

Formulario Solicitud de Evaluación ante el Comité Evaluador de Sistemas de Muestreo, Testeo y Análisis de detección en grano de secuencias de ADN o proteínas específicas (Res. MINAGRO 147/16).

Formulario para métodos DFL

DATOS DEL SOLICITANTE

1. NOMBRE O RAZÓN SOCIAL: Bioceres Semillas S.A.
2. DOMICILIO REAL: Ocampo 210 Bis, Rosario, Santa Fe, CP: 2000.
3. DOMICILIO LEGAL CONSTITUIDO EN EL ÁMBITO DE LA CABA: Reconquista 661 1er Piso CP: C1003ABM.
4. TELÉFONO: 341 486 1100
5. CORREO ELECTRÓNICO: celina.trucco@bioceres.com.ar
6. NOMBRE Y APELLIDO DEL REPRESENTANTE LEGAL/APODERADO: Celina Trucco, apoderada, cuyo copia certificada y legalizada del poder fue acompañado con fecha 6 de mayo en la mesa de entradas del Ministerio de Agroindustria, bajo el Nro. 17763, en el expediente CUDAP S05: 18383/2016 en el marco de la Resolución MINAGRO Nro. 147/2016.
7. TIPO Y NÚMERO DE DOCUMENTO: DNI 18 571 826
8. DOMICILIO LEGAL: Ocampo 210 Bis, Rosario, Santa Fe, CP: 2000.
9. TELÉFONO: 341 486 1100
10. CORREO ELECTRÓNICO: celina.trucco@bioceres.com.ar
11. JUSTIFICACION DEL INTERÉS LEGÍTIMO:

El interés legítimo de Bioceres Semillas en la solicitud de aprobación del método de detección de la tecnología INTACTA RR2 PRO, surge de su carácter de licenciataria de la biotecnología INTACTA RR2 PRO para el desarrollo de variedades de soja y la consecuente producción y comercialización de semillas de soja con dicha tecnología. La no aceptación de la presente solicitud, afectará la comercialización de la tecnología INTACTA RR2 PRO, impactando la continuidad de la licencia y generando un grave daño tanto a su negocio actual como futuro.

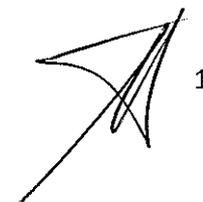
Se adjunta una copia de la Oferta de Licencia para el Desarrollo, Producción y Comercialización de Semilla de Soja con Tecnología INTACTA RR2 PRO, firmado entre Bioceres Semillas S.A. y Monsanto Argentina S.A.I.C. con fecha 18 de diciembre de 2014.

INFORMACION DEL MÉTODO

1. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ANALISIS

1.1. Propósito y relevancia del método

El método de análisis en formato de tiras reactivas desarrollado por la empresa EnviroLogix™, conocido comercialmente como “Kit de Tiras QuickStix™ C1MT” (Nº de Producto AS033), es un inmunoensayo cualitativo destinado a determinar la



1

existencia de la proteína Cry1Ac, presente en la tecnología INTACTA RR2 PRO[®] (acumulación de eventos MON 89788 x MON 87701), en muestras de granos de soja. La elección de la proteína Cry1Ac (expresada por el evento MON 87701) para la identificación de la tecnología INTACTA RR2 PRO[®] –en lugar de la proteína CP4 EPSPS (expresada por el evento MON 89788, también conocido como RR2)– es consecuencia de que en el mercado local existe otro evento de soja ampliamente difundido, el evento 40-3-2 conocido como soja RR1, que también expresa la proteína CP4 EPSPS. Por lo tanto en este contexto, la manera unívoca de identificar la tecnología de soja INTACTA RR2 PRO[®] a través de un método basado en proteína, es hacerlo a través de la identificación de la proteína Cry1Ac.

Los kits producidos por EnviroLogix[™] se desarrollan y fabrican siguiendo criterios que cumplen con las especificaciones de rendimiento de estándares de calidad establecidos por la industria de manera tal de garantizar una alta calidad y uniformidad en todos los kits de prueba (Anexos 1 y 2). Cabe destacar que la tira *QuickStix[™] CIMT* está diseñada con una sensibilidad tal de arrojar resultados negativos al ser testeadas en muestras de soja que contengan menos del 5% de la tecnología INTACTA RR2 PRO[®]. Esto garantiza que a bajos niveles, en presencia adventicia o incluso en el caso de contaminación accidental de la muestra con el evento en cuestión, la tecnología INTACTA RR2 PRO[®] no sea detectada. Por otro lado, la tira *QuickStix[™] CIMT* resulta negativa al evaluar muestras de soja RR1 o soja convencional.

La tira reactiva *QuickStix[™] CIMT* es un inmunoensayo diseñado en un formato de Dispositivos de Flujo Lateral (DFL). Los métodos basados en DFL se encuentran ampliamente utilizados en diferentes áreas, tales como la clínica o la agricultura ya que permiten realizar análisis rápidos de detección del analito de interés. La relevancia de esta técnica radica en el desarrollo de un dispositivo portátil de fácil transporte y bajo costo que no requiere equipamiento de laboratorio ni de un entrenamiento complejo por parte del operario. Por otra parte, los métodos basados en DFL son estables, robustos, duraderos, no requieren refrigeración durante su almacenamiento, además de producir resultados fiables dentro de los 10 a 20 minutos. Gracias a estas ventajas, durante la última década, las técnicas en base a DFL fueron ampliamente utilizadas como una herramienta de análisis para la detección de proteínas transgénicas en cultivos, semillas y alimentos genéticamente modificados (Shan, 2011).

