



INFORME FINAL

Ensayo de aptitud para la detección de *Fusarium oxysporum* f.sp.
cubense Raza 4 Tropical a partir de ADN genómico

23-INM-EA-01

23-IF-01

Subdirección de Servicios Metrológicos y Relación con el Ciudadano
Subdirección de Metrología Química y Biología

Bogotá D.C.

2023-09-28



CONTENIDO

	Página.
1. INTRODUCCIÓN	3
2. OBJETIVO DEL ENSAYO DE APTITUD	3
3. ALCANCE DEL ENSAYO DE APTITUD	3
4. ORGANIZACIÓN DEL EA	3
5. CONFIDENCIALIDAD	4
6. ACTIVIDADES SUBCONTRATADAS	5
7. ÍTEM DE ENSAYO DE APTITUD.....	6
7.1. Descripción	6
7.2. Preparación	6
7.3. Caracterización y asignación de valor	6
7.4. Presentación final	7
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO.....	8
9. VALORES ASIGNADOS Y TRAZABILIDAD METROLÓGICA.....	9
10. ANÁLISIS DE RESULTADOS	10
10.1 Resultados	10
10.2 Análisis descriptivo información remitida por los participantes	12
11. RECOMENDACIONES O COMENTARIOS AL PROCESO DE MEDICIÓN DE LOS LABORATORIOS PARTICIPANTES	15
12. ASESORÍA	16
13. APELACIONES.....	16
14. REFERENCIAS	17

1. INTRODUCCIÓN

En el marco de la Decisión No. 832 de 2018, la Comunidad Andina – CAN, aprobó el proyecto “Estandarización regional del diagnóstico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical (FocR4T)”, el cual busca desarrollar capacidades similares en los cuatro países miembros (Bolivia, Ecuador, Perú y Colombia) para identificar el hongo. Uno de los componentes más importantes del proyecto, es el desarrollo de un ensayo de aptitud para verificar la competencia técnica de los laboratorios en la detección del patógeno.

Esta necesidad ha sido ratificada ante los recientes reportes de FocR4T en América, particularmente en Colombia (2019), Perú (2021) y Venezuela (2023), lo que exige intensificar las iniciativas para garantizar la obtención de resultados confiables, como insumo para la toma oportuna de decisiones en materia de vigilancia y control. Atendiendo a este componente, la Comunidad Andina en conjunto con el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), el Instituto Nacional de Metrología de Colombia (INM) y la corporación KeyGene aunaron esfuerzos para organizar un ensayo de aptitud (EA) que permita evaluar las capacidades de los laboratorios participantes en el diagnóstico de FocR4T a partir de la técnica de PCR.

Este documento atiende los requisitos establecidos en la norma NTC ISO/IEC 17043:2010 [1] y la NTC ISO 13528:2017 [2].

2. OBJETIVO DEL ENSAYO DE APTITUD

Evaluar el desempeño de los laboratorios participantes, para la detección del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Raza 4 Tropical (FocR4T) a través de métodos basados en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), con el fin de que cada laboratorio identifique oportunidades de mejora en su sistema de medición.

3. ALCANCE DEL ENSAYO DE APTITUD

Este ensayo de aptitud fue diseñado para laboratorios de diagnóstico fitosanitario o sanidad vegetal pertenecientes a Organizaciones Nacionales de Protección Fitosanitaria - ONPF, institutos de investigación o laboratorios que presten servicios de detección de FocR4T en musáceas por PCR tiempo real, punto final y/o digital a partir ADN genómico de FocR4T en matriz de ADN de banano variedad Cavendish o buffer TE 1X pH 8.0. Debido al carácter cuarentenario del hongo, este ensayo de aptitud no contempla la etapa de extracción de ácidos nucleicos.

4. ORGANIZACIÓN DEL EA

La organización general de este ensayo de aptitud estuvo a cargo de:

Instituto Nacional de Metrología – Subdirección de Servicios Metrológicos y Relación con el Ciudadano. **Dirección:** Avenida Carrera 50 No. 26-55, Int 2, CAN, Bogotá D.C. **Correo electrónico:** contacto@inm.gov.co, **Teléfono:** 254 2222 Ext. 1413.

