74
II	0.14	0.98	9.34	98.06	0.07	0.72	8.07	93.74
III	0.14	1.02	9.85	101.27	0.08	0.74	7.84	91.95
IV	0.12	1.00	10.26	98.18	0.08	0.74	7.84	91.95
V	0.13	0.98	9.43	100.65	0.08	0.77	8.34	93.91
VI	0.13	1.01	9.81	95.06	0.08	0.77	8.34	93.91
VII	0.10	1.03	10.09	95.19	0.09	0.77	8.51	87.92
VIII	0.08	1.04	10.11	95.48	0.09	0.77	8.51	87.92
IX	0.10	1.00	9.51	95.99	0.1	0.77	8.08	89.39
X	0.12	1.02	9.91	99.12	0.1	0.77	8.08	89.39
Promedio	0.12	1.00	9.76	98.10	0.08	0.75	8.17	91.38
RSDr(UA)	0.02	0.02	0.35	2.62	0.01	0.02	0.25	2.50
SDr/R (u)	0.006	0.007	0.110	0.827	0.003	0.007	0.078	0.792
RSDr/R	4.61	0.73	1.13	0.84	3.40	0.91	0.95	0.87

Con base en los resultados de la Tabla 16, la desviación estándar relativa se encuentra por debajo de lo establecido en el criterio de aplicación de precisión que indica que debe ser $\leq 25\%$, por lo que los resultados están correlacionados, haciendo al método de qPCR sea preciso y confiable.

Para corroborar que el método de qPCR es confiable y preciso se realizó el cálculo de desviación estándar relativa tomando en cuenta los dos termocicladores utilizados y el número de ensayos para cada equipo, teniendo así una RSDr/R m para cada analista y una global.

En la Tabla 18 se muestran los resultados de desviación estándar relativa bajo condiciones de repetibilidad y Reproducibilidad [RSDr/R].



Tabla 18. Desviación estándar relativa por método qPCR, tomando en cuenta ambos equipos, bajo condiciones RSDr/R

Mezcla (%)	RSDr	RSDr	RSDR
	Analista 1	Analista 2	
100	4.25	4.06	2.51
10	3.19	3.32	2.41
1	1.34	2.17	1.28
0,1	1.55	1.00	1.14

En la Tabla 17 se muestra la concordancia que existe entre los resultados, es decir, el método de qPCR presenta una desviación estándar relativa [RSDr/R] por debajo del límite establecido $\leq 25\%$, por lo que se puede decir que el análisis de la metodología de qPCR es precisa y confiable ya que existe concordancia entre los resultados obtenidos, y aun variando de analista los resultados fueron cercanos, por lo que el método qPCR es adecuado para el análisis de OGM.

Debido a que los resultados para evaluar la repetibilidad y Reproducibilidad se observa están por debajo de lo señalado, que es de $\leq 25\%$, se concluye que el método de qPCR es preciso y adecuado para la detección y cuantificación de OGM.

6.7.2 Incertidumbre

En general, el resultado de una medición solo es una aproximación o estimado del valor del mensurando esta se reporta asociando un número al resultado de la medida que indicada el intervalo de los posibles valores que pueden ser obtenidos del proceso se medida y atributos al mensurando. La incertidumbre caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mensurando.

La incertidumbre típica o estándar (u) es la incertidumbre del resultado de una medición expresada como una desviación estándar o intervalo. La incertidumbre típica combinada (u_c) del resultado de una medición es el resultado de la suma no aditiva si no cuadrática de las varianzas de los factores que afectan el resultado de



un mensurando. La incertidumbre expandida (U) es el resultado de la multiplicación de la uc por un factor de cobertura (k) determinado. La incertidumbre relativa es una desviación estándar relativa de la muestra, esta indica la proporción del porcentaje, respecto a la media aritmética de la muestra.

La estimación de la incertidumbre asociada al mensurando de cuantificación se obtuvo a partir de la distribución estadística de los resultados analíticos cuantitativos de una serie de mediciones experimentales y se caracteriza mediante desviaciones estándar.

La estimación de la incertidumbre de los ensayos de cuantificación de secuencias por la técnica de PCR, en el CNRDOGM se calculó haciendo uso de las siguientes ecuaciones:

$$uc = \sqrt{u(C_{ref})^2 + u(RSD_{IP})^2} \quad \text{Ec. (10)}$$

Donde

uc: incertidumbre típica o combinada.

$u(C_{ref})$: incertidumbre del componente o material de referencia.

$u(RSD_{IP})$: incertidumbre del componente de medición en condiciones de repetibilidad y/o reproducibilidad.

$$u(RSD_{IP}) = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad \text{Ec. (11)}$$

Donde

$u(RSD_{IP})$: incertidumbre del componente de medición en condiciones de repetibilidad y/o reproducibilidad.

SD: promedio de la desviación estándar de la medición.

n: número de veces de repeticiones de la medición.

$$U = (uc) * k \quad \text{Ec. (12)}$$

Donde

U: incertidumbre expandida

K: factor de cobertura (igual a 2 representando por un intervalo de confianza del 95.45%)



$$U_{relativa} = \left(\frac{u}{x}\right) \times 100$$

Ec. (13)

Donde

$U_{relativa}$: es la incertidumbre de la medición.

u : es la incertidumbre expandida.

x : es el promedio en % de OGM de cada medición.

Cabe mencionar que no existe ningún criterio de aplicación para la estimación de la incertidumbre debido a que este dependerá del método aplicado y de los componentes asociados a la contribución de la estimación de la incertidumbre, por lo cual los estimados serán internos del método.

Se estimó la incertidumbre con un factor de cobertura $k=2$, representando un 95% de intervalo de confianza.

Como se mencionó previamente la reproducibilidad se basa en diferentes analistas, mismo mensurando y mismos equipo, en este caso el analito se refiere a la matriz de algodón GM.

A continuación se muestran los resultados obtenidos de incertidumbre a partir de los ensayos de cuantificación en condiciones de repetibilidad. El cálculo de incertidumbre se realizó tomando en cuenta, primero por ensayos, seguido por equipos y terminando con una incertidumbre global, es decir, hasta llegar a evaluar el método de qPCR.

En la Tabla 19 se muestran los resultados obtenidos a partir de las ecuaciones 10, 11, 12 y 13 previamente descritas, hasta llegar al incertidumbre relativa ensayo realizado en el equipo ViiA-7.



Tabla 19. Resultados Obtenidos de la estimación de incertidumbre de cada medición de GM conocida, equipo ViiA-7.

Equipo	ViiA-7							
	Ensayo 1				Ensayo 2			
	Mezcla 0.1%	Mezcla 1%	Mezcla 10%	Mezcla 100%	Mezcla 0.1%	Mezcla 1%	Mezcla 10%	Mezcla 100%
Promedio	0.08	0.75	9.61	113.03	0.07	0.67	8.98	95.01
RSDr(UA)	0.01	0.08	0.86	11.08	0.02	0.15	0.40	2.71
SDr/R (u)	0.005	0.026	0.272	3.504	0.005	0.048	0.126	0.857
RSDr/R	5.85	3.54	2.83	3.10	6.87	7.11	1.40	0.90
u combinada	0.005	0.026	0.272	3.504	0.005	0.048	0.126	0.857
U Expandida	0.01	0.05	0.54	7.01	0.01	0.10	0.25	1.71
U Relativa	11.69	7.09	5.66	6.20	13.73	14.22	2.80	1.80

En la Tabla 20 se presentan los resultados obtenidos a partir de las ecuaciones 10, 11, 12 y 13 descritas previamente, hasta obtener una incertidumbre asociada al equipo utilizado LC-480.

Tabla 20. Resultados Obtenidos de la estimación de incertidumbre de cada medición de GM conocida, equipo LC-480.

Equipo	LC-480							
	Ensayo 1				Ensayo 2			
	Mezcla 0.1%	Mezcla 1%	Mezcla 10%	Mezcla 100%	Mezcla 0.1%	Mezcla 1%	Mezcla 10%	Mezcla 100%
Promedio	0.12	1.00	10.14	93.25	0.09	0.85	10.81	97.96
RSDr (UA)	0.02	0.10	0.24	2.46	0.02	0.10	0.22	2.56
SDr/R (u)	0.005	0.031	0.076	0.779	0.005	0.032	0.070	0.811
RSDr/R	3.97	3.11	0.75	0.84	5.12	3.73	0.65	0.83
u combinada	0.005	0.031	0.076	0.779	0.005	0.032	0.070	0.811
U Expandida	0.01	0.06	0.15	1.56	0.01	0.06	0.14	1.62
U Relativa	7.93	6.22	1.50	1.67	10.24	7.45	1.29	1.66

Como se puede observar en los resultados de las Tablas 18 y 19 la estimación de la incertidumbre se encuentra en un rango de 7.9 a 1.6 los cuales se encuentran dentro de los valores previamente obtenidos en el CNRDOGM atribuyendo valores de incertidumbre de $\pm 50\%$ en concentraciones de 0.1 a 0.9% GM y $\pm 30\%$ en



concentraciones de 1 a 100% GM de esta forma se observa que todos los valores obtenidos en el presente estudio son concordantes con lo establecido en el CNRDOGM.

En la Tabla 21 se presentan los resultados de estimación de incertidumbre tomando en cuenta los dos ensayos de cada equipo permitiendo así una comparación entres ellos.

Tabla 21. Estimación de incertidumbre de cada medición de GM conocida, tomando en cuenta los dos ensayos correspondientes a cada equipo.

Equipo	LC-480				ViiA-7			
	Mezcla 0.10%	Mezcla 1.00%	Mezcla 10%	Mezcla 100%	Mezcla 0.10%	Mezcla 1.00%	Mezcla 10%	Mezcla 100%
Promedio	0.11	0.92	10.48	95.60	0.08	0.71	9.30	104.02
u combinada	0.01	0.04	0.10	1.12	0.01	0.05	0.30	3.61
U Expandida	0.01	0.09	0.21	2.25	0.01	0.11	0.60	7.21
U Relativa	12.62	9.60	1.97	2.35	17.98	15.38	6.45	6.94

Para poder determinar la incertidumbre relativa se tomó en cuenta, los dos ensayos para cada equipo y para ello se determinó mediante la ecuación 14 la incertidumbre combinada que asocia los datos de los ensayos, es decir, toma en cuenta la sumatoria de la desviación estándar de medición de los ensayos, teniendo así una sumatoria de las incertidumbres.

$$uc = \sqrt{\sum u(RSD_{IP})^2} \quad \text{Ec. (14)}$$

uc: incertidumbre típica o combinada.

u(RSD_{IP}): incertidumbre del componente de medición en condiciones de repetibilidad y/o reproducibilidad.

Como se observa en los resultados de la Tabla 20 y partiendo de la ecuación 14 que establece la incertidumbre combinada (uc) que sirve para poder determinar la estimación de la incertidumbre con la ecuación 13, no rebasan el límite establecido



por CNRDOGM que atribuye valores de valores de $\pm 50\%$ en concentraciones de 0.1 a 0.9% GM y $\pm 30\%$ en concentraciones de 1 a 100% GM, se observa la dispersión de los valores atribuidos al mensurando (mezclas de GM), son pequeñas por lo que no tiene un impacto en el estimado de OGM, se observa además una tendencia a aumentar la incertidumbre esto se debe a la sumatoria de las incertidumbres.

Como se ha mencionado previamente la condición de **Reproducibilidad** es un factor importante porque corrobora que el método sea apto para el análisis realizado, se calculó la estimación de incertidumbre del segundo analista, usando mismo analito diferente día de análisis y mismos equipos.

En la Tabla 22 se muestran los resultados de estimación de incertidumbre, realizado por el segundo analista en dos equipos de termociclaodres en tiempo real.

Tabla 22. Estimación de la incertidumbre del analista 2

Equipo	L.C-480				Viia-7			
	Mezcla 0.1%	Mezcla 1%	Mezcla 10%	Mezcla 100%	Mezcla 0.1%	Mezcla 1%	Mezcla 10%	Mezcla 100%
Promedio	0.12	1.00	9.76	98.10	0.08	0.75	8.17	91.38
RSDr(UA)	0.02	0.02	0.35	2.62	0.01	0.02	0.25	2.50
SDr/R (u)	0.006	0.007	0.110	0.827	0.003	0.007	0.078	0.792
RSDr/R	4.61	0.73	1.13	0.84	3.40	0.91	0.95	0.87
u combinada	0.006	0.007	0.110	0.827	0.003	0.007	0.078	0.792
U Expandida	0.01	0.01	0.22	1.65	0.01	0.01	0.16	1.58
U Relativa	9.21	1.46	2.25	1.69	8.09	1.82	1.90	1.73

Como se observa en los resultados obtenidos, la estimación de la incertidumbre está por debajo de lo establecido por el CNRDOGM, por lo que los valores atribuidos pueden ser despreciables, es decir no muestran un impacto en el estimado de OGM.



Para poder asociar una incertidumbre al método de qPCR, se tomaron en cuenta los resultados de los analistas, así los resultados presentados en la Tabla 23 muestra la estimación de incertidumbre de cada analista y donde se tomaron los resultado de ambos equipos y una global tomando en cuenta todos los resultados de los dos equipos.

Tabla 23. Estimación de incertidumbre asociada al método qPCR

Mezcla GM (%)	U _{relativa}		
	Analista 1	Analista 2	Global
100	7.57	2.42	8.05
10	6.41	3.00	7.19
1	17.21	2.29	16.95
0,1	20.97	13.21	24.69

Como se observa en los resultados anteriores la estimación de la incertidumbre, no rebasan el límite establecido por CNRDOGM, ha establecido que la incertidumbre debe ser $\pm 50\%$ en concentraciones de 0.1 a 0.9 % GM y $\pm 30\%$ en concentraciones de 1 a 100 % GM. Se observa la dispersión de los valores atribuidos al mensurando (mezclas de GM), son pequeñas por lo que no tiene un impacto en el estimado de OGM.