1.2. Componentes del método

Cada kit de tiras *QuickStix[™] CIMT* para la detección de la tecnología INTACTA RR2 PRO[®] en muestras de grano de soja consta de los componentes que se listan a continuación:

- (1) Envase de tiras reactivas
- (50) Tiras *QuickStix[™] CIMT*

- (1) Recipiente de medición
- (50) Pipetas
- (50) Tubos de muestreo
- (1) Inserto
- El kit no incluye la tabla para contar granos, el triturador ni sus componentes ni el reloj cronómetro. En el Anexo 3 se incluye el inserto completo para mayores detalles.

Las tiras *QuickStix*TM (Figura 1) constan en un extremo de un parche o *pad* de muestra (*sample pad*), el cual se pone en contacto con la muestra a analizar. Luego se encuentra el *pad* de conjugado que contiene el primer anticuerpo específico contra la proteína Cry1Ac marcado. Dicho anticuerpo se encuentra conjugado a partículas de oro coloidal (reactivo detector) que se utiliza como marcador del resultado del ensayo. Posteriormente, la tira presenta una membrana de nitrocelulosa, que tiene anticuerpos inmovilizados en dos zonas específicas de la misma. En la primer zona, denominada Línea de Ensayo, se encuentran inmovilizados anticuerpos específicos contra la proteína Cry1Ac y a 0,5 cm está la segunda zona, denominada Línea de Control, en donde un segundo anticuerpo inespecífico reconoce al primer anticuerpo marcado. Finalmente, en el otro extremo de la tira, se encuentra el *pad* absorbente que permite que la muestra migre cromatográficamente por la membrana y además evita el retroceso del líquido hacia la misma.

1.3. Descripción detallada del fundamento científico de la técnica.

El “Kit de Tiras *QuickStix*TM CIMT” es un inmunoensayo cromatográfico rápido de detección visual y cualitativa basado en la migración por capilaridad de un fluido a través de una membrana y basado en el principio de uniones específicas entre antígenos y anticuerpos.

La tecnología DFL, en la cual se basa el desarrollo de las tiras *QuickStix*TM CIMT, tiene un fundamento científico muy similar al inmunoensayo enzimático conocido como ELISA (acrónimo del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Los dispositivos de flujo lateral son esencialmente inmunoensayos desarrollados para funcionar a lo largo de un único eje de tal manera de ser adaptados al formato de tiras reactivas (*test strips*). La función del anticuerpo en las tecnologías basadas en DFL es la misma que en las técnicas de ELISA excepto por el hecho que el anticuerpo que detecta la proteína en cuestión se encuentra conjugado con una partícula marcada (en este caso oro coloidal) que emite una señal visible (en este caso las bandas color rojo-rosado características).

Para detectar la presencia de la tecnología de soja INTACTA RR2 PRO[®], la proteína Cry1Ac debe ser extraída del grano por medio de la molienda de los mismos. De esta manera, y tras el agregado de 100 mL de agua de la canilla y la homogeneización correspondiente, la proteína Cry1Ac es solubilizada en el extracto acuoso (Anexo 3).

Como se mencionó anteriormente, la tira reactiva consta de distintos parches o *pads* en cada extremo: el *pad* de muestra y el *pad* de conjugado en la parte inferior y el *pad* absorbente en la parte superior de la tira (Figura 1). En la zona central se encuentra una membrana de nitrocelulosa que contiene los anticuerpos inmovilizados que determinan las zonas de reacción. Como se comentó en el punto anterior, en la parte inferior de la membrana se encuentra la Línea de Ensayo que contiene anticuerpos específicos para la proteína Cry1Ac y en la parte superior de la misma se localiza la Línea de Control con anticuerpos inespecíficos que reconocen al anticuerpo conjugado anti Cry1Ac (Figura 1).

Para iniciar la reacción, la tira se inserta en el tubo de muestreo de modo que parte del *pad* de muestra quede sumergido en la fase acuosa de la muestra contenida en el tubo. El extracto sube por capilaridad a través del *pad* de conjugado y de la membrana de nitrocelulosa y es absorbido en el extremo superior donde se encuentra el *pad* absorbente. Una vez que el extracto hidrata el *pad* de muestra y sube por el *pad* de conjugado, el reactivo detector presente en el mismo, o sea el anticuerpo anti-Cry1Ac conjugado a oro coloidal, es solubilizado. De esta manera, el reactivo detector junto con el extracto comienza a fluir cromatográficamente a través de la membrana de nitrocelulosa hasta el *pad* absorbente ubicado en el otro extremo de la tira. A medida que el frente de corrida avanza, si la proteína Cry1Ac (el analito) se encuentra presente en la solución, la misma interactúa con el anticuerpo anti Cry1Ac conjugado al oro coloidal y es “marcada” a través de una reacción específica antígeno-anticuerpo (Cry1Ac - Anticuerpo-anti-Cry1Ac conjugado a oro coloidal).

A medida que la muestra pasa sobre la Línea de Ensayo, el complejo “proteína Cry1Ac-anticuerpo anti Cry1Ac conjugado a oro coloidal” es capturado por los anticuerpos específicos para la proteína Cry1Ac inmovilizados en la membrana, formando así un *sandwich* de “anticuerpo de captura-Cry1Ac -anticuerpo anti Cry1Ac conjugado”; desarrollándose consecuentemente una banda de color rojo-rosado en esta zona específica de la tira. Si por el contrario, la proteína Cry1Ac no está presente, o se encuentra en muy bajas concentraciones, por debajo del límite de detección, no se forma este *sandwich* de “anticuerpo de captura-Cry1Ac -anticuerpo anti Cry1Ac conjugado” y por lo tanto no se observa ninguna banda coloreada en la Línea de Ensayo.

