

Rosario, 8 de junio de 2016

Comité Evaluador

Subsecretaría de Mercados Agropecuarios

Secretaría de Mercados Agroindustriales

MINISTERIO DE AGROINDUSTRIA

S _____ / _____ D

Ref.: Exp. S05: 0018383/2016 -Resolución MINAGRO N° 147/2016

Celina Trucco, apoderada de Bioceres Semillas S.A., conforme copia certificada y legalizada del poder acompañado con fecha 6 de mayo en la mesa de entradas del Ministerio de Agroindustria, bajo el Nro. 17763, y que declaro que se encuentra vigente, con domicilio real en Ocampo 210 bis, Predio CCT, Edificio Indear, Rosario, Provincia de Santa Fe, y domicilio especial constituido en Reconquista 661, Piso 1 Dpto B, de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CP 1003), me presento en el expediente de la referencia a fin de dar cumplimiento a los requerimientos cursados por el Comité Evaluador dependiente del Ministerio de Agroindustria, y digo:

Que mi parte designa como autorizada técnica para intervenir en la sesión del Comité Evaluador fijada para el día 8 de junio a las 14hs. a Patricia Miranda, D.N.I. 16.681.752, Gerente de Asuntos Regulatorios de Indear S.A., empresa de Investigación y Desarrollo del Grupo Bioceres, conforme poder que se acompaña como Anexo 6.

Asimismo, mi parte pasa a contestar cada uno de las preguntas solicitadas por el Comité Evaluador siguiendo la misma numeración indicada en la vista para su fácil lectura.

I) Cuestiones Generales a la Solicitud:

Aclaración de Envirologix: A lo largo de la presentación, y de estas respuestas, al mencionar % nos referimos a numero de granos/semillas expresando la proteína Cry1Ac cada 100 Granos/semilla totales. Por ej: 5% = 5 granos/semillas expresando la proteína Cry1Ac en 100 granos/semillas totales.

a) En caso que el método (empleando el Kit AS033-C1MT en particular) haya sido validado/aprobado/revisado por alguna autoridad técnica pública o privada, nacional o extranjera, con resultado favorable o desfavorable, favor de detallar y adjuntar los antecedentes correspondientes.

El Instituto Argentino de Normalización y Certificación (IRAM) ha realizado ensayos aplicando el método descrito en el inserto del Kit AS033-C1MT, sobre diversas muestras conteniendo o no soja INTACTA RR2

PRO®. La metodología y los resultados se encuentran detallados en el certificado de ensayo (DC/QA M-001/1 Rev.01). Se adjunta copia en el Anexo 4.

b) Su presentación involucra productos y denominaciones comerciales -potencialmente alcanzados por derechos de propiedad intelectual- así como información confidencial de terceras empresas.

Por consiguiente, presentar documentación que corrobore que Monsanto y Enviroligix están en conocimiento de la presentación de BioCeres relativa a este método, mencionando explícitamente su conocimiento de que cursa en el marco del expte. 18383/16, y que prestan su acuerdo con la misma.

Se adjuntan como Anexo 7, cartas de Enviroligix Inc. y de Monsanto Argentina S.R.L. que dan cuenta que ambas empresas tienen conocimiento de la presentación realizada por mi parte en el marco del expte. 18383/16 y prestan su consentimiento a que mi mandante presente documentación y/o información de ambas empresas para dar una respuesta íntegra a las distintas preguntas requeridas por el Comité Evaluador.

b) El método presentado no es específico del evento cuya denominación comercial es “INTACTA RR2 PRO®”, sino que detecta la proteína Cry1Ac, la cual puede encontrarse en distintos eventos en uso actual o futuro. El propio fabricante del kit lo identifica como un método para Cry1Ac en el anexo confidencial. Por consiguiente, se le requiere modificar la denominación del método y toda referencia a los resultados obtenibles del mismo, por un método para detectar la proteína Cry1Ac en... o una fórmula equivalente.

El kit de Tiras QuickStix™ C1MTes un inmunoensayo cualitativo destinado a determinar la existencia de la proteína Cry1Ac, presente en la tecnología INTACTA RR2 PRO® (acumulación de eventos MON 89788 x MON 87701), en muestras de granos/semillas de soja.

Como se expreso el en formulario presentado originalmente, actualmente el único evento de soja que cuenta con autorización para su comercialización en el mercado argentino que expresa la proteína Cry1Ac es INTACTA RR2 PRO. Si en el futuro se incorporasen al mercado nuevas tecnologías que expresen la misma proteína, se deberán adaptar los métodos de detección.

Con el objetivo de ganar precisión en la terminología utilizada a lo largo de la presentación, se modificaría el texto de la presentación para reflejar que el método en evaluación detecta la proteína Cry1Ac en muestras de granos/semillas de soja, en las siguientes secciones:

Sección	Página	Donde dice	Debería decir
1.2 Componentes del método	2	Cada kit de tiras QuickStix™ C1MT para la detección de la tecnología INTACTA RR2 PRO®	Cada kit de tiras QuickStix™ C1MT para la detección de la proteína Cry1Ac presente en la tecnología INTACTA RR2 PRO®

1.3 Descripción detallada del fundamento científico de la técnica.	3	Para detectar la presencia de la tecnología de soja INTACTA RR2 PRO®, la proteína Cry1Ac debe...	Para detectar la presencia de la proteína Cry1Ac en la tecnología de soja INTACTA RR2 PRO®, la proteína Cry1Ac debe...
1.3 Descripción detallada del fundamento científico de la técnica.	4	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®	ii) Si no se observa la Línea de Ensayo (pero sí la Línea de Control) el resultado debe ser interpretado como negativo para la detección de la proteína Cry1Ac y por lo tanto para la tecnología INTACTA RR2 PRO®
1.4 Especificación del modelo de predicción/modelo matemático necesario para el método	5	Este inmunoensayo en formato de dispositivo de flujo lateral para detección de la soja con la tecnología INTACTA RR2 PRO®, implica...	Este inmunoensayo en formato de dispositivo de flujo lateral para detección de la proteína Cry1Ac presente en la tecnología INTACTA RR2 PRO®, implica...
2.3. Materiales de referencia	7	Las tiras evaluadas con dichas muestras resultaron reactivas durante la prueba según lo esperado.	Las tiras evaluadas con dichas muestras resultaron reactivas en la detección de la proteína Cry1Ac durante la prueba según lo esperado.
2.5. Determinación del Límite de Detección	8	Este umbral de detección ha sido intencionalmente establecido para evitar la detección de la tecnología INTACTA RR2 PRO® en niveles por...	Este umbral de detección ha sido intencionalmente establecido para evitar la detección de la proteína Cry1Ac de la tecnología INTACTA RR2 PRO® en niveles por...

2.8. Efectos de la matriz	9	Solamente muestras conteniendo la tecnología INTACTA RR2 PRO® mostraron resultados positivos con las tiras QuickStix™ C1MT.	Solamente muestras conteniendo la proteína Cr1y1Ac presente en la tecnología INTACTA RR2 PRO® mostraron resultados positivos con las tiras QuickStix™ C1MT.
2.8. Efectos de la matriz	9	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® .	Estos resultados permitieron concluir que no se observa efecto matriz en las tiras QuickStix™ C1MT utilizadas en la detección de la proteína Cry1Ac presente en la soja con la tecnología INTACTA RR2 PRO® .
2.9. Tasas de resultados falso positivos y falso negativos	10	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® ,	Los resultados muestran que no hubo falsos positivos en la detección de la proteína Cry1Ac en ninguna de las muestras conteniendo 0% (n=150) o 5% (n=360) de INTACTA RR2 PRO® ,
2.9. Tasas de resultados falso positivos y falso negativos	10	...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.	... del diseño de la tira, o sea la NO detección de la proteína Cry1Ac de la tecnología INTACTA RR2 PRO® en escenarios de presencia adventicia o posible contaminación de la muestra.
2.9. Tasas de resultados falso positivos y falso negativos	10	En conclusión, la tasa de falsos positivos es igual a 0% en muestras...	En conclusión, la tasa de falsos positivos en la detección de la proteína Cry1Ac es igual a 0% en muestras...