6.7.3 Robustez

Para evaluar la robustez se tomó en cuenta los ensayos de cuantificación de los dos analistas, tomando así todos los ensayos realizados, es decir, se tomaron en cuenta 6 ensayos para evaluar de igual manera el método de qPCR.

A continuación se muestra de manera resumida los resultados en la Tabla 24, demostrando que bajo las variaciones de diferente analista, termociclador y ADN Polimerasa, la desviación estándar relativa (RSDr/R) está por debajo de lo señalado (30%), y también muestra una estimación del incertidumbre por debajo de lo establecido por el CNRDGOM para la mezcla de 0.1 menor a 50% y para las mezclas 1-100% no es mayor al 30%, lo que significa que para el análisis de OGM



por la técnica de qPCR responde al objetivo y no se ve afectada por las variaciones mencionadas, dando emisión de resultados sin afectarse, siendo confiable y robusto el método de qPCR.

Tabla 24. Resultados obtenidos a partir de variación de los ensayos.

	Mezcla 0.1%	Mezcla 10%	Mezcla 10%	Mezcla 100%
Promedio	0.09	0.84	9.58	98.12
RSDr(UA)	0.02	0.16	0.95	8.65
SDr/R (u)	0.003	0.020	0.122	1.117
RSDr/R	3.28	2.41	1.28	1.14
$U_{\text{combinada}}$	0.01	0.07	0.34	3.95
$U_{\text{Expandida}}$	0.02	0.14	0.69	7.90
U_{Relativa}	24.69	16.95	7.19	8.05

Con los resultados antes mostrados se concluye que la metodología presentada para la detección, identificación y cuantificación de algodón GM es confiable, precisa y apta para las necesidades de análisis en el CNRDOGM.



7. Conclusión

El método de extracción de ADN utilizado es apto para la metodología propuesta ya que las concentraciones obtenidas resultaron altas y esto permitió estandarizar de manera eficiente a 50 ng/ μ L, ya que para los ensayos posteriores se necesitaba esa concentración y porque la determinación de inhibidores se obtuvieron resultados dentro del criterio de aplicación que es señala que el $\Delta Ct \leq 0.5$, por lo que corrobora que el método de extracción es correcto ya que el ADN presenta integridad y ausencia de inhibidores.

Se comprobó la especificidad de la sonda e iniciadores utilizados correspondientes al E.E. MON-88913-8, sin presentar amplificaciones con los demás ADN utilizados, comprobando la especificidad de la sonda e iniciadores.

En cuanto al límite de detección se obtuvo amplificación en su totalidad para la mezcla de OGM de 0.025% para los tres equipos de termocicladores utilizados, estableciendo así que la cantidad más pequeña que puede ser detectada pero no cuantificada es de 0.025% GM ya que cubre con más del 95% esperado.

Se logró obtener los resultados para validar los ensayos cuantitativos, evaluando las curvas de calibración y comprobando que todas ellas están dentro de lo señalado por los criterios de aplicación teniendo así que la eficiencia está entre 90-110% todas están dentro de los valores de la pendiente que van de -3.1 a -3.6, y en cada curva se obtuvo un R^2 mayor a 0.98 cumpliendo así con el intervalo dinámico ya que presentan linealidad, cumpliendo con dichos parámetros se pudo realizar el cálculo de % OGM con porcentajes conocidos (0.1, 1, 10,100%) para los equipos ViiA-7 y LC-480, se obtuvieron resultados cercanos a los esperados, estableciendo así que el límite de cuantificación más bajo que se puede cuantificar es de 0.1% GM.



Dentro del análisis estadístico se obtuvo que el método es preciso ya que al obtener la desviación estándar relativa que establece $<30\%$, se encuentran por debajo de lo señalado demostrando así que el método es confiable y preciso.

En cuanto a la estimación de la incertidumbre se obtuvieron resultados que están en concordancia con lo determinado por el CNRDOGM que estableció que para mezclas de 0.1-0.9% el límite es $\pm 50\%$, mientras que para mezclas de 1-100% el límite es de $\pm 30\%$, bajo condiciones de repetibilidad y Reproducibilidad, por lo que los resultados obtenidos están dentro de lo señalado, cumpliendo así con el requerimiento de robustez ya que aún variando las condiciones los requerimientos de precisión y estimación de incertidumbre están dentro de lo establecido, comprobando que el método de qPCR es confiable, ya que al cambiar de analista o de termociclador los resultados están dentro de lo establecido puesto que existe concordancia entre los resultados obtenidos.

Por lo anterior se prueba que la metodología para el análisis de algodón GM con E.E. MON-88913-8 por la técnica de qPCR ha sido validada ya que cumple con todos los requerimientos establecidos.

La validación permitió conocer las características de funcionamiento del método así como sus condiciones óptimas de trabajo, para evitar los posibles errores en los ensayos, cumpliendo requerimientos mencionados previamente como pureza de ADN, eficiencia de amplificación, coeficiente de correlación, pendiente, límite de detección, límite de cuantificación, precisión, estimación de incertidumbre y Robustez teniendo así resultados confiables y aptos para ser utilizado en CNRDOGM.



8. Bibliografía.

- 📖 Applied Biosystems, 2011, Introducción a la PCR en Tiempo Real Sistema ViiA™7, curso teórico-práctico de PCR Tiempo Real y sus aplicaciones, , Life Technologies.
- 📖 Bellocchi G., 2008, Springer, Expanding Horizons in the Validation, of GMO Analytical Methods: Fuzzy-based Expert Systems, pp 126-135
- 📖 CIBIOGEM, Informe anual de la situación general sobre la biodiversidad en México, 2011.
- 📖 Compendium of Reference Methods for OGM analysis, european union refernce laboratory for GM food an feed (EURL-GMFF), European Network of GMO laboratoruy (ENGL), 2010.
- 📖 CONABIO, Algodón, *Gossypium hirsutum*, Proyecto GEF-CIBIOGEM de Bioseguridad
- 📖 Costa J. 2004, reacción en cadena de la polimerasa (PCR a) a tiempo real, Enferm. Infecc. Microbiol. Clin 22(5):299-305
- 📖 CRL, 2009, Definition of Minimum Performance Requeriments for Analytical Methods of GMO Testing, European Network or GMO Laboratories (ENGL), 13 October 2009, Community Reference Laboratory), GM Food and Feed.
- 📖 Determination of the safety of Monsanto's cotton 88913 (Herbicide Tolerant Cotton)
- 📖 Dorak T., 2006, Real-time PCR, Taylor & Francis Group, New York.
- 📖 Heid, C. et al, 2008, Real Time, Quantitative PCR, USA
- 📖 Hernandez, M., et al. 2004. Development and comparison of four real-time polymerase chainreactions y stems for specific detection and quantification of Zea mays L. Journal of AgricultureFoodChemistry, 52, pp. 4632–4637.
- 📖 Holst A, et al, 2012, Detecting un-authorized genetically modified organisms (GMOs) and derivedmaterials, BiotechnolAdv (2012).
- 📖 James, C., 2011. Global status of commercializedbiotech/GM crops: 2010. ISAAABriefs-Executivesummary. Report: 42.



- 📖 Kirtin, E., Logan J, Soares M., 2004, Real-Time an essential guide. Horizon Bioscience.
- 📖 Lees M., 2003, Food authenticity and Traceability. Humber Institute of food and Fisheries, CRC, Press
- 📖 Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados, diario oficial de la federación, 18 marzo 2005, Ley DOF 18-03-2005
- 📖 Manual de procedimientos de criterios de aplicación de la Norma NMX-EC-17025-IMNC-2006/ISO/IEC 17025/2005 Guía
- 📖 Marmiroli, N., et al, Advance PCR techniques in identifying food components, Italy.
- 📖 Papazova, N.,et al. 2010.Evaluation of thereliability of maize referenceas saysfor GMO quantification. Analytical and BioanalyticalChemistry, 396, pp. 2189–2201.
- 📖 Querci M., Jeremini M., Van den Eede G. 2007, Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos Manual del Participante, Luxemburgo
- 📖 Silva A., Algodón Genéticamente Modificado, Agrobio, Bogotá 2005
- 📖 Schotrens, I., et al, 2010, Springer, Increased efficacy for in-house validation real-time PCR GMO detection methods, pp2213-2227.
- 📖 IMNC, 2010,Validacion de métodos analíticos, CA-L-VMA-4M-ED02
- 📖 Verification of analytical methods for GMO testing when implemanting interlaboratory valited methos, European Network or GMO Laboratories (ENGL), 2011 European Comission, Joint Research, Centre **(JRC)**, Luxemburgo.
- 📖 Zel J., 2006, Springer, Accreditation of GMO detection laboratories: improving reliability of GMO detection, pp531-535



Paginas web

-  Agrobio, 2012, Algodón GM. Disponible en: [último acceso 6 septiembre, 2012]

http://www.agrobiomexico.org.mx/index.php?option=com_k2&view=item&layout=item&id=94&Itemid=28

-  AngerBio, El algodón, utilidad, mejoramiento y situación, 2011. Disponible en: [último acceso 6 septiembre, 2012]

<http://www.porquebiotecnologia.com.ar/index.php?action=cuaderno&opt=5&tipo=1¬e=104>

-  Arias Ortiz C, *Et al*, 2003, Recomendaciones para el desarrollo y consolidación de la biotecnología en, Consejo nacional de ciencia y tecnología. Disponible en: [último acceso 25 junio 2012]

<http://www.cibiogem.gob.mx/Publicaciones/Documents/Biotec2ed/Recomendaciones.pdf>

-  Bolívar Zapata F., 2011, Para un uso Responsable de los Organismos Genéticamente Modificados, México , Ed. Academia Mexicana de Ciencias A.C. Disponible en: [último acceso 27 Junio 2012]

http://www.cibiogem.gob.mx/Docum_interes/Documents/Us-responsable-OGM.pdf

-  Bolivar Zapata F., 2003, Recomendaciones para el Desarrollo y Consolidación de la Biotecnología en México, México, Academia Mexicana de Ciencias A.C. Disponible en: [último acceso 27 de Junio 2012]

<http://www.cibiogem.gob.mx/Publicaciones/Documents/Biotec2ed/Recomendaciones.pdf>

-  Center for Environmental Risk Assessment. Disponible en: [último acceso 6 septiembre, 2012] http://cera-gmc.org/index.php?evidcode%5B%5D=MON88913&hstIDXCode%5B%5D=7&auDate1=&auDate2=&action=gm_crop_database&mode=Submit

-  Codex Alimentarius “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 CAC/GL 74-2010

Disponible en: [último acceso 2 julio 2012]

www.codexalimentarius.net/download/standards/.../CXG_074s.pdf



-  Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados CIBIOGEM, MEXICO 2012. Disponible en: [último acceso 5 julio 2012]
<http://www.cibiogem.gob.mx>
-  FAO, 2012, Quality assurance in the food control chemical laboratory, Dpto. Agricultura. Disponible en: [último acceso 2 Julio 2012]
<http://www.fao.org/docrep/T0845S/t0845s0c.htm>
-  GMO Detection method Database (GMDD). Disponible en: [último acceso 10 Julio 2012]
<http://gmdd.shgmo.org/primer/view/eventspecific/2342>
-  Identificación del herbicida glifosato, propiedades y toxicidad, 2000
Disponible en: [último acceso 6 septiembre, 2012]
http://www.dne.gov.co/recursos_user/documentos/Doc_tecnicos/glifosato.pdf
-  Marras Laboratory, Modes of energy transfer between fluorophores and quenchers, 2012. Disponible en: [último acceso 2 julio 2012]
http://www.molecular-beacons.org/toto/Marras_energy_transfer.html
-  Mornet, 2012, Methodes d'analyse de l'ADN application médicales et médico-légales, Laboratoire de génétique moléculaire humaine. Disponible en: [último acceso 12 Junio 2012]
<http://www.sesep.uvsq.fr/formation/methodes.html>
-  Mussin V, 2006, Organismos Genéticamente Modificados (OGM): Usos Alimentarios editorial Biblioteca del Congreso de la Nacional, Buenos Aires.
Disponible en: [último acceso 15 Junio 2012]
http://www.biblioteca.unp.edu.ar/bcentral/Doc_digitales/Organismos%20Geneticamente%20Modificados%20OGM_%20Usos%20Alimentarios.PDF
-  Protocolo de Cartagena sobre la seguridad de la biotecnología del convenio sobre la diversidad biológica, 2000. Montreal.
Disponible en: [último acceso 11 Junio 2012]
<http://www.cibiogem.gob.mx/Publicaciones/Documents/cartagena-protocol-es.pdf>



 Red mexicana de monitoreo,2012 Disponible en: [último acceso 9 Julio 2012]

<http://www.cibiogem.gob.mx/RedMexOGMs/Paginas/inicio.aspx>

http://cera-gmc.org/docs/mexico_2011/rojas.pdf

 Secretaria de Agricultura, Ganadera, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación, 2012. SAGARPA Disponible en: [último acceso 13 Julio 2012]

<http://www.sagarpa.gob.mx/Paginas/default.aspx>

 Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. 2012, SENASICA Disponible en: [último acceso 7 Julio 2012]

<http://www.senasica.gob.mx/>

 Vierstraete Andy, 1999, Principle of the PCR Disponible en: [último acceso 7 julio, 2012]

<http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>

ANEXO I

Corrida 947 Prueba de Inhibidores (Pureza ADN) E.E MON-889133-8 (MR185)