La tabla 1 y 2 presentan el personal de contacto y el cronograma del Ensayo de Aptitud

Tabla 1. Personal de contacto

Instituto Nacional de Metrología de Colombia - INM
Avenida Carrera 50 No.26- 55 Int. 2 CAN Bogotá D.C.-Colombia
Conmutador: (57- 1) 2542222 - **Website:** www.inm.gov.co
E-mail: contacto@inm.gov.co - Twitter: @inmcolombia
Código Postal 111321



**MINISTERIO DE COMERCIO,
INDUSTRIA Y TURISMO**

Nombre	Cargo	Responsabilidad
Claudia Angélica Guillén	Subdirectora de Servicios Metroológicos y Relación con el Ciudadano - INM	Coordinador de Gestión Administrativa del Ensayo de Aptitud
Edna Julieth Villarraga Farfán	Subdirectora de Metrología Química y Biología – INM	Apoyo en coordinación técnica
John Emerson Leguizamón Guerrero	Profesional especializado - INM	Experto técnico
Claudia Patricia Tere	Profesional especializado - INM	Experto técnico de apoyo
Oscar Javier Dix Luna	Profesional Especializado - ICA	Experto técnico
Isabel Cristina Calle	Profesional Contratista - ICA	Experto técnico
María Mercedes Arias Cortés	Profesional Contratista - ICA	Experto técnico
Gustavo Gómez Escobar	Contratista SSM - INM	Coordinador de Gestión Técnica del Ensayo de Aptitud y experto estadístico
Antonio García Tarquino	Profesional especializado - INM	Apoyo en gestión
Luis Felipe Santos Becerra	Contratista SSM - INM	Experto estadístico
Yeni Paola Alonso Páez	Contratista SSM – INM	Apoyo administrativo

Tabla 2. Cronograma final del ensayo de aptitud

No.	Actividad	Fecha
1	Envío de protocolo final y anexos	2023-05-05
2	Reunión de apertura	2023-05-12
3	Envío de muestras	2023-05-29 al 2023-06-09
4	Período para realizar las mediciones y reporte de resultados	2023-06-13 al 2023-06-23
5	Fecha máxima de reporte de resultados	2023-07-26
6	Informe preliminar	2023-07-28
7	Recepción de comentarios sobre el informe preliminar	Hasta 2023-08-04
8	Reunión de cierre	2023-09-07
9	Envío del Informe final	2023-09-28

5. CONFIDENCIALIDAD

Toda la información entregada por los participantes fue tratada de forma confidencial y anónima, para el efecto se asignó un código numérico a cada participante, el cual fue informado una vez realizada la inscripción al ensayo de aptitud. Es responsabilidad del participante preservar la confidencialidad del código asignado.

Todo el personal involucrado con el proceso de Ensayos de Aptitud y/o Comparación Interlaboratorio ha firmado un documento comprometiéndose a manejar de forma confidencial la información del ensayo y/o comparación. De igual forma, los resultados pueden ponerse a disposición de los asesores técnicos externos al INM durante el proceso de análisis de resultados o de los evaluadores externos durante las auditorías, quienes firmarán previamente los compromisos de confidencialidad respectivos.

Adicionalmente, en cumplimiento de lo establecido por el ONAC en el numeral 8.5 de la Circular Externa CEA-3.0-04 "Política para la participación en Ensayo de Aptitud (EA) en laboratorios", el Instituto Nacional de Metrología podrá reportar la participación de los laboratorios en este ensayo de aptitud al Organismo Nacional de Acreditación - ONAC.

Considerando que la organización y ejecución del ensayo de aptitud corresponden a uno de los componentes del proyecto regional aprobado por la CAN mediante la Decisión 832, se aclara que el ICA y la Comunidad Andina como organizadores, tendrán acceso a la información de los resultados obtenidos en el ensayo de aptitud, si así es requerido.

El INM, el ICA y la Comunidad Andina podrán utilizar los resultados de este Ensayo de Aptitud y/o Comparación Interlaboratorio para la elaboración de artículos y publicaciones de carácter científico o académicos, conservando la confidencialidad de los participantes.