Para que la prueba sea válida, debe desarrollarse indefectiblemente una segunda banda de color rojo-rosado, en la Línea de Control, aproximadamente a unos 0,5 cm por encima de la Línea de Ensayo. El desarrollo de la Línea de Control dentro de los cinco minutos de duración de la reacción indica que la tira *QuickStix™ CIMT* funciona correctamente.

En resumen, transcurridos los cinco minutos de reacción i) la presencia de dos bandas coloreadas en la tira *QuickStix™ CIMT* indica la presencia de la proteína Cry1Ac en la muestra y por lo tanto debe ser interpretado como un resultado positivo para la

tecnología INTACTA RR2 PRO[®]. ii) Si no se observa la Línea de Ensayo (pero sí la Línea de Control) el resultado debe ser interpretado como negativo para la tecnología INTACTA RR2 PRO[®]. iii) La ausencia de la Línea de Control invalida el ensayo por lo que el mismo debe repetirse (Figura 2).

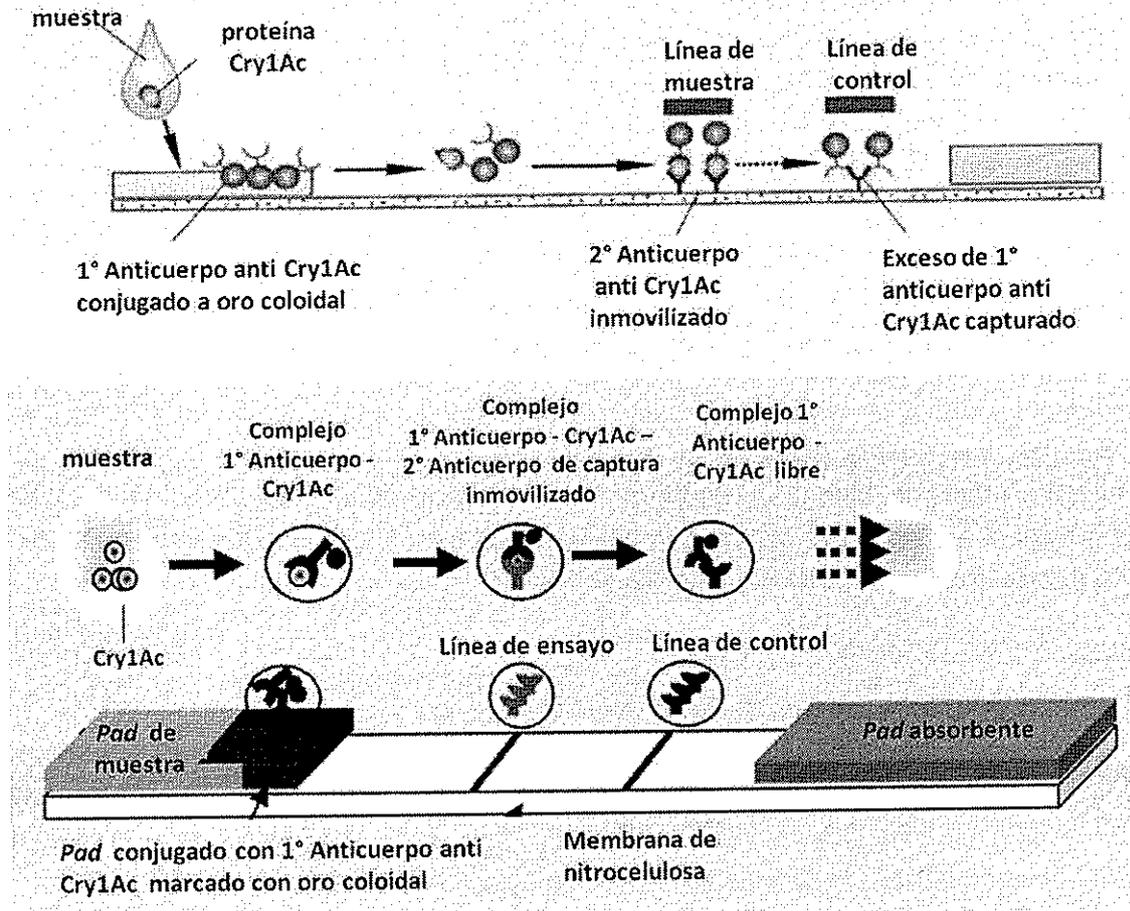
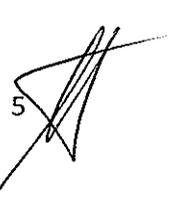


Figura 1: Fundamento del funcionamiento de la tira *QuickStix™ CIMT*. (Adaptado de la Figura 5.1 de Shan, 2011).

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

Este inmunoensayo en formato de dispositivo de flujo lateral para detección de la soja con la tecnología INTACTA RR2 PRO[®], implica la unión de la proteína específica Cry1Ac –expresada por esta tecnología– entre dos capas de anticuerpos que son específicos para dicha proteína. La primera capa corresponde a los anticuerpos inmovilizados en la membrana de la tira y la otra a los anticuerpos marcados con las partículas de oro coloidal que proporcionan el color de la Línea de Ensayo cuando está presente la proteína de interés. En el caso este tipo de formato “sandwich”, la relación

5



entre los reactivos (anticuerpos específicos) y la cantidad de proteína presente en la muestra es proporcional y no hay amplificación de la señal como sí ocurre en el caso de otros métodos, como ser la PCR. En el caso del método en consideración, o sea las tiras *QuickStix™ CIMT*, los resultados son fácilmente interpretables por el operador, ya que se trata de una prueba cualitativa de lectura visual que no requiere ningún dispositivo adicional para la determinación e interpretación de los resultados. Por lo tanto, para este tipo de inmunoensayos cualitativos, no corresponde la especificación de un modelo de predicción o un modelo matemático.