2.9. Tasas de resultados falso positivos y falso negativos	10	...declarados: evitar la detección de la tecnología INTACTA RR2 PRO® en casos de una posible contaminación de la muestra. declarados: evitar la detección de la proteína Cry1Ac presente en soja con la tecnología INTACTA RR2 PRO® en casos de una posible contaminación de la muestra,
3.3. Comprobación de la sensibilidad	11	Las tiras reactivas QuickStix™ C1MT 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® .	Las tiras reactivas QuickStix™ C1MT están diseñadas para dar resultados negativos en la detección de la proteína Cry1Ac al ser testeadas en muestras de soja que contengan menos de un 5% de la tecnología INTACTA RR2 PRO® .
3.3. Comprobación de la sensibilidad	11	Este umbral de detección ha sido intencionalmente establecido para evitar la detección de la tecnología por ejemplo....	Este umbral de detección ha sido intencionalmente establecido para evitar la detección de la proteína Cry1Ac presente en la tecnología por ejemplo...
3.3. Comprobación de la sensibilidad	11	Los resultados muestran que no hubo falsos positivos en ninguna de las muestras conteniendo 0%...	Los resultados muestran que no hubo falsos positivos en la detección de la proteína Cry1Ac en ninguna de las muestras conteniendo 0%...
4.1. Aplicabilidad (matrices, intervalos, interferencias u otras limitaciones)	12	Como ya se mencionó, las tiras reactivas QuickStix™ C1MT 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® .	Como ya se mencionó, las tiras reactivas QuickStix™ C1MT están diseñadas para dar resultados negativos en la detección de la proteína Cry1Ac al ser testeadas en muestras de soja que contengan menos de un 5% de la tecnología INTACTA RR2 PRO® .

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.	14	Se ha seleccionado el uso de tiras QuickStix™ C1MT para la detección de la tecnología INTACTA RR2 PRO® en muestras de grano de soja	Se ha seleccionado el uso de tiras QuickStix™ C1MT para la detección de la proteína Cry1Ac presente en la tecnología INTACTA RR2 PRO® en muestras de grano de soja...
8.2. Interpretación práctica de los posibles resultados en el comercio de granos	16	Los resultados deben ser interpretados de la siguiente manera:	Los resultados de la detección de la proteína Cry1Ac deben ser interpretados de la siguiente manera:

c) El procedimiento de presentación no prevé que pueda presentarse información confidencial. Sin embargo la presentación se ha recibido acompañada de un anexo identificado como “confidencial”, el cual incluye una gran cantidad de información esencial para el trabajo del comité. Además, dicha información ha sido presentada únicamente en inglés y no se ha proporcionado una justificación sustantiva respecto de la necesidad de su confidencialidad. Esta acción inconsulta de su parte ha demorado significativamente la evaluación, dados que nuestros esfuerzos por preservar la confidencialidad del contenido conspiran contra la posibilidad de evaluar ágilmente la información (el sobre solo es abierto y vuelto a cerrar por los miembros de comité estando en funciones).

Por consiguiente, se le solicita que desista de reclamar carácter de confidencial para esta información. En su defecto, debe generar un juego doble de documentación, en la cual exista una copia donde las secciones del documento sensibles se encuentren tachadas y representen la menor cantidad posible del contenido del mismo. Asimismo, en este último supuesto se le requiere justificar la confidencialidad de dichas secciones en relación a la naturaleza de su contenido específico, y al menos sobre la base de los supuestos de la ley 24.766 u otra fundamentación jurídico-administrativa atendible.

Por otra parte, es imprescindible por Ley de Procedimientos Administrativos que presente la correspondiente versión traducida por traductor público nacional matriculado del contenido, tanto confidencial como no confidencial, del documento completo.

Tal como se solicita, se desiste de reclamar el carácter de confidencial para la información presentada en el Anexo 5. En relación a este punto, se solicita que la información de los Anexos 5 y 6, como sea utilizada solamente a los efectos de esta solicitud, evitando su publicación en medios de difusión masivos.

Tal como se solicita, se provee la correspondiente versión traducida por traductor público nacional matriculado de los documentos correspondientes (Anexo 8).

d) Presente un modelo estandarizado de informe de resultados de la aplicación del método (véase debajo lo requerido en relación al ítem 8.2). El mismo deberá:

- **hacer referencia a la presencia/ausencia de la proteína Cry1Ac**
- **explicitar si se refiere a la muestra de 100 granos o al cargamento del que proviene**
- **informar las limitaciones del método (por ejemplo: límite de detección y porcentaje de falsos positivos y falsos negativos en el límite de detección)**
- **identificación del operador del método y los medios de corroborar su capacidad técnica para realizar el mismo.**

El modelo estandarizado de informe de resultados se presenta en el ítem 8.2

II) Cuestiones atinentes a secciones específicas:

1.1 Propósito y relevancia del método

En relación a su aseveración de “los kits...criterios que cumplen con las especificaciones de rendimiento de estándares de calidad establecidos por la industria... garantizar alta calidad y uniformidad...” (en los anexos citados a continuación puede encontrarse una repetición de esta frase pero no mayor información que la sustente). Detalle los estándares de calidad a que hace referencia, enumere las especificaciones de los mismos a que hace referencia que garantizarían calidad y uniformidad, y provea los datos de mediciones realizadas sobre el kit en cuestión que sustenten lo afirmado.

El método de análisis en formato de tiras reactivas desarrollado por la empresa EnviroLogix™, conocido comercialmente como “*Kit de Tiras QuickStix™ CIMT*” (Nº de Producto AS033), es un inmunoensayo cualitativo destinado a determinar la existencia de la proteína Cry1Ac, presente en la tecnología INTACTA RR2 PRO®. La empresa EnviroLogix™, es una compañía líder mundial en la industria que se dedica al desarrollo y la fabricación de kits de prueba de inmunoensayos para múltiples objetivos en la cadena de producción de alimentos, desde semillas y vegetales para el manejo y procesamiento de granos, incluyendo pruebas de patógenos en la producción de alimentos (<http://www.envirologix.com/markets/>). 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 de la presentación original). Cada kit de prueba se fabrica *in situ*, monitoreando el proceso de control de calidad desde el desarrollo inicial de la prueba hasta la fabricación, embalaje y entrega. EnviroLogix™ posee un Sistema de Gestión de Calidad (SGC) altamente estricto, establecido y mantenido en cumplimiento de las BPF (Buenas Prácticas de Fabricación) en todos sus aspectos clave y cuenta con políticas y procedimientos estrictos que respaldan la fabricación de cada uno de sus productos.

Cada lote de un kit tiene un Certificado de Performance (COP) que indica el número de lote, la fecha de vencimiento del mismo y los resultados de los ensayos de prueba (que se obtuvieron siguiendo estrictamente las instrucciones del inserto del producto).

Todos los productos fabricados por EnviroLogix Inc. se adhieren a los lineamientos y procedimientos estrictos de gestión para los cuales han sido aprobados. Los mismos se denominan Procedimientos Operativos Estándar (POE) y son específicos para cada producto. Los Procedimientos Operativos Estándar de cada producto detallan los componentes y las materias primas que se requieren para cada paso de la fabricación del producto. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal de captura específico para la proteína Cry1Ac o el anticuerpo monoclonal conjugado a partículas de oro específico para la proteína Cry1Ac, son evaluados y validados antes de ser utilizados para desarrollar la línea de ensayo presente en la tira del kit. En este caso el uso de anticuerpos monoclonales obtenidos a partir de una línea celular clonal de ratones (hibridoma) presenta diversas ventajas ya que permite purificar dichos anticuerpos de forma uniforme y proveer dichos reactivos de forma constante para desarrollar el kit y de esta manera reducir la variabilidad en la producción y desempeño de estos productos. Por otro lado, otros componentes que son críticos en el desarrollo del Kit CIMT, tales como la membrana de nitrocelulosa o los *pads* de muestra o de conjugado, son evaluados de manera rutinaria y deben cumplir las especificaciones establecidas antes de ser usadas en la producción de las tiras.

Los anticuerpos monoclonales que reaccionan con la proteína Cry1Ac en la línea de ensayo deben ser evaluados de tal manera de cumplir las especificaciones requeridas en cuanto al isotipo, pureza y concentración, además de la masa total requerida. Por lo general, la cantidad de anticuerpo monoclonal producido debe ser suficiente de tal manera de producir un lote de tiras. El mismo principio aplica para el segundo anticuerpo conjugado que se utiliza en la producción de las tiras reactivas. Previo a que dichos anticuerpos sean conjugados a las partículas de oro, los mismos son evaluados para asegurar que su adherencia sea correcta en base al tamaño de la partícula estipulado. Para el anticuerpo monoclonal conjugado específico para la proteína Cry1Ac se realizan evaluaciones para descartar que su reactividad y funcionalidad hayan sido afectadas durante el proceso de conjugación.