Corrida 947 Pureza ADN algodón MR185

Standard Curve

ViiA7

Well Position	Sample Name	Target	Task	Reporter	Quencher	CT	Ct Mean
A1	100A	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	25.645	25.684
A2	100A	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	25.544	25.684
A3	100A	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	25.590	25.684
A4	100A	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	25.620	25.684
A5	100A	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	25.619	25.684
A6	100A	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	25.689	25.684
A7	100A	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	25.689	25.684
A8	100A	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	25.756	25.684
A9	100A	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	25.775	25.684
A10	100A	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	25.915	25.684
A11						Undetermined	
A12		MON88913	NTC	FAM	NFQ-MGB	Undetermined	
B1	50A	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	26.668	26.573
B2	50A	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	26.520	26.573
B3	50A	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	26.486	26.573
B4	50A	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	26.518	26.573
B5	50A	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	26.532	26.573
B6	50A	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	26.563	26.573
B7	50A	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	26.584	26.573
B8	50A	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	26.561	26.573
B9	50A	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	26.622	26.573
B10	50A	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	26.678	26.573
B11						Undetermined	
B12		MON88913	NTC	FAM	NFQ-MGB	Undetermined	
C1	25A	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	27.751	27.692
C2	25A	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	27.672	27.692
C3	25A	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	27.693	27.692
C4	25A	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	27.667	27.692
C5	25A	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	27.697	27.692

C6	25A	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	27.684	27.692
C7	25A	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	27.703	27.692
C8	25A	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	27.670	27.692
C9	25A	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	27.710	27.692
C10	25A	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	27.667	27.692
C11						Undetermined	
C12		MON88913	NTC	FAM	NFQ-MGB	Undetermined	
D1	12.5A	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	28.719	28.629
D2	12.5A	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	28.716	28.629
D3	12.5A	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	28.549	28.629
D4	12.5A	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	28.581	28.629
D5	12.5A	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	28.623	28.629
D6	12.5A	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	28.683	28.629
D7	12.5A	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	28.685	28.629
D8	12.5A	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	28.630	28.629
D9	12.5A	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	28.582	28.629
D10	12.5A	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	28.525	28.629
D11						Undetermined	
D12		MON88913	NTC	FAM	NFQ-MGB	Undetermined	
E1	100B	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	25.917	25.886
E2	100B	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	25.799	25.886
E3	100B	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	25.783	25.886
E4	100B	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	25.746	25.886
E5	100B	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	25.823	25.886
E6	100B	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	26.266	25.886
E7	100B	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	25.861	25.886
E8	100B	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	25.870	25.886
E9	100B	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	25.907	25.886
E10	100B	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	25.888	25.886
E11						Undetermined	
F1	50B	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	26.658	26.581
F2	50B	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	26.531	26.581
F3	50B	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	26.483	26.581
F4	50B	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	26.504	26.581
F5	50B	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	26.508	26.581

F6	50B	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	26.617	26.581
F7	50B	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	26.822	26.581
F8	50B	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	26.672	26.581
F9	50B	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	26.508	26.581
F10	50B	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	26.510	26.581
F11						Undetermined	
G1	25B	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	27.658	27.703
G2	25B	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	27.642	27.703
G3	25B	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	27.615	27.703
G4	25B	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	27.608	27.703
G5	25B	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	27.771	27.703
G6	25B	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	27.820	27.703
G7	25B	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	27.714	27.703
G8	25B	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	27.984	27.703
G9	25B	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	27.611	27.703
G10	25B	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	27.606	27.703
G11						Undetermined	
G12						Undetermined	
H1	12.5B	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	28.609	28.721
H2	12.5B	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	28.676	28.721
H3	12.5B	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	28.667	28.721
H4	12.5B	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	28.702	28.721
H5	12.5B	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	28.682	28.721
H6	12.5B	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	29.225	28.721
H7	12.5B	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	28.728	28.721
H8	12.5B	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	28.671	28.721
H9	12.5B	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	28.654	28.721
H10	12.5B	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	28.592	28.721
H11						Undetermined	
H12						Undetermined	

Corrida 986 Prueba de Inhibidores (Pureza ADN) para el Endógeno (MR186)

Experimetrn.

Corrida 986 Pureza endógeno.

instrument

LC-480

Experiment Type

Standard Curve

Pos	Name	Cp	Concentration	Standard	
A1	Sample 1	25.29	1.02E+02	100	Error: 0.0499
B1	Sample 13	26.51	4.62E+01	50	Efficiency: 1.916
C1	Sample 25	27.31	2.75E+01	25	Slope: -3.541
D1	Sample 37	28.58	1.21E+01	12.5	YIntercept: 32.41
Pos	Name	Cp	Concentration	Standard	
A2	Sample 2	27.93	9.03E+01	100	Error: 0.0705
B2	Sample 14	28.63	5.73E+01	50	Efficiency: 1.931
C2	Sample 26	29.84	2.58E+01	25	Slope: -3.500
D2	Sample 38	31.04	1.17E+01	12.5	YIntercept: 34.78
Pos	Name	Cp	Concentration	Standard	
A3	Sample 3	24.68	9.90E+01	100	Error: 0.0370
B3	Sample 15	25.64	5.27E+01	50	Efficiency: 1.926
C3	Sample 27	26.89	2.32E+01	25	Slope: -3.512
D3	Sample 39	27.79	1.29E+01	12.5	YIntercept: 31.69
Pos	Name	Cp	Concentration	Standard	
A4	Sample 4	24.44	1.02E+02	100	Error: 0.0391
B4	Sample 16	25.62	4.67E+01	50	Efficiency: 1.942
C4	Sample 28	26.46	2.68E+01	25	Slope: -3.469
D4	Sample 40	27.65	1.22E+01	12.5	YIntercept: 31.42

Pos	Name	Cp	Concentration	Standard	
A5	Sample 5	24.48	9.71E+01	100	Error: 0.0192
B5	Sample 17	25.38	5.20E+01	50	Efficiency: 1.995
C5	Sample 29	26.43	2.52E+01	25	Slope: -3.333
D5	Sample 41	27.47	1.23E+01	12.5	YIntercept: 31.10
Pos	Name	Cp	Concentration	Standard	
A6	Sample 6	26.36	1.07E+02	100	Error: 0.0548
B6	Sample 18	27.71	4.43E+01	50	Efficiency: 1.925
C6	Sample 30	28.54	2.57E+01	25	Slope: -3.514
D6	Sample 42	29.61	1.28E+01	12.5	YIntercept: 33.50
Pos	Name	Cp	Concentration	Standard	
A7	Sample 7	25.63	9.90E+01	100	Error: 0.00856
B7	Sample 19	26.62	5.03E+01	50	Efficiency: 1.989
C7	Sample 31	27.61	2.54E+01	25	Slope: -3.350
D7	Sample 43	28.66	1.23E+01	12.5	YIntercept: 32.32
Pos	Name	Cp	Concentration	Standard	
A8	Sample 8	25.8	9.58E+01	100	Error: 0.133
B8	Sample 20	26.45	6.12E+01	50	Efficiency: 1.981
C8	Sample 32	28.17	1.90E+01	25	Slope: -3.367
D8	Sample 44	28.61	1.40E+01	12.5	YIntercept: 32.47
Pos	Name	Cp	Concentration	Standard	
A9	Sample 9	22.09	9.69E+01	100	Error: 0.0279
B9	Sample 21	22.99	5.31E+01	50	Efficiency: 1.941
C9	Sample 33	24.17	2.43E+01	25	Slope: -3.472
D9	Sample 45	25.18	1.25E+01	12.5	YIntercept: 28.98

Pos	Name	Cp	Concentration	Standard	
A10	Sample 10	23.12	9.64E+01	100	Error: 0.0305
B10	Sample 22	24.02	5.14E+01	50	Efficiency: 2.002
C10	Sample 34	24.98	2.64E+01	25	Slope: -3.318
D10	Sample 46	26.13	1.19E+01	12.5	YIntercept: 29.70
Pos	Name	Cp	Concentration	Standard	
E2	Sample 50	25.55	7.65E+01	100	Error: 0.178
F2	Sample 62	25.65	7.13E+01	50	Efficiency: 1.991
G2	Sample 74	27.03	2.75E+01	25	Slope: -3.344
H2	Sample 86	28.44	1.04E+01	12.5	YIntercept: 31.84
Pos	Name	Cp	Concentration	Standard	
E3	Sample 51	23.13	9.94E+01	100	Error: 0.0116
F3	Sample 63	24.1	5.10E+01	50	Efficiency: 1.982
G3	Sample 75	25.18	2.44E+01	25	Slope: -3.365
H3	Sample 87	26.14	1.26E+01	12.5	YIntercept: 29.85
Pos	Name	Cp	Concentration	Standard	
E4	Sample 52	25.16	8.02E+01	100	Error: 0.148
F4	Sample 64	25.46	6.48E+01	50	Efficiency: 2.009
G4	Sample 76	26.62	2.89E+01	25	Slope: -3.301
H4	Sample 88	28.08	1.04E+01	12.5	YIntercept: 31.44
Pos	Name	Cp	Concentration	Standard	
E5	Sample 53	26.23	9.11E+01	100	Error: 0.0653
F5	Sample 65	26.93	5.71E+01	50	Efficiency: 1.932
G5	Sample 77	28.17	2.53E+01	25	Slope: -3.496

H5	Sample 89	29.32	1.18E+01	12.5	YIntercept: 33.07
Pos	Name	Cp	Concentration	Standard	
E6	Sample 54	25.95	8.59E+01	100	Error: 0.104
F6	Sample 66	26.43	6.24E+01	50	Efficiency: 1.959
G6	Sample 78	27.77	2.53E+01	25	Slope: -3.424
H6	Sample 90	28.94	1.15E+01	12.5	YIntercept: 32.58
Pos	Name	Cp	Concentration	Standard	
E7	Sample 55	28.1	1.14E+02	100	Error: 0.102
F7	Sample 67	29.68	3.98E+01	50	Efficiency: 1.956
G7	Sample 79	30.29	2.64E+01	25	Slope: -3.433
H7	Sample 91	31.34	1.30E+01	12.5	YIntercept: 35.17
Pos	Name	Cp	Concentration	Standard	
E8	Sample 56	21.72	9.48E+01	100	Error: 0.301
F8	Sample 68	23.04	3.85E+01	50	Efficiency: 1.973
G8	Sample 80	22.68	4.94E+01	25	Slope: -3.387
H8	Sample 92	25.24	8.66E+00	12.5	YIntercept: 28.41
Pos	Name	Cp	Concentration	Standard	
E10	Sample 58	24.02	9.71E+01	100	Error: 0.0197
F10	Sample 70	24.93	5.17E+01	50	Efficiency: 1.992
G10	Sample 82	25.96	2.55E+01	25	Slope: -3.341
H10	Sample 94	27.03	1.22E+01	12.5	YIntercept: 30.66

Anexo II

Corridas 886 y 1143 Limite Detección Equipo LC-2.0

Experimetrn

Limite Detección Mezclas de Algodón

Corrida 1143			Corrida 886		
Position	Name	Cp	Position	Name	Cp
1	0.10%	32.77	1	0.025%	35.89
2	0.10%	32.76	2	0.025%	35.73
3	0.10%	32.86	3	0.025%	35.99
4	0.10%	32.78	4	0.025%	36.41
5	0.10%	32.78	5	0.025%	36.17
6	0.10%	32.54	6	0.025%	35.8
7	0.10%	32.54	7	0.025%	36.11
8	0.10%	32.45	8	0.025%	35.95
9	0.10%	32.52	9	0.025%	35.75
10	0.10%	32.96	10	0.025%	35.54
11	1%	30.12	11	NTC	-
12	1%	30.04	12	NTC	-
13	1%	30.01	13	C- MR186	-
14	1%	29.98	14	C-MR186	-
15	1%	29.96	15	100% MR185	23.40
16	1%	30.03	16	100% MR185	23.50
17	1%	29.9	17		
18	1%	30.08	18		
19	1%	29.92	19		
20	1%	30	20		
21	10%	26.52	21		
22	10%	26.53	22		
23	10%	26.6	23		
24	10%	26.51	24		
25	10%	26.52	25		
26	10%	26.95	26		
27	10%	26.57	27		
28	10%	26.51	28		
29	10%	26.52	29		
30	10%	26.48	30		

31	NTC	-	31
32	C-MR186	-	32

Corrida 885 Limite Detección Equipo LC-480.