1.5. Aplicabilidad del ensayo

El método identificado como tiras *QuickStix™ CIMT* (N° de Producto AS033) está diseñado para ser usado en muestras de (100) granos de soja. La detección cualitativa de la proteína Cry1Ac en cualquier otro tipo de muestra o tejido no ha sido validada.

El procesamiento de la muestra debe hacerse utilizando las indicaciones, el instrumental y bajo los parámetros (tiempos de molienda, tiempos de agitación, volúmenes de dilución y muestreo, tiempo de reacción, etc.) descriptos de manera gráfica y para una mejor interpretación en el inserto que acompaña el kit (Anexo 3). A continuación un resumen de los pasos y condiciones más relevantes:

Paso 1: Contar 100 granos de soja.

Paso 4: Triturar 20 segundos a máxima velocidad.

Paso 5: Agregar 100mL de agua de la canilla.

Paso 7: Agitar vigorosamente la mezcla diez veces.

Paso 8: Dejar reposar 15 a 20 segundos antes de tomar la muestra.

Paso 9: Tomar la muestra con la pipeta provista y evitando material particulado, llenar el tubo hasta la marca indicada.

Paso 10: Colocar la tira y dejar reaccionar durante 5 minutos.

Las condiciones de almacenaje y manipulación de las tiras reactivas así como la limpieza de los materiales pueden afectar el desempeño del kit. Estas observaciones, junto con las normas de seguridad para el operario se describen en detalle en el inserto del kit. Brevemente se mencionan a continuación:

Almacenaje: A temperatura ambiente o refrigerado para aumentar su vida útil. No exponer el kit a temperaturas extremas. No deje el kit expuesto al sol o dentro de un vehículo. No deje las tiras expuestas a condiciones de alta humedad.

Manipulación de las tiras: Evitar exponer las tiras a la humedad. No abrir el envase de las tiras hasta usar las mismas. Sacar solamente las tiras necesarias para el ensayo a ser realizado. Evitar doblarlas.

Limpieza: Evitar la contaminación cruzada con granos, líquidos o polvo, limpiar a fondo el vaso, la tapa blanca y la unidad de cuchillas liberándolos de polvo y residuos antes de preparar otra muestra. Para cada muestra usar una pipeta nueva y un tubo de muestreo nuevo.

Seguridad: Siempre utilizar protección ocular y tener cuidado al manipular la unidad de las cuchillas y al usar el triturador. Se recomienda colocar una cubierta protectora sobre el vaso del triturador.

2. ANTECEDENTES DE PRUEBAS REALIZADAS AL METODO

2.1. Ensayos de laboratorio único

Tanto el desarrollo, como la validación de la tira reactiva *QuickStixTM CIMT* fueron realizados por EnviroLogixTM. Durante la validación (Anexo 5), tres lotes de tiras reactivas fueron evaluados con muestras de sojas de diversas variedades (incluidas convencional, RR1 e INTACTA RR2 PRO[®]) obtenidas en diferentes campañas. Además de los ensayos de desempeño, se realizaron ensayos reactividad cruzada, efecto prozona, robustez y estabilidad del kit, para los cuales según el caso se probaron también otros materiales como muestras de maíz o sojas transgénicos.

Se concluyó que tira reactiva *QuickStixTM CIMT* se encontró dentro de las especificaciones para todos los parámetros evaluados. La tira siempre dio resultados negativos para muestras conteniendo menos del 5% de granos de soja INTACTA RR2 PRO[®] y resultó positiva en muestras con niveles superiores de dicha tecnología en la muestra (Anexo 1).

Las tiras no mostraron reactividad frente a otras proteínas similares a la Cry1Ac (expresada en la soja INTACTA RR2 PRO[®]) ni mostraron reactividad cruzada con otras proteínas de la matriz presentes en maíz y en soja. Tampoco vieron disminuida su reactividad a concentraciones creciente del analito en la muestra, evidenciando así la ausencia de efecto prozona. Por otra parte, los ensayos de robustez demostraron que pequeños cambios en el procedimiento descrito en el inserto de uso no produjeron resultados inválidos.

2.2. Ensayos en colaboración

El desempeño de la tiras *QuickStixTM CIMT* fue verificado y certificado por el Instituto Argentino de Normalización y Certificación (IRAM). En dicho ensayo se verificó la

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and lines, located in the bottom right corner of the page.

reactividad y reproducibilidad de un lote de tiras *QuickStix™ CIMT* con muestras de soja INTACTA RR2 PRO® y otra soja transgénica (no *Bt*) (Anexo 4).

2.3. Materiales de referencia

Como material de referencia se utilizó proteína Cry1Ac recombinante producida en *E. coli*. Para generar las muestras ensayadas durante la validación, a partir de una solución concentrada de esta proteína, se obtuvieron diluciones en una matriz de granos de soja convencional procesada según el protocolo propuesto en el inserto del kit. Las tiras evaluadas con dichas muestras resultaron reactivas durante la prueba según lo esperado.