Los productos desarrollados por EnviroLogix Inc. que requieran producir múltiples lotes, como es el caso del kit de CIMT para detección de la Cry1Ac en granos de soja, se fabrican en general durante varios días de producción. Todos los productos son tratados bajo requerimientos rigurosos y estrictos donde para cada producto y para cada día de producción, previo al desarrollo completo del producto, una serie de diez (10) tests se ensamblan a mano para corroborar que todos los componentes del mismo funcionan correctamente. Esto se realiza mediante la evaluación de dichas tiras siguiendo el protocolo del kit con una muestra de granos positiva para la tecnología INTACTA RR2 PRO® y con una muestra negativa. Todas las tiras deben cumplir las especificaciones del kit como se indica en la COP. Al final de cada etapa de producción de las tiras, los componentes se ensamblan para generar las mismas para ser utilizadas de acuerdo a las instrucciones del kit. Los componentes críticos de las tiras (membrana de nitrocelulosa, *pads* de muestra y de conjugado), se someten a los procesos de control de calidad (QC) al final de cada etapa de la producción previos a ser incorporados a las tiras, de tal manera de asegurar la calidad del producto final. Esto permite que cada subetapa se desarrolle con componentes que son funcionales y que tienen una actividad esperada de acuerdo a las especificaciones del producto. Una vez que las tiras son ensambladas, cortadas y empaquetadas, el producto final es también auditado para que se establezca la conformidad del mismo de acuerdo a las especificaciones establecidas por en la COP. Esto se realiza al final de cada etapa de producción mediante el testeado al azar de tiras que participaron desde el comienzo hasta el final del proceso de empaquetamiento. Las tiras terminadas y empaquetadas son almacenadas en refrigeración ya que es la condición óptima hasta que el usuario las utilice. La fecha de vencimiento se asigna en función del período de tiempo de fabricación. Para cada lote se guardan un número determinado de tiras como parte de los sistemas de calidad para facilitar las respuestas de posibles preguntas de futuros clientes.

Cada lote de fabricación tiene los documentos que se van generando durante el proceso de desarrollo del mismo ya que son necesarios para el registro de datos e información durante la fase de producción. Todos los controles de calidad para la evaluación del funcionamiento del kit donde se utilizan las tiras deben seguir el protocolo indicado en el kit mediante el uso de equipamiento aprobado para la molienda de granos. La documentación es revisada y cada lote es certificado por el auditor de control de calidad validando el COP a su comercialización.

Los datos de las mediciones realizadas sobre los kits que sustentan lo afirmado se presentan en el Certificado de Performance realizado para cada uno de los lotes que se producen, en el que se asegura que cada lote del kit cumple con las especificaciones requeridas (COP, Anexo 2).

1.3 Descripción detallada del Fundamento científico de la técnica

Provea información técnica detallada sobre los anticuerpos utilizados (p.ej. mono/policlonal, animal de origen, etc.)

Los anticuerpos utilizados son monoclonales, reconocen a la proteína Cry1Ac, y fueron generados en ratón. Para la elaboración de la línea de ensayo de la tira reactiva se utilizó el par M6 y M7 (Anexo 6, Tabla 1).

Referirse a la figura 1 de la presentación original:

- M7 - 1er anticuerpo (marcado con oro coloidal): clon M19N4A6, pI=5.4, Isotipo IgG1
- M6 - 2do anticuerpo (de captura): clon 2-22.4.1: pI=7.3, Isotipo IgG1

1.4 Modelo Matemático

a) En relación al ítem 2.3 *materiales de referencia*, provea un modelo matemático que permita interconvertir datos referidos a materiales de referencia fabricados con proteína purificada en valores de grano o semilla que haya expresado en forma nativa la proteína Cry1Ac sobre granos totales (asumiendo que esa sea la unidad de medida para el límite de detección del método).

El nivel de expresión que alcanza la proteína nativa Cry1Ac no es uniforme a lo largo de las diferentes variedades de soja cosechadas en distintas geografías y temporadas. Como ocurre naturalmente con las proteínas, su nivel de expresión se verá afectado por las condiciones ambientales (tipo de suelos, precipitaciones, temperaturas) que varían a lo largo de las diferentes campañas*. Estos factores afectan a su vez el tamaño del grano/semilla, y de esta forma, la concentración de la proteína. Por lo tanto, no es posible indicar un nivel de expresión determinado que aplique a todas las variedades de INTACTA RR2 PRO®. En cambio, es posible indicar un rango de niveles de expresión.

La proteína recombinante Cry1Ac fue utilizada únicamente como control positivo durante el desarrollo y validación de la tira reactiva, conforme se desprende de la información acompañada de Envirologix. También se utilizó como prueba adicional para corroborar la ausencia del efecto gancho. Es importante remarcar que no se utilizó la proteína recombinante Cry1Ac para establecer la sensibilidad de la tira reactiva. La sensibilidad de la tira fue ajustada utilizando diversas variedades de INTACTA RR2 PRO® provenientes de distintas geografías y campañas, con el objetivo de contemplar las posibles variaciones en la expresión de proteína que ocurren en la naturaleza, y asegurar que una mezcla conteniendo menos de 5% de INTACTA RR2 PRO® (5 granos/semilla de INTACTA RR2 PRO® en 100 granos/semillas totales) arroje un resultado negativo.

Por lo explicado arriba, se desprende que no es posible generar un modelo matemático que permita interconvertir datos referidos a proteína purificada, en valores de grano o semilla que haya expresado en forma nativa la proteína Cry1Ac sobre granos totales, que sea universalmente válido.

* Immunoassays in Agricultural Biotechnology. Shan, Guomin (Editor). 2011. John Wiley & Sons (ISBN: 978-0-470-28952-5) y <http://www.nature.com/nature/journal/v191/n4796/abs/1911395a0.html>

b) Provea un modelo matemático que vincule los rangos de variabilidad de concentración en semilla comercial de variedad única y único origen (como la utilizada para los materiales de referencia o los ensayos IRAM) y la variabilidad de muestras reales de grano proveniente de múltiples orígenes (diferentes variedades, regiones, campañas, generaciones a partir de semilla comercial, etc).

Como se mencionó en 1.4 a) el nivel de expresión que alcanza la proteína nativa Cry1Ac en las diferentes variedades de soja cosechadas en distintas geografías y temporadas es variable dentro de cierto rango, como ocurre naturalmente con la expresión de proteínas, dependiendo de diversos factores ambientales (tipo de suelos, precipitaciones, temperaturas) que varían a lo largo de las diferentes campañas. Los niveles de expresión de la proteína Cry1Ac se verán afectados por dichos factores ambientales de similar manera tanto en semilla como en grano de soja, y no serán uniformes ni previsibles a lo largo de geografías y campañas.

Por todo esto se desprende que no es posible generar un modelo matemático que vincule los rangos de variabilidad de concentración en semilla comercial y en grano proveniente de múltiples orígenes que resulte universalmente válido.

c) En relación a la metodología de muestreo del ítem 7, proporcionar un modelo matemático que permita vincular resultados obtenidos modularmente sobre paquetes de 100 granos armados *ad hoc* con conclusiones sobre cargamentos completos de los cuales se tomen muestras para su ensayo con este método.

La metodología de muestreo de las diferentes cargas (camiones, vagones, otros) se realizan en destino, siguiendo los lineamientos que rigen el Comercio de Granos para análisis comerciales, explicados en la respuesta al punto 7, y las muestras para los análisis a realizar con el Kit C1MT son sub muestras obtenidas a partir de estas muestras.

El procedimiento a realizar con el Kit C1MT está validado para 100 semillas/granos tomados a partir de una muestra representativa, como sería este caso. Si bien el análisis de 100 granos podría resultar insuficiente para detectar la presencia adventicia (por ejemplo 1%) de la tecnología INTACTA RR2 PRO en una carga, resulta suficiente para detectar la presencia de la tecnología INTACTA RR2 PRO si se encuentra en cantidades superiores al 5%. De esta manera, se cumple el objetivo del método de evitar la detección de contaminaciones accidentales o presencia adventicia de INTACTA RR2 PRO, y no perjudicar al productor.

Como se mencionó, el procedimiento a realizar con el Kit C1MT ha sido desarrollado y validado utilizando 100 semillas/granos. Los 360 resultados obtenidos durante la validación al analizar muestras conteniendo 5% de INTACTA RR2 PRO (Anexo 5, Tabla 5) muestran que las tiras no detectan, en ninguno de los casos, la proteína Cry1Ac. Esto indica que el rango de falsos positivos del método es efectivamente menor a 1%, con un IC del 95%, lo que cumple con la especificación requerida para esta metodología con el fin de no detectar contaminaciones accidentales o presencia adventicia.

d) Explique la variación en la cantidad de repeticiones según cada proporción de semillas ensayada (3ra columna, tabla cinco, anexo confidencial). Proporcione un modelo estadístico para inferir si se trata de un número suficiente de repeticiones.

La variación en la cantidad de repeticiones según la proporción de semillas/granos ensayados varía según el objetivo del ensayo. Para las proporciones a las cuales se necesita corroborar las especificaciones del método* (5% y 45%) se analizó un mayor número de muestras, con el objetivo de obtener un mayor número de resultados, para poder inferir así conclusiones significativas, de acuerdo a la herramienta estadística seedcalc (<http://www.seedtest.org/en/statistical-tools-for-seed-testing-content---1--1143--279.html>).