Experimetn. Limite Detección Mezclas de Algodón

Pos	Name	Cp
A1	0.025% algodón	35.54
A2	0.025% algodón	35.65
A3	0.025% algodón	35.65
B1	0.025% algodón	35.55
B2	0.025% algodón	35.81
B3	0.025% algodón	36.07
C1	0.025% algodón	35.26
C2	0.025% algodón	35.59
C3	0.025% algodón	36.51
D1	0.025% algodón	35.68
D2	0.025% algodón	35.72
D3	0.025% algodón	35.79
F11	NTC	-
F12	NTC	-
H11	C- MR186	>40
H12	C- MR186	>40

Anexo III

Corrida 1025 Datos de software LC-480 para ensayo de cuantificación

Experiment Name Corrida 1025 Limite cuantificación mezclas de algodón 0.1-1%

Experiment Type Standard Curve

Pos	Name	MON-88913-8			Standard	Curva
		Cp	Concentration			
A1	Sample 1	24.57	9.98E+01		100	Error: 0.00722 Efficiency: 1.918 Slope: -3.536 YIntercept: 31.68 Link: 0.000
A2	Sample 2	24.58	9.93E+01		100	
A3	Sample 3	24.56	1.01E+02		100	

A4	0.1%A	34.21	1.88E-01	0
A5	0.1%A	34.03	2.11E-01	0
A6	0.1%E	34.8	1.27E-01	0
A7	0.1%E	34.85	1.24E-01	0
A8	1%A	31.06	1.46E+00	0
A9	1%A	31.24	1.30E+00	0
A10	1%E	31.47	1.11E+00	0
A11	1%E	31.51	1.09E+00	0
A12	Sample 12	40.81	2.56E-03	0
B1	Sample 13	28.06	1.03E+01	10
B2	Sample 14	28.1	1.00E+01	10
B3	Sample 15	28.12	9.89E+00	10
B4	0.1%B	34.24	1.84E-01	0
B5	0.1%B	34.31	1.76E-01	0
B6	0.1%F	34.3	1.77E-01	0
B7	0.1%F	34.08	2.04E-01	0
B8	1%B	31.26	1.28E+00	0
B9	1%B	31.43	1.14E+00	0
B10	1%F	31.8	9.02E-01	0
B11	1%F	31.69	9.65E-01	0
B12	Sample 24	40.86	2.47E-03	0
C1	Sample 25	31.48	1.11E+00	1
C2	Sample 26	31.64	9.98E-01	1
C3	Sample 27	31.67	9.78E-01	1
C4	0.1%C	35.27	9.39E-02	0
C5	0.1%C	35.03	1.10E-01	0
C6	0.1%G	34.62	1.44E-01	0
C7	0.1%G	34.62	1.44E-01	0
C8	1%C	31.17	1.35E+00	0
C9	1%C			0
C10	1%G	31.49	1.10E+00	0
C11	1%G	31.52	1.08E+00	0
C12	Sample 36			0
D1	Sample 37	35.28	9.36E-02	0.1
D2	Sample 38	34.98	1.13E-01	0.1

D3	Sample 39	35.3	9.21E-02	0.1
D4	0.1%D	34.64	1.42E-01	0
D5	0.1%D	34.34	1.72E-01	0
D6	0.1%H	34.6	1.45E-01	0
D7	0.1%H	34.75	1.32E-01	0
D8	1%D	31.5	1.10E+00	0
D9	1%D	31.24	1.30E+00	0
D10	1%H	31.49	1.10E+00	0
D11	1%H	31.5	1.09E+00	0

Acp-1

Pos	Name	Cp	Concentration	Standard
E1	Sample 49	24.07	9.82E+01	100
E2	Sample 50	24.04	1.00E+02	100
E3	Sample 51	24.01	1.02E+02	100
E4	0.1%A	23.59	1.34E+02	0
E5	0.1%A	23.66	1.28E+02	0
E6	0.1%E	23.56	1.37E+02	0
E7	0.1%E	23.63	1.30E+02	0
E8	1%A	23.75	1.21E+02	0
E9	1%A	23.72	1.23E+02	0
E10	1%E	23.94	1.07E+02	0
E11	1%E	23.9	1.09E+02	0
E12	Sample 60	38.81	6.25E-04	0
F1	Sample 61	27.62	9.66E+00	10
F2	Sample 62	27.57	1.00E+01	10
F3	Sample 63	27.46	1.07E+01	10
F4	0.1%B	23.7	1.25E+02	0
F5	0.1%B	23.65	1.29E+02	0
F6	0.1%F\	23.67	1.27E+02	0
F7	0.1%F\	23.61	1.32E+02	0
F8	1%B			0
F9	1%B	23.77	1.19E+02	0
F10	1%F	23.77	1.19E+02	0
F11	1%F	23.66	1.29E+02	0
F12	Sample 72			0

Error: 0.0763
Efficiency: 1.921
Slope: -3.527
YIntercept: 30.58
Link: 9.662

G1	Sample 73	30.72	1.06E+00	1
G2	Sample 74	30.79	1.01E+00	1
G3	Sample 75	30.74	1.04E+00	1
G4	0.1%C	23.73	1.23E+02	0
G5	0.1%C	23.76	1.20E+02	0
G6	0.1%G	23.77	1.19E+02	0
G7	0.1%G	23.71	1.24E+02	0
G8	1%C	22.87	2.14E+02	0
G9	1%C	22.89	2.12E+02	0
G10	1%G	23.82	1.15E+02	0
G11	1%G	23.82	1.15E+02	0
G12	Sample 84			0
H1	Sample 85	33.05	1.60E-01	0.1
H2	Sample 86	33.75	8.73E-02	0.1
H3	Sample 87	33.6	9.88E-02	0.1
H4	0.1%D	23.81	1.16E+02	0
H5	0.1%D	23.73	1.23E+02	0
H6	0.1%H	23.69	1.26E+02	0
H7	0.1%H	23.72	1.23E+02	0
H8	1%D	23.66	1.28E+02	0
H9	1%D	22.86	2.16E+02	0
H10	1%H	23.45	1.47E+02	0
H11	1%H	23.77	1.19E+02	0

Corrida 1025 Datos de software LC-480 para ensayo de cuantificación

Experiment Name

Corrida 1025 Limite cuantificación mezclas de algodón 0.1-1%

Experiment Type

Standard Curve

Pos	Name	MON-88913-8			Standard	Curva
		Cp	Concentration			
A1	Sample 1	24.57	9.98E+01		100	Error: 0.00722 Efficiency: 1.918 Slope: -3.536 YIntercept: 31.68 Link: 0.000
A2	Sample 2	24.58	9.93E+01		100	
A3	Sample 3	24.56	1.01E+02		100	
A4	0.1%A	34.21	1.88E-01		0	
A5	0.1%A	34.03	2.11E-01		0	
A6	0.1%E	34.8	1.27E-01		0	

A7	0.1%E	34.85	1.24E-01	0
A8	1%A	31.06	1.46E+00	0
A9	1%A	31.24	1.30E+00	0
A10	1%E	31.47	1.11E+00	0
A11	1%E	31.51	1.09E+00	0
A12	Sample 12	40.81	2.56E-03	0
B1	Sample 13	28.06	1.03E+01	10
B2	Sample 14	28.1	1.00E+01	10
B3	Sample 15	28.12	9.89E+00	10
B4	0.1%B	34.24	1.84E-01	0
B5	0.1%B	34.31	1.76E-01	0
B6	0.1%F	34.3	1.77E-01	0
B7	0.1%F	34.08	2.04E-01	0
B8	1%B	31.26	1.28E+00	0
B9	1%B	31.43	1.14E+00	0
B10	1%F	31.8	9.02E-01	0
B11	1%F	31.69	9.65E-01	0
B12	Sample 24	40.86	2.47E-03	0
C1	Sample 25	31.48	1.11E+00	1
C2	Sample 26	31.64	9.98E-01	1
C3	Sample 27	31.67	9.78E-01	1
C4	0.1%C	35.27	9.39E-02	0
C5	0.1%C	35.03	1.10E-01	0
C6	0.1%G	34.62	1.44E-01	0
C7	0.1%G	34.62	1.44E-01	0
C8	1%C	31.17	1.35E+00	0
C9	1%C			0
C10	1%G	31.49	1.10E+00	0
C11	1%G	31.52	1.08E+00	0
C12	Sample 36			0
D1	Sample 37	35.28	9.36E-02	0.1
D2	Sample 38	34.98	1.13E-01	0.1
D3	Sample 39	35.3	9.21E-02	0.1
D4	0.1%D	34.64	1.42E-01	0
D5	0.1%D	34.34	1.72E-01	0

D6	0.1%H	34.6	1.45E-01	0
D7	0.1%H	34.75	1.32E-01	0
D8	1%D	31.5	1.10E+00	0
D9	1%D	31.24	1.30E+00	0
D10	1%H	31.49	1.10E+00	0
D11	1%H	31.5	1.09E+00	0
D12	Sample 48			0
Acp-1				
Pos	Name	Cp	Concentration	Standard
E1	Sample 49	24.07	9.82E+01	100
E2	Sample 50	24.04	1.00E+02	100
E3	Sample 51	24.01	1.02E+02	100
E4	0.1%A	23.59	1.34E+02	0
E5	0.1%A	23.66	1.28E+02	0
E6	0.1%E	23.56	1.37E+02	0
E7	0.1%E	23.63	1.30E+02	0
E8	1%A	23.75	1.21E+02	0
E9	1%A	23.72	1.23E+02	0
E10	1%E	23.94	1.07E+02	0
E11	1%E	23.9	1.09E+02	0
E12	Sample 60	38.81	6.25E-04	0
F1	Sample 61	27.62	9.66E+00	10
F2	Sample 62	27.57	1.00E+01	10
F3	Sample 63	27.46	1.07E+01	10
F4	0.1%B	23.7	1.25E+02	0
F5	0.1%B	23.65	1.29E+02	0
F6	0.1%F\	23.67	1.27E+02	0
F7	0.1%F\	23.61	1.32E+02	0
F8	1%B			0
F9	1%B	23.77	1.19E+02	0
F10	1%F	23.77	1.19E+02	0
F11	1%F	23.66	1.29E+02	0
F12	Sample 72			0
G1	Sample 73	30.72	1.06E+00	1
G2	Sample 74	30.79	1.01E+00	1

Error: 0.0763
Efficiency: 1.921
Slope: -3.527
YIntercept: 30.58
Link: 9.662

G3	Sample 75	30.74	1.04E+00	1
G4	0.1%C	23.73	1.23E+02	0
G5	0.1%C	23.76	1.20E+02	0
G6	0.1%G	23.77	1.19E+02	0
G7	0.1%G	23.71	1.24E+02	0
G8	1%C	22.87	2.14E+02	0
G9	1%C	22.89	2.12E+02	0
G10	1%G	23.82	1.15E+02	0
G11	1%G	23.82	1.15E+02	0
G12	Sample 84			0
H1	Sample 85	33.05	1.60E-01	0.1
H2	Sample 86	33.75	8.73E-02	0.1
H3	Sample 87	33.6	9.88E-02	0.1
H4	0.1%D	23.81	1.16E+02	0
H5	0.1%D	23.73	1.23E+02	0
H6	0.1%H	23.69	1.26E+02	0
H7	0.1%H	23.72	1.23E+02	0
H8	1%D	23.66	1.28E+02	0
H9	1%D	22.86	2.16E+02	0
H10	1%H	23.45	1.47E+02	0
H11	1%H	23.77	1.19E+02	0

Corrida 1028 Datos de software ViiA-7 para ensayo de cuantificación

Chemistry		TAQMAN		slope		MON-88913-8		acp-1			
Experiment Name		Corrida 1028 Limite cuantificación mezclas algodón		R2		0.998		0.99			
Experiment Type		Standard Curve		%effic.		97.068		94.424			
Well Position	Sample Name	Target Name	Task	Reporter	Quencher	CT	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Quantity Mean	Quantity SD
A1	100	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	25.541	25.669	0.112	100.00	100.00	
A2	100	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	25.722	25.669	0.112	100.00	100.00	
A3	100	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	25.744	25.669	0.112	100.00	100.00	
A4											
A5	0.1A	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	35.969	35.602	0.519	0.080	0.106	0.037

A6	0.1A	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	35.235	35.602	0.519	0.132	0.106	0.037
A7	0.1E	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	36.048	36.472	0.600	0.076	0.059	0.024
A8	0.1E	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	36.897	36.472	0.600	0.042	0.059	0.024
A10	1A	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.619	32.674	0.077	0.785	0.757	0.040
A11	1A	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.728	32.674	0.077	0.729	0.757	0.040
A12	1E	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.489	32.531	0.060	0.858	0.833	0.034
A13	1E	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.574	32.531	0.060	0.809	0.833	0.034
A15	10A	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	29.005	28.926	0.111	9.245	9.769	0.741
A16	10A	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.847	28.926	0.111	10.293	9.769	0.741
A17	10E	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	29.051	28.923	0.182	8.955	9.816	1.219
A18	10E	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.794	28.923	0.182	10.678	9.816	1.219
A20	100A	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.444	25.282	0.229	105.00	117.976	18.347
A21	100A	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.120	25.282	0.229	130.95	117.976	18.347
A22	100E	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.711	25.767	0.079	87.533	84.308	4.561
A23	100E	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.823	25.767	0.079	81.083	84.308	4.561
B1	10	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	28.736	28.740	0.018	10.000	10.000	
B2	10	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	28.725	28.740	0.018	10.000	10.000	
B3	10	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	28.760	28.740	0.018	10.000	10.000	
B4											
B6	0.1B	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	36.330	36.474	0.204	0.062	0.057	0.008
B7	0.100	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	35.669	35.872	0.288	0.098	0.086	0.017
B8	0.100	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	36.075	35.872	0.288	0.074	0.086	0.017
B10	1B	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.968	32.689	0.395	0.618	0.762	0.203
B11	1B	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.410	32.689	0.395	0.905	0.762	0.203
B12	1.000	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	33.269	33.416	0.207	0.504	0.458	0.065
B13	1.000	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	33.562	33.416	0.207	0.412	0.458	0.065
B15	10B	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	29.067	29.049	0.026	8.861	8.972	0.157
B16	10B	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	29.031	29.049	0.026	9.082	8.972	0.157
B17	10.000	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	29.607	29.478	0.183	6.130	6.720	0.835
B18	10.000	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	29.349	29.478	0.183	7.311	6.720	0.835
B20	100B	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	26.040	25.932	0.152	69.936	75.480	7.840
B21	100B	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.824	25.932	0.152	81.024	75.480	7.840
B22	100.000	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.634	25.578	0.079	92.263	95.897	5.140
B23	100.000	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.522	25.578	0.079	99.532	95.897	5.140
B24											