Política del buen uso de informes: El INM tiene como política propender por el buen uso de los resultados de los Ensayo de Aptitud, para lo cual informa a los participantes que está prohibida la utilización de los resultados expuestos en el informe para resaltar las debilidades de otros participantes u obtener un provecho indebido del mismo. Adicionalmente, los resultados del informe final en el que se incluyen datos, documentos, gráficos, información individual de cada laboratorio, no pueden ser modificados de forma alguna, copiados o distribuidos separadamente de su contexto, texto, gráfico o imagen que los acompañe, dado que son elaborados dentro de un proceso de ensayo de aptitud del INM.

Términos de propiedad intelectual: Toda la información, diseño, producto, obra o procedimiento, que resulte de las investigaciones, métodos aplicados y/o actividades relacionadas con el proceso de ensayo de aptitud y que dé lugar a los derechos de propiedad intelectual de conformidad con la Ley 23 de 1982, la Decisión Andina 351 de 1993, Ley 44 de 1993 y demás normas relacionadas con la propiedad intelectual serán de propiedad exclusiva del INM, ICA y CAN.

Se entiende que los resultados del proceso del Ensayo de Aptitud pertenecen a INM, toda vez que fueron realizados según el plan señalado por la entidad. Por su parte, los resultados generados por los laboratorios pertenecen a los participantes.

En todo caso, el INM es titular exclusivo de los derechos patrimoniales sobre las obras resultantes de los procesos de los Ensayos de Aptitud, pudiendo disponer de ellas a cualquier título, sin limitación de modo, tiempo y lugar.

6. ACTIVIDADES SUBCONTRATADAS

La provisión del ADN genómico de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cupense* Raza 4 Tropical, del ADN de banano Cavendish, y el transporte de las muestras fueron gestionados a través del convenio derivado 01 del convenio marco interadministrativo GGC-002-2022 suscrito entre INM e ICA.

7. ÍTEM DE ENSAYO DE APTITUD

7.1. Descripción

El ítem de ensayo estaba compuesto de un panel con cinco (5) soluciones dentro de las que se incluyeron muestras positivas y negativas. Las muestras positivas correspondían a diluciones gravimétricas de ADN genómico de *FocR4T* en buffer TE 1X (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) con y sin fortificación con ADN genómico de banano *Cavendish*. Las muestras negativas estaban compuestas por *buffer* TE 1X, una fortificada con ADN de banano *Cavendish* y la otra sin fortificar.

El ADN de *FocR4T* fue suministrado por la corporación KeyGene (caracterizado por secuenciación total del genoma para garantizar su identidad) y el ADN genómico de banano *Cavendish* o por el Instituto Colombiano Agropecuario, con identidad certificada.

7.2. Preparación

20 mL de buffer TE 1X (10 mM Tris-HCl 1mM EDTA pH 8.0) se fortificaron con ADN genómico de banano *Cavendish* a una concentración final de 2 ng/μL.

El material de partida de ADN genómico de *Foc R4T* se diluyó volumétricamente tanto con el buffer fortificado (nivel 1 y 2) como sin fortificar (Nivel 3), hasta obtener soluciones del valor nominal de 10000 y 4000 copias/μL. Los dos controles negativos buffer fortificado y sin fortificar correspondieron al nivel 4 y 5 respectivamente. Las diluciones se homogeneizaron en agitador orbital durante 60 min a 40 rpm antes de dispensar.

7.3. Caracterización y asignación de valor

La homogeneidad y la estabilidad del IEA fue evaluada de acuerdo con los lineamientos de la Guía ISO 35: 2017, encontrándose adecuados para el desarrollo de este ensayo de aptitud.

La asignación de valor se realizó empleando PCR digital, empleando los primers y sondas descritas por Aguayo et al [3]. La tabla 3 presenta el consolidado de los resultados obtenidos y el valor asignado al material de referencia empleado como ítem de Ensayo.

Tabla 3. Valor asignado en copias/μL e incertidumbre para los niveles evaluados

Niveles	Asignación de valor					
	Valor (copias/ μ L)	u comb.	u rel.	k	U (K=2, 95% nivel de confianza)	U rel.
N1 (10.000 copias/ μ L en matriz de Cavendish)	11855.5	947.3	8.0%	2.09	1982.8	16.7%
N2 (4.000 copias/ μ L en matriz de Cavendish)	4583.8	232.1	5.1%	2.09	485.7	10.6%
N3 (10.000 copias/ μ L en buffer TE 1X)	4421.8	399.4	9.0%	2.09	835.9	18.9%

Por otro lado, se midió el material por PCR tiempo real, con los métodos reportados por Aguayo, Matthews [4] y Dita [5] (para gen *Banactina*), los resultados se reportan en la tabla 4.