El resto de las proporciones, cuyos resultados no se utilizarían para obtener conclusiones estadísticas, fueron ensayadas únicamente para obtener mayor información acerca del comportamiento de la tira, y por lo tanto se realizaron en menor cantidad.

Especificaciones del método*:

La sensibilidad de la tira se diseñó para poseer un **Límite Inferior de Detección** del 5%, con el objetivo de no detectar la proteína Cry1Ac en aquellas muestras de 100 granos/semillas de soja que contengan menos de 5 granos/semillas de soja expresando la proteína Cry1Ac. Para este Límite Inferior de Detección se estableció, a efectivizar durante los ensayos de desarrollo y validación (Anexo 5 y Anexo 6), un **rango permitido de falsos positivos** del 1% con un intervalo de confianza (IC) del 95%.

Para poder diseñar la sensibilidad de la tira según estos parámetros, se analizaron los datos de expresión de Cry1Ac de diversas variedades INTACTA RR2 PRO® cosechadas en distintas geografías y temporadas. Se seleccionó la variedad que mostró mayor expresión, se realizaron mezclas con variedades de soja convencional, y se ajustó la sensibilidad de la tira para que todas las muestras poseyendo menos de 5% de esta variedad arrojen un resultado de tira negativo.

Al quedar establecido el Límite Inferior de Detección, se procedió a analizar el resto de las variedades utilizadas durante el desarrollo, para verificar en qué porcentaje, en mezclas realizadas con soja convencional, todas ellas arrojaron un resultado positivo. De acuerdo a estos datos generados, quedó establecido el umbral superior del 45%: esto significa que todas las muestras que contengan más de 45% de soja INTACTA RR2 PRO® darán un resultado positivo con un rango permitido de falsos negativos del 5% con un IC del 95%.

Es importante aclarar que no es posible anticipar el resultado de la tira para mezclas que contengan entre 5 a 45% de INTACTA RR2 PRO, podrán ser tanto negativos como positivos, dependiendo de los niveles de expresión de las semillas/granos de esa variedad en esa geografía y esa campaña.

Por todo esto, y reafirmando lo dicho al principio de la respuesta, la cantidad de repeticiones de los análisis mostrados en la tabla 5 varía según la proporción de semillas ensayada. Para las proporciones a las cuales se necesitó verificar las especificaciones del método (5% y 45%) se obtuvo un mayor número de resultados, con el objetivo de corroborar estadísticamente que la metodología cumple con los rangos de falsos positivos y falsos negativos establecidos, de la siguiente manera:

- Límite Inferior de Detección (5%): se obtuvieron 360 resultados a partir de muestras conteniendo 5% INTACTA RR2 PRO®. A partir de estos resultados, es posible concluir con un 95% de confianza que el rango de falsos positivos es menor que el 1% permitido.

- Umbral Superior (45%): se obtuvieron 360 resultados a partir de muestras conteniendo 45%. A partir de esto resultados, es posible concluir con un 95% de confianza que el rango de falsos negativos es menor que el 5% permitido.

1.5 Aplicabilidad del ensayo

4 Aplicación Práctica

a) En relación a aseveraciones tales como:

ítem 2.9 “...asegura que una carga que contenga alguna contaminación de hasta un 5% de INTACTA RR2 PRO® no sea detectada como positiva”.

Ítem 4.1 “...muestras que no tengan fehacientemente la tecnología...”

Se requiere una explicación completa, expresada en términos técnicamente sólidos, sobre la utilidad prevista para el método, con el objetivo de verificar la aplicabilidad del mismo a los fines que pretende dársele. Por ejemplo, no se explica por qué con un 5% de presencia real del analito no sería deseable obtener un resultado positivo, o por qué no se presta importancia a la tasa de falsos negativos.

En un ensayo cualitativo, se hace hincapié en distinguir de forma fiable una muestra positiva de una muestra que no contiene el analito en cuestión. La sensibilidad requerida del método y el potencial de reactividad cruzada con otros componentes de la matriz son consideraciones importantes en el proceso de desarrollo de estos métodos (Shan, 2011). Los experimentos realizados durante el desarrollo del método cualitativo también se llevan a cabo durante la validación y generalmente incluyen la determinación de la especificidad, la sensibilidad (verificación del nivel del límite de detección), precisión (tasas de falsos negativos / falsos positivos), y la robustez. La sensibilidad del método se define por el nivel umbral o límite de detección, que es el valor por encima del cual las muestras se consideran como positiva y por debajo del cual las muestras se consideran negativas, o más correctamente, no detectable por el método. Para un dispositivo de flujo lateral, el límite de detección es el valor o concentración a la que se observa de forma fiable la línea de prueba.

Las consecuencias de la determinación de un resultado falso (falso positivo o falso negativo) dependen de las características del analito de interés testeado y las derivaciones que tiene su presencia en la muestra; del objetivo que tiene la realización del ensayo, de las características del método, la disponibilidad de métodos confirmatorios y la posibilidad de llevarlos a cabo, etc.

Un resultado falso negativo en una muestra en la que la presencia del analito en cuestión implique un riesgo o tenga una consecuencia negativa (la no pesquisa de un paciente infectado, por citar un ejemplo clínico, o la inhabilidad de detectar un contaminante en una muestra) tiene una determinada implicancia. En estos casos se prefiere la detección de un falso positivo y la posterior comprobación o no por un método confirmatorio, que la imposibilidad de detectarlo en un primer cribado.

Distinto es el caso para tiras reactivas Kit C1MT dado que,

- i) la no detección de la presencia de la proteína Cry1Ac en muestras de granos de soja INTACTA RR2 PRO® no tiene impacto negativo alguno ya que cuenta con aprobación para su producción y comercialización según Res. SAGPyA n°446 del 10/08/2012,

- ii) que el objetivo del kit, es la identificación la tecnología INTACTA RR2 PRO® para la recolección de regalías solamente cuando ésta se encuentra presente en proporciones considerables que descarten la posibilidad de presencia adventicia; o algún tipo de contaminación involuntaria de la carga,
- iii) y que se utiliza un método inmunocromatográfico de lectura visual con las limitaciones propias de este tipo de pruebas, o sea que a niveles cercanos y por arriba del Límite de Detección la visualización de la línea de prueba puede depender en ciertos casos de la subjetividad del operario.

En este caso el único riesgo de un falso negativo es el no cobro de la tecnología INTACTA RR2 PRO® y en tal caso, el perjuicio es para la empresa obtentora de la tecnología.

Estas son las causas por las que se definió para el desarrollo de esta prueba un límite de detección por encima del 5% con el énfasis puesto en la ausencia de falsos positivos por debajo de este umbral. Es así que los resultados de los ensayos de validación muestran que no hubo falsos positivos en ninguna de las muestras conteniendo 0% o 5% 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 carga.

Se intenta de este modo proteger al agricultor del pago improcedente debido a un falso positivo que pudiera darse si el umbral de detección fuera más bajo. La consecuencia natural de establecer un umbral inferior alto es la existencia de una proporción relativamente alta de falsos negativos, sobre todo en porcentajes de entre 10% y 20% de INTACTA RR2 PRO® y es por esto que se presta menor importancia a la tasa de falsos negativos en los niveles medios cercanos umbral de detección definido.

b) Reformular respuestas transcritas de instrucciones vagas informando rangos y parámetros definidos.

Por ejemplo “Almacenaje: Temperatura ambiente o refrigerado para aumentar su vida útil- no exponer el kit a temperaturas extremas (especificar intervalo)... condiciones de alta humedad (especificar rango)... limpiar a fondo el vaso (especificar condiciones mínimas de lavado, uso de detergentes, jabones apropiados para la remoción de proteínas).

• **Almacenaje:**

- **Temperatura:** El kit QuickStix debe ser almacenado a temperatura ambiente (> 8 a 37°C) o en la heladera a 4-8°C. Si se guarda en tales condiciones su vida útil será de un año, siendo su fecha de vencimiento la indicada en la etiqueta de la caja que contiene al kit. No se debe dejar el kit expuesto al sol. No se debe dejar el kit dentro de un vehículo donde las condiciones de temperatura pueden fluctuar abruptamente. No se debe guardar el kit en congelador (temperaturas menores a 0°C).
- **Humedad:** El QuickStix kit debe ser almacenado en un lugar con humedad menor al 60%. El envase donde se almacenan las tiras debe mantenerse siempre tapado, para minimizar la exposición de las tiras a la humedad del ambiente. Debe abrirse únicamente al momento de utilizar la tira, y debe cerrarse inmediatamente luego de retirar la tira.
- **Limpieza** de los elementos reutilizables de la licuadora: vaso, tapa blanca, cuchilla, arandelas: deben lavarse con abundante agua y detergente común de uso doméstico. Se recomienda el uso de un cepillo para

retirar cualquier material particulado que pudiese quedar adherido a los elementos. Se debe realizar un enjuague final con abundante agua para retirar cualquier resto de detergente.

c) Detalle en forma exhaustiva en qué entorno(s) sería admisible que el ensayo sea llevado a cabo (p.ej. a campo, en planta de procesamiento de granos, en laboratorio especializado, etc.). Salvo para el caso de laboratorios especializados, detalle las condiciones mínimas de dicho entorno (p.ej. control de temperatura ambiente, disponibilidad de agua corriente, material de lavado, termómetros, y todo insumo no provisto en el kit).