C1	1	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	32.231	32.101	0.122	1.000	1.000	
C2	1	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	31.989	32.101	0.122	1.000	1.000	
C3	1	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	32.084	32.101	0.122	1.000	1.000	
C4	1										
C6	0.1C	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	35.607	35.940	0.471	0.102	0.083	0.026
C7	0.1G	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	36.105	36.185	0.114	0.073	0.069	0.005
C8	0.1G	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	36.266	36.185	0.114	0.065	0.069	0.005
C10	1C	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.703	32.732	0.042	0.741	0.727	0.021
C11	1C	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.762	32.732	0.042	0.712	0.727	0.021
C12	1G	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	33.396	33.315	0.115	0.462	0.489	0.038
C13	1G	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	33.233	33.315	0.115	0.516	0.489	0.038
C15	10C	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.998	29.172	0.246	9.288	8.308	1.386
C16	10C	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	29.345	29.172	0.246	7.328	8.308	1.386
C17	10G	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	29.203	29.271	0.095	8.073	7.718	0.502
C18	10G	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	29.338	29.271	0.095	7.363	7.718	0.502
C19											
C20	100C	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.644	25.466	0.251	91.628	104.168	17.734
C21	100C	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.289	25.466	0.251	116.71	104.168	17.734
C22	100G	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	26.321	26.003	0.450	57.699	73.411	22.220
C23	100G	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.684	26.003	0.450	89.123	73.411	22.220
D1	0.1	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	35.654	35.796	0.199	0.100	0.100	
D2	0.1	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	36.024	35.796	0.199	0.100	0.100	
D3	0.1	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	35.710	35.796	0.199	0.100	0.100	
D4											
D6	0.100	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	35.845	35.902	0.080	0.087	0.084	0.005
D7	0.1H	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	36.308	36.482	0.245	0.063	0.057	0.009
D8	0.1H	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	36.656	36.482	0.245	0.050	0.057	0.009
D10	1.000	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.829	32.835	0.008	0.680	0.677	0.004
D11	1.000	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.841	32.835	0.008	0.675	0.677	0.004
D12	1H	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	33.312	33.261	0.073	0.489	0.507	0.025
D13	1H	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	33.209	33.261	0.073	0.525	0.507	0.025
D15	10.000	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	29.384	29.414	0.042	7.136	6.994	0.201
D16	10.000	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	29.444	29.414	0.042	6.852	6.994	0.201
D17	10H	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	29.062	29.057	0.008	8.888	8.923	0.048
D18	10H	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	29.051	29.057	0.008	8.957	8.923	0.048

D20	100.000	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.989	25.910	0.111	72.407	76.487	5.769
D21	100.000	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.832	25.910	0.111	80.566	76.487	5.769
D22	100H	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.924	25.749	0.247	75.679	85.880	14.427
D23	100H	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.574	25.749	0.247	96.081	85.880	14.427
F6	0.1A	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.910	22.943	0.046	105.281	103.041	3.167
F7	0.1E	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.776	22.866	0.127	115.110	108.635	9.156
F8	0.1E	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.955	22.866	0.127	102.161	108.635	9.156
F9					U						
F10	1A	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.117	23.132	0.022	91.752	90.825	1.311
F11	1A	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.148	23.132	0.022	89.897	90.825	1.311
F12	1E	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.063	23.005	0.082	95.114	98.927	5.392
F13	1E	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.947	23.005	0.082	102.740	98.927	5.392
F15	10A	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.051	23.083	0.045	95.848	93.857	2.816
F16	10A	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.115	23.083	0.045	91.866	93.857	2.816
F17	10E	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.964	22.987	0.033	101.611	100.065	2.187
F18	10E	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.010	22.987	0.033	98.518	100.065	2.187
F20	100A	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.048	23.054	0.009	96.039	95.653	0.546
F21	100A	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.061	23.054	0.009	95.267	95.653	0.546
F22	100E	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.248	23.282	0.048	84.107	82.241	2.639
F23	100E	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.316	23.282	0.048	80.375	82.241	2.639
F24											
G1	10	acp	STANDARD	FAM	TAMRA	26.473	26.487	0.096	10.000	10.000	
G2	10	acp	STANDARD	FAM	TAMRA	26.400	26.487	0.096	10.000	10.000	
G3	10	acp	STANDARD	FAM	TAMRA	26.589	26.487	0.096	10.000	10.000	
G4											
G6	0.1B	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.002	22.961	0.058	99.068	101.849	3.932
G7	0.100	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.034	22.981	0.074	96.988	100.474	4.930
G8	0.100	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.929	22.981	0.074	103.960	100.474	4.930
G9											
G10	1B	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.899	22.941	0.060	106.064	103.170	4.093
G11	1B	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.983	22.941	0.060	100.276	103.170	4.093
G12	1.000	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.842	22.850	0.012	110.189	109.596	0.838
G13	1.000	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.858	22.850	0.012	109.004	109.596	0.838
G15	10B	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.072	23.064	0.011	94.548	95.054	0.716
G16	10B	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.056	23.064	0.011	95.560	95.054	0.716
G17	10.000	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.047	23.054	0.010	96.126	95.658	0.662

G18	10.000	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.062	23.054	0.010	95.190	95.658	0.662
G20	100B	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.233	23.212	0.030	84.930	86.125	1.690
G21	100B	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.192	23.212	0.030	87.320	86.125	1.690
G22	100.000	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.420	23.307	0.161	74.996	81.123	8.665
G23	100.000	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.193	23.307	0.161	87.250	81.123	8.665
H1	1	acp	STANDARD	FAM	TAMRA	29.495	29.809	0.285	1.000	1.000	
H2	1	acp	STANDARD	FAM	TAMRA	30.049	29.809	0.285	1.000	1.000	
H3	1	acp	STANDARD	FAM	TAMRA	29.885	29.809	0.285	1.000	1.000	
H4											
H6	0.1C	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.962	22.839	0.174	101.711	110.768	12.808
H7	0.1G	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.057	22.975	0.116	95.516	101.009	7.767
H8	0.1G	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.893	22.975	0.116	106.501	101.009	7.767
H10	1C	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.816	22.851	0.049	112.058	109.554	3.541
H11	1C	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.885	22.851	0.049	107.050	109.554	3.541
H12	1G	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.882	22.895	0.018	107.267	106.374	1.263
H13	1G	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.907	22.895	0.018	105.480	106.374	1.263
H14											
H15	10C	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.979	22.955	0.034	100.588	102.207	2.289
H16	10C	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.931	22.955	0.034	103.826	102.207	2.289
H17	10G	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.990	22.968	0.031	99.845	101.328	2.097
H18	10G	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.946	22.968	0.031	102.811	101.328	2.097
H19											
H20	100C	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.315	23.236	0.112	80.414	84.875	6.309
H21	100C	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.157	23.236	0.112	89.336	84.875	6.309
H22	100G	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.330	23.192	0.195	79.647	87.683	11.365
H23	100G	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.053	23.192	0.195	95.719	87.683	11.365
I2	0.1	acp	STANDARD	FAM	TAMRA	33.239	33.435	0.195	0.100	0.100	
I3	0.1	acp	STANDARD	FAM	TAMRA	33.629	33.435	0.195	0.100	0.100	
I4	C- MR186										
I5	0.100	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.807	22.595	0.301	112.744	131.156	26.038
I6	0.100	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.382	22.595	0.301	149.568	131.156	26.038
I7	0.1H	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.774	22.848	0.106	115.288	109.836	7.709
I8	0.1H	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.923	22.848	0.106	104.385	109.836	7.709
I10	1.000	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.987	22.945	0.059	100.062	102.931	4.058
I11	1.000	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.903	22.945	0.059	105.801	102.931	4.058
I12	1H	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.990	22.951	0.056	99.816	102.507	3.806

I13	1H	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.911	22.951	0.056	105.198	102.507	3.806
I14	NTC										
I15	10.000	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.025	23.024	0.002	97.538	97.625	0.123
I16	10.000	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.022	23.024	0.002	97.712	97.625	0.123
I17	10H	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.265	23.200	0.092	83.140	86.895	5.311
I18	10H	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.135	23.200	0.092	90.651	86.895	5.311
I19	NTC										
I20	100.000	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.295	23.346	0.072	81.531	78.847	3.796
I21	100.000	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.397	23.346	0.072	76.163	78.847	3.796
I22	100H	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.214	23.192	0.031	86.016	87.295	1.809
I23	100H	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.170	23.192	0.031	88.574	87.295	1.809

Corrida 1031 Datos de software ViiA-7 para ensayo de cuantificación

Chemistry		TAQMAN							MON-88913-8		Acp-1
Experiment Name		Corrida 1031 Limite de Cuantificación algodón							R2		1
Experiment Type		Standard Curve							%Effic.		93.52
Well Position	Sample Name	Target Name	Task	Reporter	Quencher	CT	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Quantity Mean	Quantity SD
A1	100	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	25.769	25.713	0.052	100.000		
A2	100	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	25.667	25.713	0.052	100.000		
A3	100	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	25.703	25.713	0.052	100.000		
A4											
A5	0.1A	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	35.381	35.395	0.020	0.121	0.120	0.002
A6	0.1A	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	35.409	35.395	0.020	0.119	0.120	0.002
A7	0.1E	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	35.655	36.269	0.868	0.100	0.072	0.040
A8	0.1E	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	36.883	36.269	0.868	0.043	0.072	0.040
A9											
A10	1A	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.302	32.263	0.055	0.987	1.014	0.038
A11	1A	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.224	32.263	0.055	1.041	1.014	0.038
A12	1E	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	33.827	32.966	1.217	0.349	0.739	0.551
A13	1E	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.106	32.966	1.217	1.129	0.739	0.551
A14											
A15	10A	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.944	28.836	0.152	9.740	10.510	1.089
A16	10A	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.729	28.836	0.152	11.280	10.510	1.089
A18	10E	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.494	28.575	0.113	13.235	12.550	0.968
A19											

A20	100A	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.802	25.562	0.341	82.934	99.056	22.799
A21	100A	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.321	25.562	0.341	115.177	99.056	22.799
A23	100E	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.646	25.629	0.023	92.279	93.329	1.485
A24											
B1	10	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	28.577	28.636	0.069	10.000		
B2	10	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	28.621	28.636	0.069	10.000		
B4											
B5	0.1B	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	38.089	36.664	2.014	0.019	0.076	0.081
B6	0.1B	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	35.240	36.664	2.014	0.133	0.076	0.081
B7	0.100	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	35.409	35.469	0.085	0.119	0.114	0.007
B9											
B10	1B	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.305	32.491	0.262	0.985	0.875	0.156
B11	1B	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.676	32.491	0.262	0.765	0.875	0.156
B12	1.000	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	35.284	33.795	2.106	0.129	0.557	0.605
B13	1.000	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.306	33.795	2.106	0.984	0.557	0.605
B14											
B15	10B	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	29.703	28.989	1.010	5.807	10.588	6.761
B16	10B	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.275	28.989	1.010	15.369	10.588	6.761
B17	10.000	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.895	28.935	0.056	10.071	9.807	0.374
B18	10.000	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.974	28.935	0.056	9.542	9.807	0.374
B19											
B20	100B	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.489	25.483	0.008	102.704	103.097	0.556
B21	100B	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.478	25.483	0.008	103.490	103.097	0.556
B22	100.000	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.510	25.557	0.066	101.212	98.113	4.382
B23	100.000	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.603	25.557	0.066	95.015	98.113	4.382
B24											
C1	1	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	32.318	32.266	0.045	1.000		
C2	1	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	32.234	32.266	0.045	1.000		
C4											
C5	0.1C	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	37.343	36.733	0.862	0.032	0.052	0.029
C6	0.1C	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	36.123	36.733	0.862	0.073	0.052	0.029
C7	0.1G	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	37.211	36.379	1.177	0.035	0.071	0.052
C8	0.1G	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	35.547	36.379	1.177	0.108	0.071	0.052
C9											
C10	1C	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.021	32.289	0.378	1.195	1.013	0.258
C11	1C	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.556	32.289	0.378	0.830	1.013	0.258

C13	1G	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.605	32.837	0.329	0.803	0.694	0.154
C14											
C15	10C	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.636	28.816	0.255	12.020	10.709	1.854
C16	10C	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.997	28.816	0.255	9.398	10.709	1.854
C17	10G	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	30.593	29.808	1.111	3.164	6.198	4.291
C18	10G	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	29.023	29.808	1.111	9.233	6.198	4.291
C19											
C20	100C	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.701	25.610	0.128	88.895	94.720	8.238
C21	100C	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.520	25.610	0.128	100.545	94.720	8.238
C23	100G	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.627	25.706	0.112	93.488	88.710	6.757
C24											
D1	0.1	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	36.367	35.761	0.548	0.100		
D2	0.1	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	35.299	35.761	0.548	0.100		
D3	0.1	MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	35.618	35.761	0.548	0.100		
D4											
D5	0.100	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	36.255	36.173	0.117	0.067	0.071	0.006
D6	0.100	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	36.090	36.173	0.117	0.075	0.071	0.006
D7	0.1H	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	36.130	36.093	0.051	0.073	0.074	0.003
D9											
D10	1.000	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.990	33.007	0.024	0.618	0.610	0.010
D11	1.000	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	33.024	33.007	0.024	0.603	0.610	0.010
D13	1H	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	33.131	33.042	0.125	0.561	0.597	0.051
D14											
D15	10.000	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	29.153	29.180	0.038	8.447	8.297	0.212
D16	10.000	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	29.206	29.180	0.038	8.146	8.297	0.212
D18	10H	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	29.008	29.032	0.035	9.325	9.172	0.216
D19											
D20	100.000	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.874	25.793	0.114	78.975	83.571	6.499
D21	100.000	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.713	25.793	0.114	88.166	83.571	6.499
D23	100H	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.715	25.823	0.153	88.056	81.999	8.565
F10	1A	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24.178	24.205	0.038	115.408	113.419	2.812
F11	1A	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24.231	24.205	0.038	111.431	113.419	2.812
F13	1E	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.820	23.918	0.139	146.230	137.329	12.588
F14											
F15	10A	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24.130	24.085	0.064	119.130	122.798	5.187