Tabla 4: Valores informativos por PCR tiempo real

Piloto ADN Foc R4T	Número de ciclo (Ct)*		
	Gen FWB Método Aguayo et al., 2017	Gen RT.13 Método Matthews et al., 2020	Gen BanActin Método Ditta
N1 (10.000 copias/ μ L en matriz de Cavendish)	21.5 \pm 0.3	20.0 \pm 0.1	26.5 \pm 0.1
N2 (4.000 copias/ μ L en matriz de Cavendish)	22.9 \pm 0.5	21.2 \pm 0.1	26.5 \pm 0.2
N3 (4.000 copias/ μ L en buffer TE 1X)	22.9 \pm 0.2	21.5 \pm 0.1	N/A
NTC2 (Matriz de Cavendish)	N/A	N/A	26.5 \pm 0.1
Eficiencia amplificación	97.5%	97.9%	98.2%

*Valores promedio de Ct (con desviación estándar, N=6) esperados al probar 2 μ L de dos viales de cada nivel, en el ensayo de qPCR particular medido con un umbral automático en un termociclador qPCR CFX96.

7.4. Presentación final

Cada participante recibió un panel con 5 crioviales de 500 μ L con tapa rosca, que contenían 80 μ L de solución (aproximadamente), empaquetados en un blíster plástico, bolsa plástica y bolsa aluminizada con cierre ziploc, sellada al calor (figura 1). Cada panel fue embalado en una nevera de icopor con hielo seco o geles refrigerantes para garantizar la cadena de frío durante el transporte. Tanto el panel como cada uno de los viales se encontraban codificados

Figura 1. Presentación del ítem de Ensayo de Aptitud



8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO

Después de recibir los resultados por parte de los laboratorios participantes, se procedió a realizar el tratamiento estadístico de los datos según directrices de las normas ISO 13528:2022 y ISO/IEC 17043:2010.

A continuación, se presenta la metodología utilizada para realizar el análisis estadístico y la evaluación del desempeño con base en dichos resultados.

Evaluación de desempeño

Instituto Nacional de Metrología de Colombia - INM
 Avenida Carrera 50 No.26- 55 Int. 2 CAN Bogotá D.C.-Colombia
 Conmutador: (57- 1) 2542222 - Website: www.inm.gov.co
 E-mail: contacto@inm.gov.co - Twitter: @inmcolombia
 Código Postal 111321



**MINISTERIO DE COMERCIO,
 INDUSTRIA Y TURISMO**

Para este Ensayo de Aptitud se aplicó una evaluación cualitativa y el desempeño estuvo basado en el número de muestras reportadas correctamente, según el numeral 11 de la norma NTC ISO 13528:2017, como se presenta en la Tabla 5.

Tabla 5: Criterio de evaluación Ensayo de Aptitud FocR4T

Parámetro	Declaración de Resultado	Criterio de Evaluación
Detección de <i>FocR4T</i> (Cualitativo)	Positivo Negativo	80 % (4 de 5 resultados correctos respecto del valor asignado)

La evaluación de cada ítem fue binaria (positivo / negativo) partiendo de la detección de ADN genómico de *FocR4T*, y el desempeño global se evaluó con base en la concordancia o proporción de resultados correctos (PRC) entre los resultados del laboratorio participante y el laboratorio de referencia, de acuerdo con la ecuación 1; donde el número de soluciones asignadas correctamente corresponde a las soluciones cuyo resultado sea igual al valor de referencia:

$$\text{Proporción de resultados correctos} = \frac{\text{Número de soluciones asignados correctamente}}{5} * 100 \% \text{ (Ecuación 1)}$$

De acuerdo con la evaluación desempeño a través de “proporción de resultados correctos” se tiene:

- Si la proporción de resultados correctos fue mayor o igual al 80 % ($\geq 80\%$), el desempeño se considera “Satisfactorio”.
- Si la proporción de resultados correctos fue inferior a 80% ($< 80\%$), el desempeño se considera “No Satisfactorio”.