Además, durante la validación se utilizaron siete lotes de semilla de soja INTACTA RR2 PRO®, cuatro lotes de semilla RR1 y cinco lotes de semillas de soja convencional. Todas las muestras reaccionaron como se esperaba al ser evaluadas con las tiras *QuickStix™ CIMT*.

2.4. Método de confirmación

Como método confirmatorio puede utilizarse el ELISA cualitativo *QualiPlate Cry1Ab/Cry1Ac* (Cat# AP 003 CRBS, EnviroLogix™, USA) disponible comercialmente. Este inmunoensayo, que utiliza otro set de anticuerpos para reconocer la proteína Cry1Ac, fue utilizado para confirmar la presencia o ausencia de la proteína *Bt* en las muestras utilizadas en la validación.

Otros métodos confirmatorios para la detección de la tecnología de soja INTACTA RR2 PRO® son las PCR disponibles públicamente a través de la página web del JRC (<https://ec.europa.eu/jrc/>):

- *JRC - Report on the Verification of the Performance of MON87701 and MON89788 Event-specific Methods on the Soybean Event MON87701 x MON89788 Using Real-time PCR.*
- *JRC - Event-specific Method for the Quantification of Soybean MON 87701 Using Real-time PCR.*

2.5. Determinación del Límite de Detección

Las tiras reactivas *QuickStix™ CIMT* están diseñadas para dar resultados negativos al ser testeadas en muestras de soja que contengan menos de un 5% de la tecnología INTACTA RR2 PRO®.

Este umbral de detección ha sido intencionalmente establecido para evitar la detección de la tecnología INTACTA RR2 PRO® en niveles por debajo del 5%, producto por ejemplo, de la presencia adventicia del evento o la contaminación accidental de la muestra, o la presencia de polvillo del transporte previo de soja INTACTA RR2 PRO®.

2.6. Efecto de gancho

A partir de una solución concentrada de proteína Cry1Ac recombinante producida en *E. coli*, se obtuvieron diluciones seriadas en una matriz de granos de soja convencional procesada según el protocolo propuesto en el inserto del kit. Se ensayaron, con tres lotes de tiras reactivas, muestras con una concentración de 50 a 400 ng/ml de proteína Cry1Ac. En todos los casos se observó que la intensidad de la línea reactiva se incrementaba al aumentar la concentración de la proteína *Bt* en la muestra.

Estos resultados manifiestan que no existe pérdida de reactividad al incrementarse la concentración de la proteína en la muestra, descartando la existencia de efecto prozona (efecto gancho) en las concentraciones evaluadas.

2.7. Reactividad cruzada

Durante la validación se procesaron una serie de muestras que potencialmente podrían presentar reactividad cruzada con las tiras *QuickStix*™ *C1MT* dado el tipo de proteínas *Bt* que presentan. Se ensayaron por triplicado muestras al 100% de maíz MON 810 (que expresa la proteína Cry1Ab), maíz Bt11 (que expresa la proteína Cry1Ab) y maíz MON 89034 (que expresa las proteínas Cry1A.105 y la Cry2Ab2). También se ensayaron muestras de soja transgénica (además de RR1, que expresa la proteína CP4 EPSPS) comercialmente disponible en Estados Unidos.

En ninguno de los casos se observaron resultados falsos positivos, confirmando la ausencia de reactividad cruzada con las proteínas *Bt* similares presentes en el mercado u otras proteínas transgénicas presentes en las muestras ensayadas.

2.8. Efectos de la matriz

Como lo evidencian los resultados de evaluación de especificidad obtenidos durante la validación, la reactividad del método no se vio afectada por ninguna sustancia presente en el extracto obtenido del procesamiento de las semillas. Solamente muestras conteniendo la tecnología INTACTA RR2 PRO® mostraron resultados positivos con las tiras *QuickStix*™ *C1MT*.

Estos resultados permitieron concluir que no se observa efecto matriz en las tiras *QuickStix*™ *C1MT* utilizadas en la detección de la tecnología INTACTA RR2 PRO®.

2.9. Tasas de resultados falso positivos y falso negativos

Durante la validación se realizaron ensayos para determinar el desempeño de la tira con muestras negativas y positivas. Para esto se prepararon un total de 433 muestras ciegas de varias composiciones, o sea distintas mezclas de granos de soja INTACTA RR2 PRO[®] con granos de soja sin esta tecnología en el rango de 0% a 100%. Cada muestra se ensayó por triplicado resultando en un total de 1299 datos.

Dado que las tiras reactivas *QuickStixTM CIMT* han sido intencionalmente diseñadas para dar resultados negativos al ser testeadas en muestras de soja que contengan menos de un 5% de la tecnología INTACTA RR2 PRO[®] a fin de evitar detectar cualquier presencia adventicia o contaminación en la muestra, resulta útil analizar los resultados separando las muestras de acuerdo al porcentaje de semillas con la tecnología en evaluación.

Los resultados muestran que no hubo falsos positivos en ninguna de las muestras conteniendo 0% (n=150) o 5% (n=360) de INTACTA RR2 PRO[®], siendo la tasa de falsos positivos igual a 0%. Estos resultados caen dentro de la tasa de falsos positivos permitida (1% con un intervalo de confianza del 95%); cumpliendo así con las especificaciones del diseño de la tira, o sea la NO detección de la tecnología INTACTA RR2 PRO[®] en escenarios de presencia adventicia o posible contaminación de la muestra.