El ensayo ha sido diseñado para que pueda llevarse a cabo en diversos entornos (recibidores de granos, acopios, plantas de procesamiento, laboratorios, otros) sin la necesidad de instalaciones sofisticadas. Sin embargo es necesario que el entorno cuente con:

- Instalaciones mínimas (paredes y techo) que eviten que el kit se vea en exposición directa a las variaciones de temperatura y humedad del ambiente, y se pueda cumplir con las necesidades de almacenaje enumeradas en el punto anterior.
- Corriente eléctrica que permita el uso de la licuadora
- Adecuada iluminación natural o artificial que permita la lectura del resultado al ojo desnudo del operador.
- Suministro de agua: el agua a utilizar durante el ensayo, y para lavar los materiales reusables, podrá ser agua cristalina de la canilla, de pozo, o agua comercial (de provisión) en botellones o bidones.

d) Informe sobre la disponibilidad del Kit mencionado en el mercado para cualquier interesado en adquirirlo y utilizarlo (nótese que el mismo no pudo ser encontrado en la web del fabricante). Ídem respecto de la herramienta para triturar/moler.

El kit QuickStix C1MT no se encuentra disponible para cualquier interesado en adquirirlo y utilizarlo. Este kit fue desarrollado por Enviroligix a pedido de Monsanto, para ser utilizado específicamente sobre muestras de soja a granel obtenidas a partir de cargas que arriban a los puntos de entrega de grano (acopios, puertos) con el objetivo de identificar la presencia de la proteína Cry1Ac en soja, lo que indica la presencia de la tecnología INTACTA RR2 PRO® .

Como se menciona anteriormente, la sensibilidad de la tira reactiva presente en el kit QuickStix C1MT ha sido diseñada de manera tal de evitar la detección de contaminación accidental o presencia adventicia en la carga analizada, y la misma no detectará la proteína Cry1Ac en muestras que contengan menos del 5% de soja INTACTA RR2 PRO® .

Enviroligix ofrece los siguientes kits al público en general, para cubrir los diferentes usos que los interesados pudiesen tener:

- Los interesados en identificar la presencia de la proteína Cry1Ac en soja a granel, para evaluar presencia adventicia por ejemplo, pueden adquirir el kit con tiras de alta sensibilidad:

QuickStix™ Kit for Cry1Ac Soy Bulk Soybeans (AQ 433 BGBR)

- Los interesados en identificar la presencia de la proteína Cry1Ac en semillas/granos individuales de soja, o en tejido verde, podrían adquirir el siguiente kit:

QuickStix™ Kit for Cry1Ac Soy Leaf & Seed (AS 433 LS)

El kit QuickStix CIMT puede obtenerse a través de solicitud a Monsanto

Con respecto a la herramienta para triturar/moler, esta se suministra al operador que realizará el análisis junto al kit de testeo. Esta herramienta la importa y comercializa OSTER DE ARGENTINA S.A., a pedido de cualquier interesado.

Ya que el procedimiento fue diseñado y puesto a punto utilizando la herramienta para triturar/moler indicada en el inserto del kit, es indispensable utilizar la misma u otra con idénticas características (potencia del motor, cuchillas, materiales plásticos), previa validación del fabricante del kit, para que la muestra sea procesada bajo las condiciones especificadas en el inserto.

2.2 Ensayo en Colaboración

El comité considera que el estudio encomendado al IRAM que se acompaña no califica como un ensayo en colaboración por tratarse de 1 (un) solo laboratorio adicional, por no ser un ensayo a ciegas, etc. Asimismo, más allá de la aseveración que el objetivo del dicho ensayo habría sido verificar la reactividad y reproducibilidad, estima que los resultados son muy acotados para afirmar que tales criterios se ha verificado. Por ejemplo, son muy limitadas las proporciones de mezcla ensayadas (solo 2), se ha usado semilla comercial y no grano, el ensayo fue realizado con solo un lote de fabricación del kit, no se ha realizado ensayos en el LOD, etc. Por favor proveer una fundamentación más elaborada sobre este punto atendiendo a lo anterior.

Estamos de acuerdo con la consideración del Comité, y siguiendo el criterio expuesto entendemos que no se han realizado ensayos en colaboración.

Por otro lado, aclaramos que tenemos conocimiento que se ha intentado realizar ensayos adicionales a los realizados por IRAM, habiéndose contactado con diversos laboratorios dependientes de organismos públicos. Desafortunadamente surgieron inconvenientes administrativos, independientes de los aspectos técnicos, que dificultaron el avance de estos proyectos, ya que en la actualidad no se cuenta en el país de una red de laboratorios para estos propósitos, como existen desde 2007 en Brasil (Castanheira Guimaraes, 2010; Anexo 9). Ante sugerencias del comité, se pone a disposición el material necesario para hacer la validación que se considere necesaria.

En la actualidad, IRAM se encuentra realizando estudios adicionales con el Kit CIMT, para correlacionar sus resultados con los de ensayos ciegos de PCR evento específico MON87701. Para esto se están analizando muestras preparadas a partir de 10 variedades de soja INTACTA RR2 PRO® y 7 variedades de soja RR1.

2.3 Materiales de referencia

Informe sobre la procedencia y estándares de calidad de los materiales de referencia utilizados. En particular si se trata de Material de Referencia Certificado (por algún instituto de metrología)–CRM o SRM–, o un estándar de trabajo –WS–.

La proteína Cry1Ac recombinante utilizada como estándar de trabajo (WS), fue producida y caracterizada por Monsanto.

La caracterización incluyó las técnicas analíticas descritas en la tabla arrojando los siguientes resultados:

CARACTERÍSTICA	METODO	RESULTADO
Concentración	Composición aminoacídica	1.4mg/ml
Pureza	SDS-PAGE/Densitometría	91%
Peso molecular	SDS-PAGE/Densitometría	131.7 KDa
Identidad	Inmunoblot	Banda inmuno-reactiva confirmada
Identidad	Secuenciación N-terminal	Confirmada
Identidad	MALDI-TOF MS (tripsinizada)	Secuencia confirmada
Actividad	Bioensayo con insectos	EC50 = 2.1 ng de Cry1Ac /ml dieta

2.4 Método de confirmación

a) Se debe proveer información técnica detallada sobre los métodos mencionados (en versión papel, acompañada de la traducción correspondiente).

Se adjunta el método de ELISA cualitativo *QualiPlate Cry1Ab/Cry1Ac* (Cat# AP 003 CRBS, EnviroLogix™, USA), traducido al español (Anexo 8).

b) En este punto corresponde informar si alguno de dichos métodos ha sido efectivamente usado para demostrar la selectividad del ensayo objeto de la presente solicitud. Responder específicamente a lo anterior, y en caso positivo agregar información detallada sobre el laboratorio que realizó los estudios, procedimiento y resultados.

Los métodos de confirmación no han sido utilizados para demostrar la selectividad del ensayo.

La selectividad del ensayo ha sido evaluada mediante los estudios de especificidad mostrados en los Anexo 5 (sección 5) y Anexo 6 (sección 6). En los mismos se demuestra la ausencia de reactividad cruzada, confirmando la selectividad del Kit C1MT por la proteína Cry1Ac expresada por MON87701.

Por otro lado, la selectividad del ensayo esta fundamentalmente basada en el la utilización de dos anticuerpos monoclonales, como se mencionó en el punto 1.3, que reconocen de manera específica a la proteína Cry1Ac.

2.5 Determinación del límite de detección

2.9 Tasas de Resultados Falso positivos y falso negativos

a) Provea una explicación técnica de su aseveración respecto de que el método ha sido “diseñado” para dar resultados negativos por debajo del 5%. Detalle dicho diseño o estrategia de construcción del kit.

La sensibilidad de la tira reactiva presente en el kit QuickStix C1MT ha sido diseñada de manera tal de evitar la detección de contaminaciones o presencia adventicia en la carga analizada, y por lo tanto la misma no

detectará la proteína Cry1Ac en muestras que contengan menos del 5% de granos/semillas expresando la proteína Cry1Ac.