9. VALORES ASIGNADOS Y TRAZABILIDAD METROLÓGICA

Dado que el ensayo de aptitud es de carácter cualitativo, se tienen en cuenta los lineamientos establecidos en el numeral 11 de la norma NTC-ISO 13528:2017 “Diseño y análisis de programas de ensayos de aptitud cualitativo”. En concordancia, el valor asignado se determinó a partir de la confirmación realizada por el laboratorio de referencia antes de la distribución de las muestras a los participantes; dicho valor fue monitoreado por el laboratorio de referencia al finalizar el periodo establecido para la medición por parte de los participantes. Para obtener un resultado satisfactorio, el participante debía obtener una proporción de resultados correctos mayor o igual al 80 %. (proporción de resultados correctos, numeral 11.4.4 de la NTC ISO 13528:2017).

Por su parte, el laboratorio de referencia asignó valor a cada uno de los materiales del IEA empleando PCR digital como método de referencia (DOI: 10.1373/clinchem.2017.285478), donde éste (copias / μL) es trazable a la unidad (1, número de entidades - copias) y a volumen (μL) medido en el INM por medición directa del diámetro de la gota en un sistema óptico Mitutoyo Quick Scope, de manera que se asegura la clasificación de las muestras como positivas o negativas.

10. ANÁLISIS DE RESULTADOS

10.1 Resultados

A continuación, se presentan en la Tabla 6. los datos para cada laboratorio: código del laboratorio, el código de la muestra, el resultado reportado por el participante para cada ítem, el valor asignado para cada ítem, la proporción de resultados correctos y la evaluación de desempeño de cada laboratorio participante.

Tabla 6: Resultados y evaluación de desempeño

Código Laboratorio	Solución	Resultado reportado por participante	Valor asignado	% de soluciones asignadas correctamente	Evaluación de desempeño
101	U-019	Negativo	Negativo	100%	Satisfactorio
	U-214	Negativo	Negativo		
	U-084	Positivo	Positivo SM-4000		
	U-149	Positivo	Positivo MM-10000		
	U-279	Positivo	Positivo MM-4000		
102	U-007	Negativo	Negativo	100%	Satisfactorio
	U-202	Negativo	Negativo		
	U-072	Positivo	Positivo SM-4000		
	U-137	Positivo	Positivo MM-10000		
	U-267	Positivo	Positivo MM-4000		
103	U-014	Negativo	Negativo	100%	Satisfactorio
	U-209	Negativo	Negativo		
	U-079	Positivo	Positivo SM-4000		
	U-144	Positivo	Positivo MM-10000		
	U-274	Positivo	Positivo MM-4000		
106	U-008	Negativo	Negativo	100%	Satisfactorio
	U-203	Negativo	Negativo		
	U-073	Positivo	Positivo SM-4000		
	U-138	Positivo	Positivo MM-10000		
	U-268	Positivo	Positivo MM-4000		
107	U-064	Negativo	Negativo	100%	Satisfactorio
	U-259	Negativo	Negativo		
	U-129	Positivo	Positivo SM-4000		
	U-194	Positivo	Positivo MM-10000		
	U-324	Positivo	Positivo MM-4000		

Código Laboratorio	Solución	Resultado reportado por participante	Valor asignado	% de soluciones asignadas correctamente	Evaluación de desempeño
109	U-027	Negativo	Negativo	100%	Satisfactorio
	U-222	Negativo	Negativo		
	U-092	Positivo	Positivo SM-4000		
	U-157	Positivo	Positivo MM-10000		
	U-287	Positivo	Positivo MM-4000		
110	U-040	Negativo	Negativo	100%	Satisfactorio
	U-235	Negativo	Negativo		
	U-105	Positivo	Positivo SM-4000		
	U-170	Positivo	Positivo MM-10000		
	U-300	Positivo	Positivo MM-4000		
111	U-024	Negativo	Negativo	100%	Satisfactorio
	U-219	Negativo	Negativo		
	U-089	Positivo	Positivo SM-4000		
	U-154	Positivo	Positivo MM-10000		
	U-284	Positivo	Positivo MM-4000		
113	U-046	Negativo	Negativo	100%	Satisfactorio
	U-241	Negativo	Negativo		
	U-111	Positivo	Positivo SM-4000		
	U-176	Positivo	Positivo MM-10000		
	U-306	Positivo	Positivo MM-4000		
115	U-063	Negativo	Negativo	100%	Satisfactorio
	U-258	Negativo	Negativo		
	U-128	Positivo	Positivo SM-4000		
	U-193	Positivo	Positivo MM-10000		
	U-323	Positivo	Positivo MM-4000		