En el caso de las muestras con composiciones igual o superiores al 10% de INTACTA RR2 PRO[®] (n=789), se observa un número de resultados falsos negativos que disminuye gradualmente hasta llegar a cero en muestras de composiciones de 40% de INTACTA RR2 PRO[®] o superiores. Entre el 45% y el 100% los resultados caen dentro de la tasa de falsos negativos permitidos (5% con un intervalo de confianza del 95%). Estos valores son los descriptos para los métodos inmunológicos al ser utilizados como herramientas analíticas para la detección de biotecnología agrícola (Grothaus et al, 2006).

En conclusión, la tasa de falsos positivos es igual a 0% en muestras con composiciones inferiores al 5% de INTACTA RR2 PRO[®], sumado a la presencia de los resultados falsos negativos mayormente en muestras con composiciones cercanas al valor de corte del 5% confirman el correcto desempeño de las tiras reactivas *QuickStixTM CIMT* para los fines declarados: evitar la detección de la tecnología INTACTA RR2 PRO[®] en casos de una posible contaminación de la muestra. En términos prácticos esto asegura que una carga que contenga alguna contaminación de hasta un 5% de INTACTA RR2 PRO[®] no sea detectada como positiva.

3. INFORMACIÓN ACERCA DEL RENDIMIENTO DEL MÉTODO

3.1. Comprobación de la selectividad

Durante el desarrollo se partió de más de quince anticuerpos específicos Anti-Cry1Ac, de los cuales luego de una serie de ensayos, se seleccionó especialmente por su selectividad y reactividad, el par de anticuerpos (conjugado y de membrana) utilizados en las tiras *QuickStix™ CIMT*.

La selectividad de la tira *QuickStix™ CIMT* por la proteína Cry1Ac presente en la soja INTACTA RR2 PRO® se verificó empíricamente en los ensayos de reactividad cruzada realizados durante la validación que fueron mostrados anteriormente, en el punto 2.7.

3.2. Comprobación de la estabilidad del analito

El método *QuickStix™ CIMT* está diseñado para ser usado en muestras de granos de soja para la detección cualitativa de la proteína Cry1Ac, el analito. La muestra se prepara inmediatamente antes de ser utilizada. El procedimiento, que se realiza a temperatura ambiente y no dura más de unos 3 minutos, se inicia con el conteo de los granos y el procesamiento de los mismos hasta la obtención de la muestra acuosa, sobre la que se sumerge parcialmente la tira reactiva para obtener el resultado tras 5 minutos. En este sentido, los ensayos de robustez, mostrados en el punto 3.4, pueden resultar un buen indicio empírico de la estabilidad del analito.

Por lo tanto, dado el procedimiento a seguir, descrito en el inserto adjunto al Kit de Tiras *QuickStix™ CIMT*, la muestra será procesada y analizada en un corto lapso de tiempo por lo que no resulta necesario un estudio exhaustivo de la estabilidad del analito.

3.3. Comprobación de la sensibilidad

Las tiras reactivas *QuickStix™ CIMT* están diseñadas para dar resultados negativos al ser testeadas en muestras de soja que contengan menos de un 5% de la tecnología INTACTA RR2 PRO®. Este umbral de detección ha sido intencionalmente establecido para evitar la detección de la tecnología por ejemplo, ante la presencia adventicia o la contaminación accidental de una carga con INTACTA RR2 PRO®.

En el punto 2.9 se presentaron resultados empíricos acerca de la sensibilidad del método frente a muestras con diferentes concentraciones del analito. Los resultados muestran que no hubo falsos positivos en ninguna de las muestras conteniendo 0% (n=150) o 5% (n=360) de INTACTA RR2 PRO®, siendo la tasa de falsos positivos igual a 0%; cumpliendo con las especificaciones del diseño de la tira.

3.4. Comprobación de la Robustez

La robustez del método fue evaluada a fin de establecer la capacidad de las tiras *QuickStix™ CIMT* de mantener los resultados obtenidos para una muestra dada, frente a

determinadas variaciones en los parámetros de uso indicados en el inserto. Se evaluaron muestras al 5% (negativas) y al 45% (positivas) de soja INTACTA RR2 PRO® a los fines de magnificar cualquier alteración en los resultados, si los hubiera. En cada caso, se evaluaron las condiciones que se muestran en la tabla a continuación, alterando cada parámetro de a uno por vez y siguiendo el inserto de manera habitual para los parámetros que no se alteraron:

CONDICIÓN	MÍNIMO	PROTOCOLO	MÁXIMO
Tiempo de molienda	10 s	20 s	30 s
Volumen de extracción	75 mL	100 mL	150 mL
Agitación para la homogeneización	5 agitaciones	10 agitaciones	20 agitaciones
Tiempo de reposo antes de la toma de muestra	0 s	15-20 s	40 s
Tiempo de reacción de la tira	3 min	5 min	7 min
Tiempo de lectura (tras corte indicado en figura del punto 8.1)	3 min	5 min	7 min

Los resultados de los ensayos, mostrados en el Anexo 5, mostraron que en todos los casos las tiras QuickStix™ CIMT reaccionaron como era esperado para cada una de las muestras a pesar de los cambios realizados en el protocolo. Se puede concluir así que el método es lo suficientemente robusto para soportar algunos cambios involuntarios en el protocolo de ensayo sin que se vean alterados los resultados.

3.5. Eficiencia de extracción

Dado que se trata de un método cualitativo de interpretación visual, la eficiencia de la extracción no resulta determinante y por lo tanto no fue establecida.