Además de lo detallado en punto 1.4d, es necesario aclarar que el diseño y fabricación de un test inmunocromatográfico de flujo lateral implica procesos que emplean principios de la biología, la química, la física y la ingeniería. Las características de desempeño de este tipo de pruebas dependen de los componentes (materiales y reactivos) seleccionados, así como el diseño utilizado, que incluye las dimensiones de la tira, la superposición de los *pads*, la utilización o no de dispositivos plásticos para portar la tira (*cassettes*), etc.

Entre los principales componentes químicos se pueden mencionar los anticuerpos, tanto de membrana (presentes en las líneas de prueba y control) como los conjugados a las partículas coloreadas; las partículas coloreadas a utilizar en el conjugado; así como otros componentes químicos como surfactantes, proteínas o buffers utilizados para el tratamiento de los *pads* que contribuyen, como se explica más adelante, a modelar la intensidad de color de la línea de color y en consecuencia definen la sensibilidad y especificidad de la prueba.

Los anticuerpos utilizados en las pruebas de inmunocromatografía deben tener la suficiente sensibilidad, especificidad, pureza y estabilidad para cumplir con los requisitos de desempeño definidos para el producto terminado. Dependiendo del diseño del ensayo, los anticuerpos se puede utilizar como reactivo de captura en la línea de prueba, como conjugado a la partícula de detección, o ambos. También debe considerarse la utilización de anticuerpos policlonales o monoclonales, teniendo en cuenta las características de la muestra y la posibilidad de reactividad cruzada con interferentes presentes en la misma. Una consideración clave en la selección de los anticuerpos es el comportamiento de los mismos ante los factores a los que serán sometidos durante la fabricación y almacenamiento de las tiras reactivas. Como mínimo, el anticuerpo debe permanecer reactivo después de haber sido adsorbido a una superficie sólida, retener su integridad estructural cuando esté completamente seco y ser capaz de recuperar instantáneamente su reactividad luego ser rehidratado y solubilizado por la muestra.

Varios tipos de reactivos detectores se pueden utilizar para la visualización de la señal (línea de color). Los materiales más utilizados en las pruebas comercialmente disponibles son las partículas de látex y las partículas de oro coloidal. Independientemente del reactivo detector seleccionado, es importante que las partículas sean homogéneas en cuanto a forma, tamaño, y en términos de sus características físicas y electroquímicas. El reactivo detector debe ser capaz de fluir de manera uniforme a través de la membrana porosa. Las partículas de diferente tamaño, forma y polaridad avanzan a diferentes velocidades a través de la membrana afectando de esta manera la sensibilidad aparente y la especificidad de la prueba.

La membrana es probablemente el material más importante utilizado en este tipo de pruebas. Los atributos físicos y químicos de la membrana (material (polímero), tamaño y forma del poro, dimensiones, tratamientos adicionales como bloqueo, etc.) afectan las propiedades del flujo capilar, especialmente la velocidad. Las propiedades del flujo capilar afectan directamente la migración del analito y el anticuerpo conjugado al reactivo detector a través de la membrana, la interacción de estos con los anticuerpos inmovilizados en la línea de prueba y por lo tanto, la sensibilidad y la especificidad del ensayo.

La elección del *pad* de muestra y su tratamiento son aspectos críticos en el desarrollo de una prueba de flujo lateral. Para pruebas de uso agrícola, la fibra de vidrio tejida es generalmente el material elegido. A menudo es necesario tratar el material del *pad* de muestra con una solución buffer conteniendo proteínas y tensoactivos para controlar varias funciones que mejoren el flujo capilar y/o eliminen interacciones

inespecíficas y por lo tanto contribuyan al desarrollo de la señal en la línea de prueba, y por ende la sensibilidad y especificidad de la prueba. Esto incluye la viscosidad de la muestra, la solubilización y liberación del reactivo detector, la reducción de uniones inespecíficas, u otras modificaciones de la naturaleza de la muestra como podría ser el pH.

El pad de conjugado cumple una función fundamental, ya que es el nexo entre el pad de muestra y la membrana, además de contener el reactivo detector. Es deseable que el reactivo detector sea solubilizado y liberado a la membrana de forma rápida, constante y homogénea. De esto depende en parte la formación de la señal en la línea de prueba y, por lo tanto, la sensibilidad de la prueba. El pad de conjugado puede estar constituido de materiales tales como fibras hiladas de vidrio, celulosa, poliéster y polipropileno. Estos materiales pueden ser pre-tratado con soluciones buffer, agentes tensoactivos y reactivos de bloqueo para reducir uniones inespecíficas y mejorar las características de liberación del conjugado que mejoren el flujo capilar.

Como se indicó arriba, la selección de los materiales, de los reactivos y el diseño de la tira determinan las características físicas y químicas que definen las características de desempeño de una prueba de flujo lateral, entre ellas la sensibilidad y especificidad. Esta selección de carácter multifactorial es en parte empírica y se realiza, con los ajustes correspondientes, durante las fases de desarrollo de la prueba de acuerdo a los parámetros de desempeño fijados según los objetivos de uso del kit.

En el caso de las tiras QuickStix™ CIMT, los materiales y reactivos, así como los demás parámetros y especificaciones de diseño de la tira, fueron definidos durante el desarrollo de modo tal de cumplimentar las características de desempeño deseadas para la prueba de acuerdo a los objetivos de uso de la misma; esto es la detección de muestras conteniendo la proteína Cry1Ac en muestras de granos de soja con la tecnología INTACTA RR2 PRO® en proporciones mayores del 5%.

Para los ensayos de validación se usaron tres lotes de tiras fabricados y constituidos de distintos lotes de materiales y reactivos. Los resultados de los ensayos de validación permitieron corroborar la elección de los materiales y reactivos para el diseño de la tira para los fines propuestos.

Las especificaciones técnicas de los materiales y los reactivos que componen tiras reactivas QuickStix™ CIMT, así como las concentraciones y formulaciones de estos últimos, son propiedad de Envirologix y se encuentran consecuentemente protegidas.

b) En esta y demás secciones del documento que corresponda debe especificar las unidades de medida. Por ejemplo “...contenga menos de 5% de la tecnología INTACTA RR2 PRO® ...” no hace referencia a una medida con sentido técnico. Por ejemplo, aclare si se refiere a 5% de granos de soja conteniendo proteína Cry1AC en granos totales, alguna forma de medida masa/masa u otra unidad. Proveer una lista detallada de referencias a unidades de concentración ambiguas en la solicitud, aclarando la unidad en cada caso.

La unidad de medida, indicada con el símbolo de porcentaje ‘%’, se refiere al número de granos/semillas conteniendo la proteína Cry1Ac cada 100 granos/semillas totales. Por ejemplo: 5% = 5 granos/semillas expresando la proteína Cry1Ac en 100 granos/semillas totales.

c) El comité considera que aún no ha respondido claramente cuál es el límite de detección del método. Para este tipo de métodos dicho límite puede definirse como la concentración en la que una muestra positiva arroja resultados positivos en al menos el 95% de las ocasiones. Sírvase responder cual es el

límite de detección del método y señalar los datos presentados que lo sustenten, o adicionar los datos de base necesarios.

En el caso del kit C1MT, dado que se desea evitar la detección de contaminaciones accidentales o presencia adventicia, el límite de detección esta definido en base al número de granos/semillas expresando la proteína Cry1Ac en 100 granos/semillas totales, para el cual no se detecta la proteína. Por esta razón el límite de detección para este kit se puede enunciar como: el kit C1MT no detectará la proteína Cry1Ac en muestras que contengan menos de 5 granos/semillas expresando la proteína Cry1Ac, sobre una base de 100 granos/semillas totales.

Como se explicó en la respuesta al punto 1.4d, el umbral superior quedará sujeto a este límite inferior, y al rango de variabilidad de la proteína Cry1Ac dependiendo de las condiciones ambientales.

d) En virtud del modelo matemático requerido bajo el punto 1.4, informar cómo el límite de detección determinado sobre la alícuota incubada con la tira reactiva se extiende a conclusiones sobre el contenido mínimo del cargamento del que provino la muestra.

Como se explicó en la respuesta al punto 1.4c, la metodología de muestreo de las diferentes cargas (camiones, vagones, otros) se realizan en destino, siguiendo los lineamientos que rigen el Comercio de Granos para análisis comerciales, explicados en la respuesta al punto 7, y las muestras para los análisis a realizar con el Kit C1MT son sub muestras obtenidas a partir de estas muestras.