F16	10A	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24.040	24.085	0.064	126.465	122.798	5.187
F18	10E	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.957	23.995	0.054	133.543	130.261	4.641
F19											
F20	100A	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24.291	24.300	0.012	107.114	106.514	0.848
F21	100A	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24.308	24.300	0.012	105.914	106.514	0.848
F23	100E	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24.376	24.390	0.020	101.269	100.354	1.294
F24											
G1	10	acp	STANDARD	FAM	TAMRA	27.780	27.810	0.046	10.000		
G2	10	acp	STANDARD	FAM	TAMRA	27.788	27.810	0.046	10.000		
G3	10	acp	STANDARD	FAM	TAMRA	27.863	27.810	0.046	10.000		
G4											
G5	0.1B	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24.216	24.079	0.195	112.563	123.780	15.863
G6	0.1B	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.941	24.079	0.195	134.997	123.780	15.863
G7	0.100	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.929	23.898	0.043	136.099	138.868	3.916
G9											
G10	1B	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.863	23.808	0.078	142.075	147.426	7.569
G11	1B	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.753	23.808	0.078	152.778	147.426	7.569
G12	1.000	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24.043	23.953	0.128	126.161	134.145	11.291
G13	1.000	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.863	23.953	0.128	142.128	134.145	11.291
G14											
G15	10B	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24.279	24.147	0.186	108.013	118.243	14.467
G16	10B	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24.016	24.147	0.186	128.474	118.243	14.467
G17	10.000	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24.241	24.279	0.054	110.715	108.004	3.833
G18	10.000	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24.317	24.279	0.054	105.294	108.004	3.833
G19											
G20	100B	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24.370	24.349	0.030	101.702	103.155	2.055
G21	100B	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24.327	24.349	0.030	104.608	103.155	2.055
G23	100.000	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24.309	24.345	0.052	105.885	103.390	3.529
G24											
H1	1	acp	STANDARD	FAM	TAMRA	31.313	31.345	0.055	1.000		
H2	1	acp	STANDARD	FAM	TAMRA	31.408	31.345	0.055	1.000		
H3	1	acp	STANDARD	FAM	TAMRA	31.313	31.345	0.055	1.000		
H4											
H5	0.1C	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24.113	24.035	0.109	120.526	126.995	9.149
H6	0.1C	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.958	24.035	0.109	133.465	126.995	9.149
H7	0.1G	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.959	23.931	0.039	133.401	135.881	3.507

H9												
H10	1C	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.986	23.995	0.013	131.014	130.242	1.090	
H11	1C	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24.004	23.995	0.013	129.471	130.242	1.090	
H12	1G	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24.067	24.018	0.069	124.227	128.346	5.826	
H13	1G	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.970	24.018	0.069	132.466	128.346	5.826	
H15	10C	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24.088	24.077	0.016	122.479	123.428	1.341	
H16	10C	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24.065	24.077	0.016	124.376	123.428	1.341	
H17	10G	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24.012	24.012	0.001	128.817	128.785	0.046	
H18	10G	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24.013	24.012	0.001	128.753	128.785	0.046	
H19												
H20	100C	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24.565	24.397	0.238	89.425	100.535	15.711	
H21	100C	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24.229	24.397	0.238	111.644	100.535	15.711	
H22	100G	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24.476	24.334	0.201	94.841	104.628	13.842	
H23	100G	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24.191	24.334	0.201	114.416	104.628	13.842	
H24												
I1	0.1	acp	STANDARD	FAM	TAMRA	34.949	34.900	0.044	0.100			
I2	0.1	acp	STANDARD	FAM	TAMRA	34.867	34.900	0.044	0.100			
I4												
I5	0.100	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.995	23.953	0.059	130.242	133.939	5.228	
I6	0.100	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.912	23.953	0.059	137.636	133.939	5.228	
I7	0.1H	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24.166	24.130	0.051	116.359	119.200	4.017	
I9												
I10	1.000	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24.195	24.145	0.071	114.182	118.068	5.495	
I11	1.000	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24.095	24.145	0.071	121.954	118.068	5.495	
I13	1H	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.964	24.003	0.055	132.937	129.588	4.736	
I14												
I15	10.000	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24.169	24.137	0.046	116.109	118.642	3.582	
I16	10.000	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24.104	24.137	0.046	121.175	118.642	3.582	
I18	10H	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24.168	24.173	0.007	116.168	115.795	0.528	
I20	100.000	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24.474	24.432	0.059	94.965	97.634	3.775	
I21	100.000	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24.391	24.432	0.059	100.304	97.634	3.775	
I23	100H	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	24.454	24.458	0.006	96.226	95.947	0.394	

Corrida 1124 Datos de software LC-480 para ensayo de cuantificación

Experiment Name

Corrida 1025 Limite cuantificación mezclas de algodón 0.1-1%

Experiment Type

Standard Curve

		MON-88913-8		Curva
Pos	Name	Cp	Concentration	Error: 0.00697
A1	Sample 1	25.73	9.40E+01	Efficiency: 2.012
A2	Sample 2	25.62	1.01E+02	Slope: -3.293
A3	Sample 3	25.32	1.25E+02	YIntercept: 32.22
A4	0.10%	34.75	1.71E-01	
A5	0.10%	35.21	1.24E-01	
A6	0.10%	34.86	1.59E-01	
A7	0.10%	35.44	1.05E-01	
A8	1%	34.51	2.03E-01	
A9	1%	31.83	1.32E+00	
A10	1%	32.02	1.16E+00	
A11	1%	31.79	1.35E+00	
A12	C- MR186	-	-	
B1	Sample 13	29.22	8.19E+00	
B2	Sample 14	28.94	9.91E+00	
B3	Sample 15	28.95	9.84E+00	
B4	0.10%	35.44	1.06E-01	
B5	0.10%	34.98	1.46E-01	
B6	0.10%	35.49	1.02E-01	
B7	0.10%	35.5	1.01E-01	
B8	1%	32.32	9.35E-01	
B9	1%	32.01	1.16E+00	
B10	1%	32.08	1.11E+00	
B11	1%	32.04	1.14E+00	
B12	C-MR186	-	-	
C1	Sample 25	32.22	1.00E+00	
C2	Sample 26	32.52	8.15E-01	
C3	Sample 27	32.16	1.05E+00	
C4	0.10%	34.8	1.65E-01	
C5	0.10%	34.95	1.48E-01	
C6	0.10%	35.08	1.36E-01	

C7	0.10%	35.17	1.27E-01
C8	1%	32.17	1.04E+00
C9	1%	31.87	1.28E+00
C10	1%	32.03	1.14E+00
C11	1%	31.58	1.57E+00
C12	NTC	-	-
D1	Sample 37	35.53	9.91E-02
D2	Sample 38	35.51	1.00E-01
D3	Sample 39	35.48	1.02E-01
D4	0.10%	35.33	1.14E-01
D5	0.10%	35.1	1.34E-01
D6	0.10%	35.13	1.31E-01
D7	0.10%	35.55	9.79E-02
D8	1%	32.25	9.80E-01
D9	1%	32.14	1.06E+00
D10	1%	30.92	2.49E+00
D11	1%	32.1	1.09E+00
D12	NTC	-	-
Acp-1			
Pos	Name	Cp	Concentration
E1	Sample 49	24.47	1.01E+02
E2	Sample 50	24.33	1.12E+02
E3	Sample 51	24.44	1.03E+02
E4	0.10%	23.85	1.59E+02
E5	0.10%	23.76	1.70E+02
E6	0.10%	23.85	1.59E+02
E7	0.10%	23.88	1.56E+02
E8	1%	23.86	1.58E+02
E9	1%	23.86	1.58E+02
E10	1%	23.88	1.55E+02
E11	1%	23.86	1.57E+02
E12	C- MR100	-	-
F1	Sample 61	27.67	9.85E+00
F2	Sample 62	27.75	9.29E+00
F3	Sample 63	27.74	9.38E+00

Curva
 Error: 0.0103
 Efficiency: 2.071
 Slope: -3.163
 YIntercept: 30.78
 Link: 0.000

F4	0.10%	23.88	1.56E+02
F5	0.10%	23.99	1.44E+02
F6	0.10%	23.91	1.52E+02
F7	0.10%	23.93	1.50E+02
F8	1%	24.03	1.40E+02
F9	1%	24.04	1.38E+02
F10	1%	23.96	1.47E+02
F11	1%	24.07	1.36E+02
F12	C- MR100	-	-
G1	Sample 73	30.72	1.07E+00
G2	Sample 74	30.77	1.03E+00
G3	Sample 75	30.93	9.20E-01
G4	0.10%	23.96	1.46E+02
G5	0.10%	23.91	1.52E+02
G6	0.10%	24.01	1.42E+02
G7	0.10%	24.04	1.39E+02
G8	1%	24.09	1.33E+02
G9	1%	24	1.43E+02
G10	1%	24.02	1.41E+02
G11	1%	24.01	1.42E+02
G12	NTC	-	-
H1	Sample 85	34.09	9.21E-02
H2	Sample 86	33.9	1.05E-01
H3	Sample 87	33.34	1.59E-01
H4	0.10%	23.91	1.53E+02
H5	0.10%	22.89	3.20E+02
H6	0.10%	23.99	1.44E+02
H7	0.10%	23.92	1.51E+02
H8	1%	23.97	1.46E+02
H9	1%	23.95	1.48E+02
H10	1%	23.94	1.49E+02
H11	1%	24.01	1.42E+02
H12	NTC	-	-

Corrida 1131 Datos de software LC-480 para ensayo de cuantificación

Experiment Name

Corrida 1025 Limite cuantificación mezclas de algodón 0.1-1%

Experiment Type

Standard Curve

MON-88913-8

CURVA

Pos	Name	Cp	Concentration	Standard
A1	Sample 1	24.73	1.00E+02	100
A2	Sample 2	24.72	1.00E+02	100
A3	Sample 3	24.75	9.86E+01	100
A4	10%	27.82	1.35E+01	0
A5	10%	27.86	1.32E+01	0
A6	10%	27.87	1.30E+01	0
A7	10%	27.84	1.33E+01	0
A8	100%	24.81	9.44E+01	0
A9	100%	24.85	9.23E+01	0
A10	100%	24.8	9.54E+01	0
A11	100%	24.81	9.47E+01	0
A12	C- MR186	-	-	0
B1	Sample 13	28.3	9.87E+00	10
B2	Sample 14	28.28	1.00E+01	10
B3	Sample 15	28.28	1.00E+01	10
B4	10%	27.71	1.45E+01	0
B5	10%	27.77	1.39E+01	0
B6	10%	27.85	1.32E+01	0
B7	10%	27.78	1.39E+01	0
B8	100%	24.84	9.27E+01	0
B9	100%	24.83	9.33E+01	0
B10	100%	24.84	9.26E+01	0
B11	100%	24.83	9.32E+01	0
B12	C- MR186	-	-	0
C1	Sample 25	31.67	1.11E+00	1
C2	Sample 26	31.77	1.04E+00	1
C3	Sample 27	31.85	9.90E-01	1
C4	10%	27.92	1.27E+01	0
C5	10%	27.83	1.34E+01	0

Error: 0.0212

Efficiency: 1.911

Slope: -3.556

YIntercept: 31.70

Link: 0.000

C6	10%	27.86	1.31E+01	0
C7	10%	27.9	1.28E+01	0
C8	100%	24.86	9.15E+01	0
C9	100%	24.82	9.39E+01	0
C10	100%	24.85	9.24E+01	0
C11	100%	24.85	9.22E+01	0
C12	NTC	-	-	0
D1	Sample 37	35.58	8.88E-02	0.1
D2	Sample 38	35.1	1.21E-01	0.1
D3	Sample 39	35.08	1.23E-01	0.1
D4	10%	27.79	1.37E+01	0
D5	10%	27.73	1.43E+01	0
D6	10%	27.72	1.44E+01	0
D7	10%	27.7	1.45E+01	0
D8	100%	24.86	9.16E+01	0
D9	100%	24.87	9.12E+01	0
D10	100%	24.91	8.86E+01	0
D11	100%	24.91	8.85E+01	0
D12	NTC	-	-	0

acp-1

Pos	Name	Cp	Concentration	Standard
E1	Sample 49	23.94	1.06E+02	100
E2	Sample 50	24.01	1.02E+02	100
E3	Sample 51	23.96	1.05E+02	100
E4	10%	23.71	1.24E+02	0
E5	10%	23.69	1.26E+02	0
E6	10%	23.7	1.25E+02	0
E7	10%	23.74	1.21E+02	0
E8	100%	24.3	8.36E+01	0
E9	100%	24.29	8.41E+01	0
E10	100%	24.27	8.51E+01	0
E11	100%	24.22	8.79E+01	0
E12	C- MR100	-	-	0
F1	Sample 61	27.6	9.07E+00	10
F2	Sample 62	27.52	9.57E+00	10