Durante el desarrollo se establecieron los parámetros operativos (tiempo de molienda, volumen de extracción, tiempos de agitación, etc.) de modo que resulten lo suficientemente eficientes para la extracción de la proteína de la muestra según las necesidades de desempeño de la tira.

Durante la validación, los resultados de desempeño del método descritos en el punto 2.9 mostraron que las tiras reactivas QuickStix™ CIMT cumplen con los objetivos del diseño. De esta manera puede inferirse indirectamente que la extracción de la proteína en la muestra es lo suficientemente efectiva para ayudar a alcanzar los requerimientos del método. Por su parte, los ensayos de robustez del punto 3.4 mostraron que no se vio afectada la eficiencia de la extracción en las condiciones ensayadas.

4. APLICACIÓN PRÁCTICA DEL MÉTODO

4.1. Aplicabilidad (matrices, intervalos, interferencias u otras limitaciones)

Las tiras *QuickStix™ CIMT* fueron diseñadas para ser utilizadas en muestras de 100 granos de soja. Como se mostró anteriormente, durante los ensayos de validación no se observaron efectos de la matriz que puedan afectar el buen desempeño del método. Tampoco se observaron interferencias o reactividad cruzada con otras proteínas Cry.

Como ya se mencionó, las tiras reactivas *QuickStix™ CIMT* están diseñadas para dar resultados negativos al ser testeadas en muestras de soja que contengan menos de un 5% de la tecnología INTACTA RR2 PRO®. Este umbral de detección ha sido intencionalmente establecido para evitar la detección de muestras que no tengan fehacientemente la tecnología, ya sea por presencia adventicia o contaminación accidental de muestras de soja con tecnología INTACTA RR2 PRO®.

Por su parte, los ensayos de robustez mostraron confianza en los resultados provistos por la tira y cierto margen de flexibilidad ante eventuales errores involuntarios del operario.

4.2. Características operacionales y practicabilidad del método

Las tiras *QuickStix™ CIMT* presentan las ventajas típicas de un ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral, como ser simpleza, robustez, rapidez, bajo costo, etc., tal como se describe en mayor detalle a continuación:

- No requieren reactivos adicionales (más que agua de la canilla). El material volumétrico y pipeta para la toma de muestra es provisto en cada kit junto con las tiras reactivas.
- Son estables a temperatura ambiente y no requieren refrigeración.
- Por tratarse de una prueba cualitativa y de interpretación visual, tampoco requiere instrumental de laboratorio específico de mayor complejidad (como podría ser un lector de señal para la obtención de los resultados) por lo que esta prueba puede realizarse en entornos fuera del laboratorio de análisis tradicional.
- Tampoco requiere personal calificado ni altamente entrenado para la realización del ensayo.
- El tiempo de lectura es de 5 minutos. Incluyendo el tiempo de procesamiento de la muestra el ensayo completo no debería incurrir más de 8 minutos por muestra por operario.
- Capacidad de procesamiento: Dependerá de la organización de cada laboratorio según el número de muestras a analizar. En caso de incluir múltiples operarios

y/o máquinas trituradoras, se deberá considerar, según conveniencia, la forma de trabajo en paralelo (cada operario procesa e informa la muestra) o en serie (el protocolo se divide en etapas donde distintos operarios intervienen).

4.3. Diseño de los ensayos

Por tratarse de un método bajo el formato de test rápido, las tiras *QuickStix™ CIMT* no requieren un diseño especial o particular de ensayo, solamente se deben seguir las instrucciones incluidas en el kit.

4.4. Habilidades que deben poseer los operadores

Como se mencionó anteriormente, dada la simpleza del método, para la utilización de las tiras *QuickStix™ CIMT* no se requiere personal calificado ni altamente entrenado. Como mostraron los ensayos de robustez, el método puede amortiguar pequeños errores involuntarios en la ejecución del protocolo por parte del operario sin un efecto en el resultado final.

5. CONTROLES ANALÍTICOS

5.1. Controles utilizados en la práctica rutinaria y su interpretación

La tira *QuickStix™ CIMT* cuenta con un control interno, la Línea de Control, que valida la corrida y por ende el resultado.

En la rutina, cada laboratorio puede establecer sus propios controles de las tiras *QuickStix™ CIMT* procesando muestras de soja certificada, por ejemplo soja INTACTA RR2 PRO® como control positivo y soja RR1 o soja convencional como controles negativo.

6. DESEMPEÑO DEL MÉTODO

6.1. Datos e información que respalde la selección de este método, así como una evaluación general que indique que el método es adecuado para la finalidad pretendida.

Se ha seleccionado el uso de tiras *QuickStix™ CIMT* para la detección de la tecnología INTACTA RR2 PRO® en muestras de grano de soja debido a que se trata de un ensayo de bajo costo (en relación con otros), simple (de baja complejidad y no requiere personal calificado), rápido de realizar (arroja resultados en aproximadamente 8 minutos) y robusto.

Adicionalmente, no requiere un sistema de muestreo diferente al actualmente usado por el comercio de granos. Es decir, el análisis se realiza utilizando el mismo tipo de muestra que se toma para realizar los diferentes análisis comerciales de grano.

7. MUESTREO PREVIO

7.1. Diseño de muestreo

La toma de muestras se realiza según los usos y costumbres que el comercio de granos utiliza para tomar las muestras para realizar análisis comerciales, como por ejemplo el 'visteo *in situ*'.

Con el fin de obtener una muestra representativa a partir de un camión, se sigue el siguiente diseño de muestreo:

Se cala cada sección del vehículo, utilizando un calador sonda de una longitud suficiente como para alcanzar el fondo, introduciéndolo en forma perpendicular al mismo.