El procedimiento a realizar con el Kit C1MT está validado para 100 semillas/granos tomados a partir de una muestra representativa, como sería este caso. Si bien el análisis de 100 granos podría resultar insuficiente para detectar la presencia adventicia (por ejemplo 1%) de la tecnología INTACTA RR2 PRO® en una carga, resulta suficiente para detectar la presencia de la tecnología INTACTA RR2 PRO® si se encuentra en cantidades superiores al 5%. De esta manera, se cumple el objetivo del método de evitar la detección de contaminaciones accidentales o presencia adventicia de INTACTA RR2 PRO®, y no perjudicar al productor.

Como se mencionó, el procedimiento a realizar con el Kit C1MT ha sido desarrollado y validado utilizando 100 semillas/granos. Los 360 resultados obtenidos durante la validación al analizar muestras conteniendo 5% de INTACTA RR2 PRO® (Anexo 5, Tabla 5) muestran que las tiras no detectan, en ninguno de los casos, la proteína Cry1Ac. Esto indica que el rango de falsos positivos del método es efectivamente menor a 1%, con un IC del 95%, lo que cumple con la especificación requerida para esta metodología con el fin de no detectar contaminaciones accidentales o presencia adventicia.

2.6 Efecto gancho.

Utilizando el modelo matemático requerido anteriormente, convierta los resultados establecidos a partir de muestras fabricadas con proteína purificada, en términos de granos de soja, considerando rango de mezcla de diferentes semillas de soja, posibles niveles de expresión de la proteína, errores en los pasos de dilución y toma de alícuotas mencionados en el protocolo y otros factores que resulten relevantes.

Como se explicó en la respuesta al punto 1.4, la proteína recombinante Cry1Ac fue utilizada únicamente como control positivo durante el desarrollo y validación de la tira reactiva y como prueba confirmatoria para corroborar la ausencia del efecto gancho observada en pruebas con granos/semilla de INTACTA RR2 PRO®. Para esto último, se agregó una pequeña dosis de Cry1Ac recombinante a una preparación de semilla convencional, procesada según el procedimiento indicado en el kit C1MT, y se fue aumentando la dosis en pequeños incrementos hasta que se visualizó un resultado positivo consistente en la línea de ensayo, lo cual se logró a una concentración de 50ng/ml. La concentración siguió aumentándose en incrementos de 50ng/ml (100, 150, 200...400ng/ml) hasta llegar a máximo de 400ng/ml. Como se indica en la Sección 8 del Anexo 5, todas las tiras fueron positivas y no se observó disminución en la intensidad de la señal positiva de la línea de ensayo, lo que corrobora la ausencia del efecto gancho.

Sin embargo, por ser esta prueba con proteína recombinante Cry1Ac únicamente una prueba confirmatoria, no se han convertido los resultados establecidos a partir de muestras fabricadas con proteína purificada en términos de granos de soja.

3.4 Comprobación de la robustez

a) Informe si los estudios de robustez fueron ciegos (realizados por operadores que no conocían la composición de las muestras al momento de establecer el resultado)

Afirmativo, conforme surge de los documentos acompañados, los estudios de robustez fueron ciegos. Las muestras fueron preparadas por ciertos operadores y procesadas por otros. Las muestras conteniendo distintos porcentajes INTACTA RR2 PRO® fueron intercaladas durante el procesamiento, para evitar que el resultado pudiera predecirse.

b) Informe si los estudios de robustez han tenido en cuenta el factor “operador” (o analista). La evaluación del resultado es en forma visual y el analista es un factor muy importante a la hora de decidir si un resultado es “positivo” o “negativo” especialmente en el entorno del LOD.

Afirmativo, conforme surge de los documentos acompañados, durante los estudios de robustez se ha tenido en cuenta el factor “operador”. Las muestras han sido analizadas por diferentes operadores a lo largo de diferentes días. Esto significa que los resultados de réplicas de un mismo tipo de muestra han sido leídos por distintos operadores en distintos días. En el caso de un resultado dudoso, el procedimiento fue analizado junto a otro operador, para concluir el resultado final.

3.5 Eficiencia de la extracción

La extracción debe resultar reproducible para que el LOD del método lo sea. Resulta llamativa la instrucción contenida en el protocolo para el operador de “...evite material particulado (use la parte más clara o traslúcida del extracto)”. La existencia de material particulado y la mayor o menor posibilidad de que sea arrastrado a la tira de ensayo puede afectar el LOD y por ende los resultados. Reformule sus respuestas atendiendo a lo anterior (p.ej. introduciendo un paso de filtrado, o bien introduciendo un paso de entrenamiento específico para garantizar que la porción de muestra que se toma es adecuada para el ensayo desde el punto de vista del tamaño de las partículas que la componen).

Durante la capacitación otorgada por Monsanto a los encargados y operadores de los sitios donde se realizaran los testeos, se pone especial énfasis en ciertos puntos, uno de los cuales es el cuidado de no tomar material particulado luego de la agitación.

Es importante remarcar que el material particulado tiene alta densidad, por lo que decanta rápidamente una vez terminada la molienda. Adicionalmente, luego de la agitación y previo al trasvase de muestra, hay un periodo de reposo de 15-20 segundos, lo que permite la eficaz decantación del material particulado al fondo del vaso y facilita de gran manera el evitar tomarlo al pipetear la muestra al vaso de reacción. El remanente que pudiera quedar en suspensión, no afecta la observación del resultado.

4.2 Características operacionales y practicabilidad

a) Informe sobre el rango de temperatura ambiente en el cual puede ejecutarse el método y la sensibilidad de los resultados a este parámetro.

El método puede realizarse a la temperatura a la que se encuentran habitualmente los recibidores de granos (10-37°C), sin que su resultado se vea afectado, conforme surge de la información suministrada por Envirologix.

b) Las imágenes de resultados reales en la solicitud no son claras. Acompañe con imágenes claras de resultados negativos y positivos a distintas cantidades de analito, e informe sobre la estabilidad de la señal en el tiempo cuando la tira reactiva se guarda para registro o revisión posterior.

Se adjuntan las imágenes solicitadas en el Anexo 10.

El resultado de la tira debe leerse a los 5 minutos de comenzada la reacción, anotando su resultado y en caso que se desee archivar, tomando una fotografía de la misma. En caso de necesitar conservar la tira con el resultado, Envirologix recomienda cortar con tijeras inmediatamente luego de los 5 minutos de reacción, por la línea de puntos (Figura 2 del formulario original), de manera de detener la reacción, descartando la parte inferior cubierta por la cinta con la flecha blanca. Si bien no se realizaron estudios acerca de la estabilidad de la señal en el tiempo en caso en que la tira reactiva se guarde, en los casos en que usuarios del Kit han guardado tiras utilizadas, se observó que el resultado original no se vio modificado aun luego de varios meses.

4.4 Habilidades que deben poseer los operadores

El comité considera que todo operario que no posea una formación técnica general de nivel terciario o superior que incluya la realización de métodos de análisis (p.ej. técnico laboratorista universitario, licenciado en química, bioquímica o biotecnología, etc.), debería recibir una capacitación *ad hoc* teórico-práctica de al menos 16 horas de duración con examen final para estar en condiciones de realizar el ensayo en forma fiable. Sírvase informar si existe un requerimiento o instancia de capacitación que acredite que el operario ha sido entrenado en la realización del método, en tal caso detallar sus contenidos o capacidades mínimas que debe tener el operador.

Como se mencionó en el formulario original, el método propuesto está planteado, como todo dispositivo de flujo lateral, para ser utilizado por personal sin una capacitación previa.

De todas formas, al inicio de cada temporada Monsanto otorga a los encargados y algunos operadores de los sitios donde se realizarán los análisis un entrenamiento teórico/práctico presencial donde se los instruye en como realizar el testeado de acuerdo al protocolo establecido por Envirologix, utilizando los kits C1MT.

El personal entrenado se ocupa luego de transmitir los conocimientos a los otros operadores mediante capacitaciones internas. Estas capacitaciones se registran en documentación específica, incluyendo fecha, lugar, temas, capacitador, evaluación, calificación del operador entrenado, entre otros, donde queda constancia del mismo. Se adjuntan ejemplos de estos registros en el Anexo 11.

Mensualmente, personal de la empresa Monsanto efectúa visitas a los sitios donde se realizan los testeos de modo de verificar que se estén realizando de la manera adecuada.

Anualmente se recibe la visita de un equipo de técnicos y equipo directivo de Envirologix, de modo de poder ayudar, en caso que sea necesario, con preguntas que surjan a partir de la realización de testeos.

6 Desempeño del método

a) En caso de existir, provea información sobre experiencias previas en el uso de este ensayo aplicado a los fines que se pretende darle al amparo de la solicitud, en la República Argentina u otros países.

Las tiras reactivas QuickStix™ C1MT son utilizadas actualmente en Brasil y en Paraguay para detectar la tecnología INTACTA RR2 PRO® en granos de soja.