CURVA

Error: 0.0130
Efficiency: 1.958
Slope: -3.426
YIntercept: 30.87
Link: 0.110

F3	Sample 63	27.62	8.97E+00	10
F4	10%	23.7	1.24E+02	0
F5	10%	23.69	1.26E+02	0
F6	10%	23.73	1.22E+02	0
F7	10%	23.75	1.20E+02	0
F8	100%	24.19	9.00E+01	0
F9	100%	24.06	9.77E+01	0
F10	100%	24.14	9.30E+01	0
F11	100%	24.14	9.26E+01	0
F12	C- MR100	-	-	0
G1	Sample 73	30.81	1.05E+00	1
G2	Sample 74	30.78	1.07E+00	1
G3	Sample 75	30.8	1.05E+00	1
G4	10%	23.81	1.16E+02	0
G5	10%	23.79	1.18E+02	0
G6	10%	23.77	1.19E+02	0
G7	10%	23.79	1.18E+02	0
G8	100%	24.17	9.12E+01	0
G9	100%	24.15	9.21E+01	0
G10	100%	24.12	9.40E+01	0
G11	100%	24.11	9.48E+01	0
G12	NTC	-	-	0
H1	Sample 85	34.16	1.10E-01	0.1
H2	Sample 86	34.29	1.00E-01	0.1
H3	Sample 87	34.8	7.11E-02	0.1
H4	10%	23.66	1.28E+02	0
H5	10%	23.66	1.28E+02	0
H6	10%	23.69	1.25E+02	0
H7	10%	23.7	1.25E+02	0
H8	100%	24.08	9.66E+01	0
H9	100%	24.1	9.54E+01	0
H10	100%	24.14	9.27E+01	0
H11	100%	24.13	9.34E+01	0
H12	NTC	-	-	0

Anexo IV

Corrida 1142 Datos de software LC-480 para ensayo de cuantificación Reproducibilidad

Experiment Name

Corrida 1142 Limite cuantificación mezclas de algodón 0,1-1%

Experiment Type

Standard Curve

MON 88913-8					Curva
Pos	Name	Cp	Concentration	Standard	Error: 0.00499
A1	Sample 1	24.24	1.01E+02	100	Efficiency: 1.962
A2	Sample 2	24.14	1.08E+02	100	Slope: -3.416
A3	Sample 3	24.26	9.99E+01	100	YIntercept: 31.11
A4	0.10%	33.71	1.71E-01	0	Link: 0.000
A5	0.10%	34.1	1.31E-01	0	
A6	0.10%	33.84	1.57E-01	0	
A7	0.10%	33.73	1.69E-01	0	
A8	1%	31.09	9.98E-01	0	
A9	1%	31.23	9.09E-01	0	
A10	1%	31.25	8.97E-01	0	
A11	1%	31.16	9.52E-01	0	
A12	NTC			0	
B1	Sample 13	27.72	9.73E+00	10	
B2	Sample 14	27.71	9.76E+00	10	
B3	Sample 15	27.64	1.02E+01	10	
B4	0.10%	33.96	1.45E-01	0	
B5	0.10%	33.99	1.41E-01	0	
B6	0.10%	33.99	1.42E-01	0	
B7	0.10%	33.94	1.47E-01	0	
B8	1%	31.2	9.33E-01	0	
B9	1%	31.17	9.49E-01	0	
B10	1%	31.31	8.66E-01	0	
B11	1%	31.33	8.51E-01	0	
B12	NTC			0	
C1	Sample 25	31.06	1.02E+00	1	
C2	Sample 26	31.08	1.01E+00	1	
C3	Sample 27	31.07	1.01E+00	1	
C4	0.10%	34.03	1.38E-01	0	
C5	0.10%	34.2	1.23E-01	0	

C6	0.10%	34.1	1.32E-01	0
C7	0.10%	34.22	1.21E-01	0
C8	1%	31.22	9.15E-01	0
C9	1%	31.2	9.27E-01	0
C10	1%	31.23	9.14E-01	0
C11	1%	31.3	8.67E-01	0
C12	C-			0
D1	Sample 37	34.43	1.06E-01	0.1
D2	Sample 38	34.56	9.66E-02	0.1
D3	Sample 39	34.83	8.04E-02	0.1
D4	0.10%	34.51	9.99E-02	0
D5	0.10%	34.14	1.28E-01	0
D6	0.10%			0
D7	0.10%			0
D8	1%	31.46	7.82E-01	0
D9	1%	31.28	8.81E-01	0
D10	1%	31.32	8.59E-01	0
D11	1%	31.23	9.14E-01	0
D12	C-			0

Acp-1

Curva

Pos	Name	Cp	Concentration	Standard
E1	Sample 49	23.87	9.44E+01	100
E2	Sample 50	23.79	9.95E+01	100
E3	Sample 51	23.8	9.90E+01	100
E4	0.10%	23.63	1.11E+02	0
E5	0.10%	23.71	1.05E+02	0
E6	0.10%	23.67	1.08E+02	0
E7	0.10%	23.65	1.09E+02	0
E8	1%	23.75	1.03E+02	0
E9	1%	23.81	9.82E+01	0
E10	1%	23.92	9.16E+01	0
E11	1%	23.89	9.37E+01	0
E12	C-			0
F1	Sample 61	27.21	1.06E+01	10
F2	Sample 62	27.27	1.02E+01	10

Error: 0.00276
Efficiency: 1.925
Slope: -3.516
YIntercept: 30.68
Link: 0.983

F3	Sample 63	27.28	1.02E+01	10
F4	0.10%	23.78	1.00E+02	0
F5	0.10%	23.74	1.03E+02	0
F6	0.10%	23.75	1.03E+02	0
F7	0.10%	23.77	1.01E+02	0
F8	1%	23.89	9.33E+01	0
F9	1%	23.84	9.68E+01	0
F10	1%	23.94	9.02E+01	0
F11	1%	23.96	8.93E+01	0
F12	C-			0
G1	Sample 73	30.82	9.99E-01	1
G2	Sample 74	30.83	9.90E-01	1
G3	Sample 75	30.84	9.83E-01	1
G4	0.10%	23.78	1.00E+02	0
G5	0.10%	23.74	1.03E+02	0
G6	0.10%	23.71	1.05E+02	0
G7	0.10%	23.84	9.63E+01	0
G8	1%	23.94	9.03E+01	0
G9	1%	23.95	9.00E+01	0
G10	1%	23.98	8.78E+01	0
G11	1%	24.01	8.66E+01	0
G12	NTC			0
H1	Sample 85	34.19	8.57E-02	0.1
H2	Sample 86	33.9	1.08E-01	0.1
H3	Sample 87	34	1.00E-01	0.1
H4	0.10%	23.89	9.31E+01	0
H5	0.10%	23.79	9.96E+01	0
H6	0.10%	23.76	1.02E+02	0
H7	0.10%	23.74	1.03E+02	0
H8	1%	23.81	9.84E+01	0
H9	1%	23.91	9.22E+01	0
H10	1%	23.89	9.35E+01	0
H11	1%	23.95	8.99E+01	0
H12	NTC			0

Corrida 1150 Datos de software LC-480 para ensayo de cuantificación Reproducibilidad

Experiment Name

Corrida 1150 Limite cuantificación mezclas de algodón 0,1-1%

Experiment Type

Standard Curve

Pos	Name	MON-88913-8			Standard	Curva
		Cp	Concentration			
A1	Sample 1	24.3	1.03E+02		100	Error: 0.00499
A2	Sample 2	24.34	1.00E+02		100	Efficiency: 1.962
A3	Sample 3	24.45	9.36E+01		100	Slope: -3.416
A4	10%	27.87	9.59E+00		0	YIntercept: 31.11
A5	10%	27.9	9.35E+00		0	Link: 0.000
A6	10%	27.92	9.23E+00		0	
A7	10%	27.92	9.23E+00		0	
A8	100%	24.3	1.04E+02		0	
A9	100%	24.33	1.01E+02		0	
A10	100%	24.32	1.02E+02		0	
A11	100%	24.29	1.04E+02		0	
A12	NTC				0	
B1	Sample 13	27.82	9.89E+00		10	
B2	Sample 14	27.81	9.93E+00		10	
B3	Sample 15	27.78	1.02E+01		10	
B4	10%	27.98	8.89E+00		0	
B5	10%	28.02	8.64E+00		0	
B6	10%	28.02	8.63E+00		0	
B7	10%	27.96	9.03E+00		0	
B8	100%	24.34	1.01E+02		0	
B9	100%	24.42	9.55E+01		0	
B10	100%	24.48	9.15E+01		0	
B11	100%	24.46	9.30E+01		0	
B12	NTC				0	
C1	Sample 25	31.23	1.01E+00		1	
C2	Sample 26	31.25	1.00E+00		1	
C3	Sample 27	31.48	8.63E-01		1	
C4	10%	27.91	9.31E+00		0	
C5	10%	27.9	9.35E+00		0	

C6	10%	27.95	9.05E+00	0
C7	10%	27.93	9.16E+00	0
C8	100%	24.47	9.24E+01	0
C9	100%	24.46	9.30E+01	0
C10	100%	24.49	9.08E+01	0
C11	100%	24.49	9.09E+01	0
C12	C- MR186			0
D1	Sample 37	35.12	1.00E-01	0.1
D2	Sample 38	34.78	1.20E-01	0.1
D3	Sample 39	35.54	8.06E-02	0.1
D4	10%	27.92	9.26E+00	0
D5	10%	27.81	9.96E+00	0
D6	10%	27.86	9.61E+00	0
D7	10%	27.91	9.28E+00	0
D8	100%	24.46	9.28E+01	0
D9	100%	24.47	9.22E+01	0
D10	100%	24.5	9.04E+01	0
D11	100%	24.53	8.87E+01	0
D12	C- MR186			0

acp-1

Pos	Name	Cp	Concentration	Standard
E1	Sample 49	24	9.59E+01	100
E2	Sample 50	23.94	1.00E+02	100
E3	Sample 51	23.94	1.00E+02	100
E4	10%	23.63	1.24E+02	0
E5	10%	23.64	1.23E+02	0
E6	10%	23.61	1.25E+02	0
E7	10%	23.62	1.24E+02	0
E8	100%	23.92	1.02E+02	0
E9	100%	23.9	1.03E+02	0
E10	100%	24.01	9.56E+01	0
E11	100%	23.99	9.67E+01	0
E12	NTC			0
F1	Sample 61	27.51	9.10E+00	10
F2	Sample 62	27.37	1.00E+01	10

Curva

Error: 0.00276
Efficiency: 1.925
Slope: -3.516
YIntercept: 30.68
Link: 0.983

F3	Sample 63	27.32	1.03E+01	10
F4	10%	24.01	9.57E+01	0
F5	10%	24.03	9.46E+01	0
F6	10%	24	9.61E+01	0
F7	10%	23.99	9.67E+01	0
F8	100%	24.04	9.34E+01	0
F9	100%	24.03	9.43E+01	0
F10	100%	24.05	9.32E+01	0
F11	100%	24.06	9.24E+01	0
F12	NTC			0
G1	Sample 73	30.79	1.00E+00	1
G2	Sample 74	30.69	1.07E+00	1
G3	Sample 75	30.69	1.07E+00	1
G4	10%	24.03	9.45E+01	0
G5	10%	24.08	9.11E+01	0
G6	10%	24	9.60E+01	0
G7	10%	24.04	9.34E+01	0
G8	100%	23.98	9.72E+01	0
G9	100%	23.98	9.77E+01	0
G10	100%	24.02	9.51E+01	0
G11	100%	24.02	9.47E+01	0
G12	C- MR100			0
H1	Sample 85	33.96	1.19E-01	0.1
H2	Sample 86	34.16	1.04E-01	0.1
H3	Sample 87	33.95	1.20E-01	0.1
H4	10%	24.07	9.18E+01	0
H5	10%	23.96	9.85E+01	0
H6	10%	23.93	1.01E+02	0
H7	10%	24.04	9.36E+01	0
H8	100%	23.95	9.93E+01	0
H9	100%	23.97	9.81E+01	0
H10	100%	24.08	9.12E+01	0
H11	100%	24.04	9.38E+01	0
H12	C- MR100			0

Corrida 1148 Datos de software ViiA-7 para ensayo de cuantificación Reproducibilidad

Name	Corrida 1148 limite cuantificación mezclas de algodón 0,1-1%						Ct Threshold	Y-Intercept	R ²	Slope	
Experiment Type	Standard Curve						MON-88913-8	0.109	32.071	0.995	-3.496
Instrument	ViiA7						acp-1	0.076	20	0.998	-3.531
Position	Sample	Target	Task	Reporter	Quencher	CT	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Quantity Mean	Quantity SD
A1		MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	25.213	25.310	0.196	100.000		
A2		MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	25.536	25.310	0.196	100.000		
A3		MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	25.182	25.310	0.196	100.000		
A4	0.1A	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	35.705	35.842	0.194	0.091	0.084	0.011
A5	0.1A	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	35.978	35.842	0.194	0.076	0.084	0.011
A6	0.1E	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	35.559	35.763	0.289	0.101	0.089	0.017
A7	0.1E	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	35.968	35.763	0.289	0.077	0.089	0.017
A8	1A	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.586	32.477	0.155	0.712	0.768	0.078
A9	1A	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.367	32.477	0.155	0.823	0.768	0.078
A10	1E	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.598	32.663	0.091	0.707	0.678	0.041
A11	1E	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.727	32.663	0.091	0.649	0.678	0.041
A12	C- MR186	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	35.707	35.707		0.091	0.091	
B1		MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	28.434	28.289	0.131	10.000		
B2		MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	28.254	28.289	0.131	10.000		
B3		MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	28.178	28.289	0.131	10.000		
B4	0.1B	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	35.581	35.798	0.307	0.099	0.087	0.017
B5	0.1B	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	36.016	35.798	0.307	0.074	0.087	0.017
B6	0.1F	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	35.515	35.598	0.117	0.104	0.098	0.008
B7	0.1F	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	35.681	35.598	0.117	0.093	0.098	0.008
B8	1B	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.470	32.496	0.037	0.769	0.756	0.019
B9	1B	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.523	32.496	0.037	0.743	0.756	0.019
B10	1F	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.615	32.691	0.109	0.699	0.666	0.048
B11	1F	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.768	32.691	0.109	0.632	0.666	0.048
B12	C- MR186	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	-	35.707				
C1		MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	32.037	31.952	0.102	1.000		
C2		MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	31.981	31.952	0.102	1.000		
C3		MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	31.838	31.952	0.102	1.000		
C4	0.1C	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	35.694	35.491	0.287	0.092	0.106	0.020
C5	0.1C	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	35.288	35.491	0.287	0.120	0.106	0.020