- En chasis: Se realizará un mínimo de TRES (3) caladas: al menos UNA (1) en la zona central del chasis, y al menos DOS (2) en dos de los 4 ángulos del chasis, seleccionados al azar, a CUARENTA (40) centímetros aproximadamente de las paredes adyacentes al ángulo.
- En acoplados: Se realizará un mínimo de CINCO (5) caladas: al menos UNA (1) en la zona central del acoplado, y al menos CUATRO (4) en cada ángulo del vehículo, a CUARENTA (40) centímetros aproximadamente de las paredes adyacentes al ángulo.

En cada calada se extraen al menos 250 gramos de grano. El contenido de cada calada se vuelca sobre un lienzo, catre o batea, sobre el cual se procede a mezclar a efectos de lograr una completa homogeneización del grano obtenido.

7.2. Protocolo completo de toma y preparación de muestra

Una vez realizada la homogeneización de las caladas, se preparan las muestras para los análisis comerciales así como para la determinación de los eventos biotecnológicos. Para eventos biotecnológicos se toman y ensobran dos muestras de al menos 400 gramos (muestra y contra-muestra), las cuales son enviadas a las Cámaras Arbitrales / Laboratorios autorizados para el análisis de la muestra y archivo de la contra-muestra. Quedan a disposición de las contrapartes si así lo requieran, muestras adicionales.

Para realizar el análisis QuickStixTM C1MT se toman 100 granos de cada muestra, según se indica en el inserto adjunto al kit.

Los sobres utilizados poseen el formato sugerido por el Instituto Argentino de Sanidad y Calidad Vegetal. En el mismo consta toda la información requerida para la correcta identificación de las muestras en forma reservada para mantener la privacidad de las partes. El cierre de los sobres se realiza de manera tal que sea inviolable, asegurándolos por medio de lacre, precinto o termo sellado.

7.3. Habilidades que deben poseer quienes toman la muestra

El proceso de calado es realizado por el personal capacitado en estas tareas tanto en las Terminales Portuarias como en los Acopios donde se realizan este tipo de procedimientos.

El proceso de preparación de muestras es realizado por personal que posee la habilidad de imprimir etiquetas o sobres con códigos de barras, homogeneizar las distintas caladas, ensobrar muestras, cerrar los sobres de manera inviolable, y archivar temporal o definitivamente muestras y contra-muestras.

8. INTERPRETACION DE RESULTADOS

8.1. Forma en que deben ser informados los posibles resultados del método.

Transcurridos los 5 minutos de reacción se procede a la lectura visual y en forma cualitativa del resultado. Tal como se indica en la siguiente figura, los posibles resultados son:

POSITIVO: Ambas líneas (Línea de Ensayo y Línea de Control) visibles.

NEGATIVO: Línea de Control visibles, no se observa la Línea de Ensayo después de 5 minutos.

INVÁLIDO: no se observa línea de Control

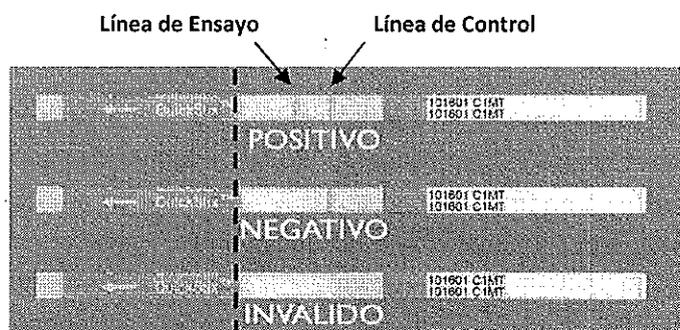


Figura 2: Interpretación de los resultados de la tira *QuickStix™ C1MT*.

En caso de necesitar conservar la tira con el resultado, puede cortarse con tijeras por la línea de puntos, descartando la parte inferior cubierta por la cinta con la flecha blanca.

8.2. Interpretación práctica de los posibles resultados en el comercio de granos

Los resultados deben ser interpretados de la siguiente manera:

POSITIVO: La tecnología INTACTA RR2 PRO[®] está presente en la muestra ensayada.

NEGATIVO: La tecnología INTACTA RR2 PRO[®] está ausente en la muestra ensayada.

INVÁLIDO: Indica que la tira reactiva se ha inactivado y por lo tanto el ensayo debe repetirse.

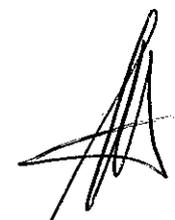
Bibliografía:

Immunoassays in Agricultural Biotechnology. Shan, Guomin (Editor). 2011. John Wiley & Sons (ISBN: 978-0-470-28952-5).

Immunoassay as an Analytical Tool in Agricultural Biotechnology. Grothaus et al.: JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL VOL. 89, NO. 4, 2006

ANEXOS:

1. ENVIROLOGIX – Certificado de Kit C1MT Traducido y Legalizado.
2. ENVIROLOGIX – Certificate of Performance por lote.
3. ENVIROLOGIX Inserto Kit de Tiras QuickStix™ para C1MT.
4. IRAM – Certificado de Análisis – Anexos I, II y III.
5. QuickStix™ Kit for Cry1Ac Value Capture in Soybeans (AS033- C1MT). Product Lateral Flow Test Kit Validation (VAL12-022R), EnviroLogix Inc., Marzo, 2012. **Entregado en sobre aparte como información confidencial.**



BIOCERES SEMILLAS S.A.
Dra. CELINA TRUCCO
APODERADA