En este sentido, el Ministerio de Agricultura de Brasil (MAPA) ha publicado un artículo denominado “Métodos para determinación de pureza genética de semillas: Inmunocromatografía para la validación de Presencia Adventicia de OGM en semillas” (Costa Do Valle, 2010 - copia adjunta, Anexo 12) donde hace referencia a otros formatos de test inmunocromatográficos diseñados para otros fines. Específicamente describe el testeado con un límite inferior de 5% con un 95% de confianza y utilizando 60 granos utilizado con el fin de verificar la necesidad del pago de regalías.

En Paraguay tiras reactivas ya han sido utilizadas hace más de 10 años para detectar la presencia de la tecnología RR1 en soja. En la campaña 2015/16 la misma tira objeto de esta presentación (Kit C1MT) está siendo utilizada para detectar INTACTA RR2 PRO® en los puntos de entrega. Se trata de 200 puntos de entrega con aproximadamente 500 silos y ya se han recibido y testado mas de 5.500.000 de tn de soja.

b) provea de toda información que disponga sobre pruebas al método realizadas con GRANO de soja proveniente del mercado granario contemplando los múltiples orígenes posibles (diferentes variedades, regiones, campañas, generaciones a partir de semilla comercial, etc).

Durante el año 2014 se encargó a un laboratorio externo de la ciudad de Pergamino la realización de un ensayo para evaluar el desempeño del kit de tiras QuickStix™ C1MT con muestras de granos comerciales y pre-comerciales de soja INTACTA RR2 PRO® cosechados en 2014 de distintas localidades del país. Se ensayaron un total de 86 muestras puras, 65 comerciales y 21 pre-comerciales, correspondientes a distintas variedades pertenecientes a diferentes empresas obtentoras y con diferentes grupos de madurez. En cada caso, se analizaron 100 granos provenientes de la muestra en evaluación. Las muestras se probaron en forma ciega, por duplicado y siguiendo las indicaciones incluidas en el inserto del kit. En todos los casos y para

cada una de las muestras ensayadas, los resultados de las tiras QuickStix™ CIMT fue el positivo esperado.

7 Muestreo Previo

- a) Informe si la metodología propuesta para camiones sigue la Resolución SAGyP N°1075/94 – Anexo XXII- Norma XXII y Anexo XXIIb – Anexo B, o si se aparta de la misma.**
- b) Informe sobre protocolo para otros sistemas de transporte y descarga (p.ej. para muestrear vagones graneleros con y sin compuerta superior, barcasas y grano en movimiento en cintas de embarque, descargas, etc). Asimismo para grano almacenado (silos, bolsas, muestreo de big-bags y de *containers*)**
- c) El grano recolectado debería pasar por un homogeneizador y divisor de muestras “tipo Boerner” para conformar las muestras finales. Por favor confirme.**

Se responde en conjunto para los puntos a, b y c:

La metodología de muestreo de las diferentes cargas se realizan en destino, siguiendo los lineamientos propuestos por la Resolución SAGyP N°1075/94 – Anexo XXII- Norma XXII y Anexo XXIIb – Anexo B, que rigen el Comercio de Granos para la obtención de los análisis comerciales correspondientes. En estos lineamientos se establecen las guías para toma de muestras en destino a partir de distintos sistemas de transporte, incluyendo el paso de homogeneización. Las muestras para los análisis a realizar con el Kit CIMT son sub muestras obtenidas a partir de estas muestras. En consecuencia el protocolo y la metodología para la toma de dichas muestras no es ni más ni menos que el utilizado para la toma de las muestras comerciales habituales para el comercio Granario, cumpliendo los terceros habilitados, con todas las reglamentaciones y prácticas usuales para esta operatoria.

- d) Describa la metodología para extraer los 100 granos (que requiere el método) de la muestra final lacrada de aprox. 400 gramos.**

Para extraer los granos a analizar con el kit CIMT, se abre el sobre lacrado, y se toman 100 granos al azar.

8.2 Interpretación Práctica de los posibles resultados en el comercio de granos

- a) En su respuesta no se determina qué hacer con la muestra en caso de tener un resultado positivo dudoso, ya que la intensidad de la banda y por lo tanto la determinación del resultado puede variar de analista en analista en el caso de muestras cercanas al LOD. Se debería establecer un criterio de repetición en estos casos.**

Es caso de un resultado positivo dudoso, se recomienda analizarlo junto a otro operador. En caso de persistir la duda, se recomienda descartar el resultado y repetir la determinación desde el comienzo, o sea a partir de una nueva toma de muestra de 100 granos/semilla, tomando por válido el nuevo resultado. En caso de persistir el resultado dudoso se recomienda considerarlo negativo a fin de no perjudicar al productor con el cobro del canon por el uso de la tecnología INTACTA RR2 PRO ®.

En el supuesto caso que resulte imprescindible la caracterización de la muestra existen, como se detalló en el formulario original, otros métodos confirmatorios como PCR.

b) Reformule la respuesta para un reporte de resultados completo, atendiendo a lo siguiente:

- El método es específico para la proteína Cry1Ac.
- Debe completarse la expresión de los resultados indicando (al menos) límite de detección y tasa de falso positivo y falso negativo.
- Expresar las inferencias que correspondan sobre el lote muestreado.

Como ejemplo ilustrativo de lo anterior:

“la proteína Cry1Ac está presente en la muestra en una cantidad igual o mayor al 6% de granos de soja conteniendo Cry1Ac sobre granos totales, lo cual corresponde a una presencia igual o mayor a x% en el lote con una confianza del y%, siendo la probabilidad de resultado falso positivo del z%”

“la proteína Cry1Ac está ausente en ...”

u otras fórmulas por el estilo.

Reformulando la respuesta según lo solicitado, los resultados deben ser interpretados de la siguiente manera:

RESULTADO POSITIVO: Las Tira QuickStix™ C1MT presenta en forma visible ambas líneas (Línea de Ensayo y Línea de Control) a los 5 minutos. Esto indica que la proteína Cry1Ac está presente en la muestra ensayada, lo que corresponde a una presencia mayor al 5% en el lote bajo ensayo, con una confianza del 95%, siendo la probabilidad de resultado falso positivo menor a 1%. A los fines prácticos de la prueba, esto significa que la tecnología INTACTA RR2 PRO® está presente en la muestra ensayada.

NEGATIVO: La Tira QuickStix™ C1MT presenta la Línea de Control en forma visible y no se observa la Línea de Ensayo a los 5 minutos. Esto indica que la proteína Cry1Ac está ausente en la muestra ensayada o está presente en proporciones menores al 5%. La tasa de falsos negativos aceptada es del 5%, con un intervalo de confianza del 95%, en muestras con una composición de entre el 45% y el 100% de granos conteniendo la proteína en cuestión. A los fines prácticos de la prueba, esto significa que la tecnología INTACTA RR2 PRO® está ausente en la muestra ensayada.

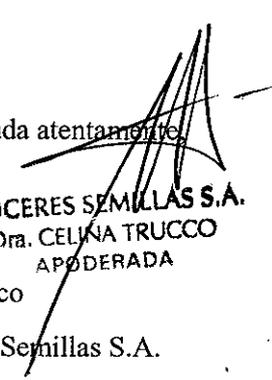
INVÁLIDO: A los 5 minutos no se observa línea de Control, lo que indica que la tira reactiva QuickStix™ C1MT se ha inactivado o el ensayo fue realizado de manera incorrecta, y por lo tanto el ensayo debe repetirse.

ANEXOS:

Se continúa con la numeración presentada en el formulario original.
Nuevos Anexos adjuntados:

6. Poder Notarial a favor de Patricia Vivian Miranda
7. Cartas, en idioma original y traducida al español, corroborando que Monsanto y Enviroligix están en conocimiento de la presentación de BioCeres relativa a este método
8. Traducciones de Informes técnicos de Enviroligix (VAL011-050R y VAL12-022R) y del método de ELISA cualitativo *QualiPlate Cry1Ab/Cry1Ac* (Cat# AP 003 CRBS, EnviroLogix™, USA)
9. Publicación del Ministerio de Agricultura de Brasil (MAPA) sobre detección, identificación y cuantificación de OGM. Castanheira Guimaraes, 2010.
10. Imágenes solicitadas en el punto 4.2 b.
11. Ejemplos de registros de capacitación para la realización del Kit C1MT
12. Publicación del Ministerio de Agricultura de Brasil (MAPA) sobre métodos para determinar pureza genética de semillas. Costa do Valle, 2010.

Sin otro particular, lo saluda atentamente,



BIOCERES SEMILLAS S.A.
Dra. CELINA TRUCCO
APODERADA

Celina Trucco

Apoderada de Bioceres Semillas S.A.