C6	0.1G	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	35.923	36.028	0.149	0.079	0.074	0.007
C7	0.1G	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	36.133	36.028	0.149	0.069	0.074	0.007
C8	1C	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.501	32.500	0.001	0.754	0.754	0.000
C9	1C	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.500	32.500	0.001	0.754	0.754	0.000
C10	1G	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.246	32.494	0.351	0.892	0.767	0.176
C11	1G	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.742	32.494	0.351	0.643	0.767	0.176
C12	NTC	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	16.528	12.295	5.986	27,926.455	-	-
D1		MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	36.072	35.743	0.316	0.100		
D2		MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	35.441	35.743	0.316	0.100		
D3		MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	35.716	35.743	0.316	0.100		
D4	0.1D	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	36.280	36.136	0.204	0.063	0.069	0.009
D5	0.1D	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	35.992	36.136	0.204	0.076	0.069	0.009
D6	0.1H	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	36.567	36.463	0.146	0.052	0.056	0.005
D7	0.1H	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	36.360	36.463	0.146	0.059	0.056	0.005
D8	1D	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.500	32.496	0.005	0.754	0.756	0.003
D9	1D	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.492	32.496	0.005	0.758	0.756	0.003
D10	1H	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.180	32.323	0.202	0.931	0.851	0.113
D11	1H	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	32.467	32.323	0.202	0.771	0.851	0.113
D12	NTC	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB						
E1		acp	STANDARD	FAM	TAMRA	23.937	23.951	0.012	100.000		
E2		acp	STANDARD	FAM	TAMRA	23.954	23.951	0.012	100.000		
E3		acp	STANDARD	FAM	TAMRA	23.960	23.951	0.012	100.000		
E4	0.1A	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.698	23.665	0.047	110.954	113.394	3.451
E5	0.1A	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.632	23.665	0.047	115.834	113.394	3.451
E6	0.1E	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.615	23.604	0.017	117.079	117.997	1.297
E7	0.1E	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.592	23.604	0.017	118.914	117.997	1.297
E8	1A	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.797	23.751	0.065	104.032	107.231	4.524
E9	1A	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.705	23.751	0.065	110.430	107.231	4.524
E10	1E	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.836	23.807	0.041	101.373	103.319	2.753
E11	1E	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.779	23.807	0.041	105.266	103.319	2.753
E12	NTC	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	15.985	13.647	3.307	16,957.334	187,460.938	241,128.500
F1		acp	STANDARD	FAM	TAMRA	27.332	27.296	0.041	10.000		
F2		acp	STANDARD	FAM	TAMRA	27.305	27.296	0.041	10.000		
F3		acp	STANDARD	FAM	TAMRA	27.251	27.296	0.041	10.000		

F4	0.1B	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.639	23.706	0.094	115.289	110.497	6.776
F5	0.1B	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.772	23.706	0.094	105.705	110.497	6.776
F6	0.1F	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.750	23.743	0.009	107.275	107.712	0.617
F7	0.1F	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.737	23.743	0.009	108.148	107.712	0.617
F8	1B	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.855	23.827	0.039	100.162	101.992	2.589
F9	1B	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.800	23.827	0.039	103.823	101.992	2.589
F10	1F	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.852	23.845	0.010	100.329	100.806	0.674
F11	1F	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.838	23.845	0.010	101.282	100.806	0.674
F12	NTC	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	11.309	13.647	3.307	357,964.53 1	187,460.938	241,128.5 00
G1		acp	STANDARD	FAM	TAMRA	30.894	30.824	0.067	1.000		
G2		acp	STANDARD	FAM	TAMRA	30.760	30.824	0.067	1.000		
G3		acp	STANDARD	FAM	TAMRA	30.818	30.824	0.067	1.000		
G4	0.1C	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.762	23.793	0.043	106.390	104.314	2.936
G5	0.1C	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.823	23.793	0.043	102.238	104.314	2.936
G6	0.1G	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.781	23.757	0.033	105.126	106.747	2.292
G7	0.1G	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.734	23.757	0.033	108.367	106.747	2.292
G8	1C	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.944	23.899	0.063	94.499	97.347	4.028
G9	1C	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.854	23.899	0.063	100.195	97.347	4.028
G10	1G	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.853	23.853	0.000	100.257	100.255	0.003
G11	1G	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.853	23.853	0.000	100.253	100.255	0.003
G12	C- MR100	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	41.795	41.795		0.001	0.001	
H1		acp	STANDARD	FAM	TAMRA	34.723	34.545	0.331	0.100		
H2		acp	STANDARD	FAM	TAMRA	34.749	34.545	0.331	0.100		
H3		acp	STANDARD	FAM	TAMRA	34.163	34.545	0.331	0.100		
H4	0.1D	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.716	23.725	0.013	109.665	108.996	0.946
H5	0.1D	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.735	23.725	0.013	108.328	108.996	0.946
H6	0.1H	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.737	23.747	0.014	108.133	107.439	0.983
H7	0.1H	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.757	23.747	0.014	106.744	107.439	0.983
H8	1D	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.715	23.732	0.024	109.729	108.521	1.708
H9	1D	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.749	23.732	0.024	107.313	108.521	1.708
H10	1H	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.673	23.699	0.036	112.773	110.910	2.634
H11	1H	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.724	23.699	0.036	109.047	110.910	2.634
H12	C- MR100	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	-	>41.795				

Corrida 1151 Datos de software ViiA-7 para ensayo de cuantificación Reproducibilidad

Experiment Name		Corrida 1150 Limite cuantificación mezclas de algodón 10-100%						Ct Threshold	Y-Intercept	R2	Slope	
Experiment Type		Standard Curve						MON-88913-8	0.113	31.824	0.998	-3.368
Instrument Type		ViiA 7						acp-1	0.068	29.927	0.998	-3.440
Position	Sample Name	Target Name	Task	Reporter	Quencher	CT	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Quantity Mean	Quantity SD	
A1		MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	25.283	25.211	0.062	100.000	100.000		
A2		MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	25.170	25.211	0.062	100.000	100.000		
A3		MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	25.181	25.211	0.062	100.000	100.000		
A4	10A	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.794	28.753	0.058	7.936	8.165	0.324	
A5	10A	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.711	28.753	0.058	8.395	8.165	0.324	
A6	10E	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.783	28.756	0.038	7.996	8.144	0.209	
A7	10E	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.729	28.756	0.038	8.292	8.144	0.209	
A8	100A	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.035	25.062	0.038	103.624	101.732	2.676	
A9	100A	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.090	25.062	0.038	99.840	101.732	2.676	
A10	100E	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.204	25.229	0.035	92.345	90.792	2.196	
A11	100E	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.254	25.229	0.035	89.239	90.792	2.196	
A12	C-MR186	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	42.556	36.256	8.910	0.001	1.794	2.536	
B1		MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	28.357	28.274	0.095	10.000	10.000		
B2		MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	28.170	28.274	0.095	10.000	10.000		
B3		MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	28.294	28.274	0.095	10.000	10.000		
B4	10B	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.868	28.774	0.133	7.541	8.058	0.731	
B5	10B	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.680	28.774	0.133	8.574	8.058	0.731	
B6	10F	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.820	28.754	0.093	7.796	8.162	0.517	
B7	10F	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.689	28.754	0.093	8.528	8.162	0.517	
B8	100B	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.070	25.095	0.036	101.198	99.482	2.427	
B9	100B	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.120	25.095	0.036	97.766	99.482	2.427	
B10	100F	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.150	25.214	0.090	95.791	91.792	5.654	
B11	100F	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.278	25.214	0.090	87.794	91.792	5.654	
B12	C-MR186	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	29.955	36.256	8.910	3.586	1.794	2.536	
C1		MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	31.883	31.815	0.098	1.000	1.000		
C2		MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	31.859	31.815	0.098	1.000	1.000		
C3		MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	31.703	31.815	0.098	1.000	1.000		
C4	10C	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.689	28.701	0.016	8.524	8.458	0.093	
C5	10C	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.712	28.701	0.016	8.392	8.458	0.093	
C6	10G	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.693	28.718	0.035	8.500	8.361	0.198	

C7	10G	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.742	28.718	0.035	8.221	8.361	0.198
C8	100C	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.025	25.070	0.064	104.376	101.260	4.406
C9	100C	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.115	25.070	0.064	98.144	101.260	4.406
C10	100G	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.120	25.182	0.087	97.761	93.830	5.559
C11	100G	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.243	25.182	0.087	89.900	93.830	5.559
C12	NTC	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	43.770	45.245	2.086	0.000	0.000	0.000
D1		MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	35.451	35.258	0.181	0.100	0.100	
D2		MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	35.090	35.258	0.181	0.100	0.100	
D3		MON88913	STANDARD	FAM	NFQ-MGB	35.235	35.258	0.181	0.100	0.100	
D4	10D	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.847	28.884	0.053	7.654	7.463	0.271
D5	10D	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.922	28.884	0.053	7.271	7.463	0.271
D6	10H	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.885	28.883	0.003	7.456	7.468	0.016
D7	10H	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	28.880	28.883	0.003	7.479	7.468	0.016
D8	100D	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.268	25.204	0.090	88.394	92.389	5.650
D9	100D	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.141	25.204	0.090	96.384	92.389	5.650
D10	100H	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.079	25.127	0.067	100.540	97.377	4.474
D11	100H	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	25.174	25.127	0.067	94.214	97.377	4.474
D12	NTC	MON88913	UNKNOWN	FAM	NFQ-MGB	46.720	45.245	2.086	0.000	0.000	0.000
E1		acp	STANDARD	FAM	TAMRA	22.906	22.899	0.020	100.000	100.000	
E2		acp	STANDARD	FAM	TAMRA	22.915	22.899	0.020	100.000	100.000	
E3		acp	STANDARD	FAM	TAMRA	22.876	22.899	0.020	100.000	100.000	
E4	10A	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.026	23.030	0.005	101.427	101.174	0.358
E5	10A	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.034	23.030	0.005	100.920	101.174	0.358
E6	10E	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.955	22.991	0.051	106.419	103.892	3.574
E7	10E	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.027	22.991	0.051	101.365	103.892	3.574
E8	100A	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.907	22.925	0.027	109.900	108.527	1.942
E9	100A	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.944	22.925	0.027	107.154	108.527	1.942
E10	100E	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.950	22.941	0.012	106.765	107.364	0.847
E11	100E	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.933	22.941	0.012	107.963	107.364	0.847
E12	NTC	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	25.917	19.208	9.488	14.646	58,314.855	82,448.945
F1		acp	STANDARD	FAM	TAMRA	26.745	26.682	0.057	10.000	10.000	
F2		acp	STANDARD	FAM	TAMRA	26.664	26.682	0.057	10.000	10.000	
F3		acp	STANDARD	FAM	TAMRA	26.636	26.682	0.057	10.000	10.000	
F4	10B	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.047	23.099	0.074	100.066	96.661	4.817
F5	10B	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.152	23.099	0.074	93.255	96.661	4.817

F6	10F	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.073	23.110	0.053	98.293	95.909	3.372
F7	10F	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.148	23.110	0.053	93.524	95.909	3.372
F8	100B	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.971	22.931	0.057	105.262	108.192	4.144
F9	100B	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.890	22.931	0.057	111.122	108.192	4.144
F10	100F	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.938	22.901	0.052	107.594	110.325	3.861
F11	100F	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.864	22.901	0.052	113.055	110.325	3.861
F12	NTC	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	12.499	19.208	9.488	116,615	58,314.855	82,448.945
G1		acp	STANDARD	FAM	TAMRA	30.094	29.982	0.117	1.000	1.000	
G2		acp	STANDARD	FAM	TAMRA	29.990	29.982	0.117	1.000	1.000	
G3		acp	STANDARD	FAM	TAMRA	29.861	29.982	0.117	1.000	1.000	
G4	10C	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.968	22.980	0.017	105.473	104.655	1.157
G5	10C	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.991	22.980	0.017	103.837	104.655	1.157
G6	10G	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.957	22.928	0.042	106.233	108.371	3.024
G7	10G	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.898	22.928	0.042	110.509	108.371	3.024
G8	100C	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.931	22.935	0.006	108.120	107.827	0.415
G9	100C	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.939	22.935	0.006	107.533	107.827	0.415
G10	100G	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.947	22.950	0.004	106.940	106.718	0.313
G11	100G	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.954	22.950	0.004	106.497	106.718	0.313
G12	C- MR100	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	30.618	20.569	14.211	0.629	219,313.29	310,154.93
H1		acp	STANDARD	FAM	TAMRA	33.399	33.265	0.119	0.100	0.100	
H2		acp	STANDARD	FAM	TAMRA	33.221	33.265	0.119	0.100	0.100	
H3		acp	STANDARD	FAM	TAMRA	33.174	33.265	0.119	0.100	0.100	
H4	10D	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.968	22.965	0.004	105.474	105.673	0.282
H5	10D	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.962	22.965	0.004	105.872	105.673	0.282
H6	10H	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	23.014	23.002	0.017	102.250	103.090	1.188
H7	10H	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.990	23.002	0.017	103.931	103.090	1.188
H8	100D	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.923	22.940	0.023	108.669	107.487	1.672
H9	100D	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.956	22.940	0.023	106.304	107.487	1.672
H10	100H	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.914	22.920	0.008	109.332	108.936	0.559
H11	100H	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	22.925	22.920	0.008	108.540	108.936	0.559
H12	C- MR100	acp	UNKNOWN	FAM	TAMRA	10.521	20.569	14.211	438,625	219,313.29	310,154.93