Código Laboratorio	Solución	Resultado reportado por participante	Valor asignado	% de soluciones asignadas correctamente	Evaluación de desempeño
117	U-021	Negativo	Negativo	100%	Satisfactorio
	U-216	Negativo	Negativo		
	U-086	Positivo	Positivo SM-4000		
	U-151	Positivo	Positivo MM-10000		
	U-281	Positivo	Positivo MM-4000		
118	U-023	Negativo	Negativo	100%	Satisfactorio
	U-218	Negativo	Negativo		
	U-088	Positivo	Positivo SM-4000		
	U-153	Positivo	Positivo MM-10000		
	U-283	Positivo	Positivo MM-4000		
119	U-026	Negativo	Negativo	100%	Satisfactorio
	U-221	Negativo	Negativo		
	U-091	Positivo	Positivo SM-4000		
	U-156	Positivo	Positivo MM-10000		
	U-286	Positivo	Positivo MM-4000		
121	U-004	Negativo	Negativo	100%	Satisfactorio
	U-199	Negativo	Negativo		
	U-069	Positivo	Positivo SM-4000		
	U-134	Positivo	Positivo MM-10000		
	U-264	Positivo	Positivo MM-4000		

De los catorce (14) laboratorios participantes **TODOS** obtuvieron una evaluación de desempeño de “Satisfactorio”.

10.2 Análisis descriptivo información remitida por los participantes

De acuerdo con la información enviada como soporte por los participantes, para los métodos empleados, y las condiciones de ensayo, se puede resumir lo siguiente:

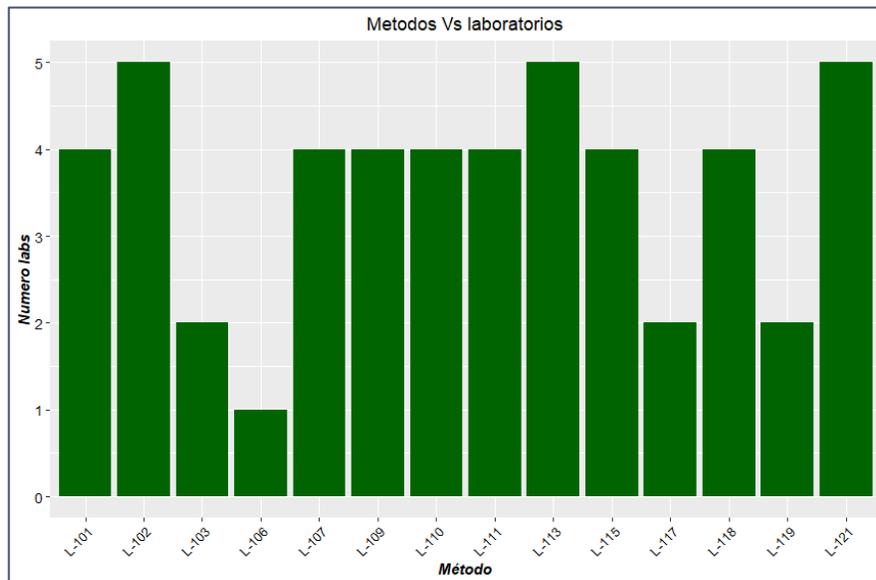
En relación con los métodos de medición, el de Dita y el de Aguayo son los más empleados, seguidos por el de Li et al, a nivel comercial se emplearon el kit de Clear ® Detections y el de amplificación isotérmica de LAMP (universidad Wageningen), uno de los laboratorios desarrollo un método por PCR digital. La tabla 7 presenta la relación de frecuencias:

Tabla 7. Relación de métodos y su frecuencia reportados por los laboratorios

Métodos	Peso
Aguayo <i>et al</i>	20%
Mathews <i>et al</i>	4%
Clear_D	12%
Dita (BanActine)	24%
Dita (EF1α)	12%
Carvalhais <i>et al</i>	14%
Li <i>et al</i>	10%
LAMP	2%
Desarrollado por el Lab.	2%

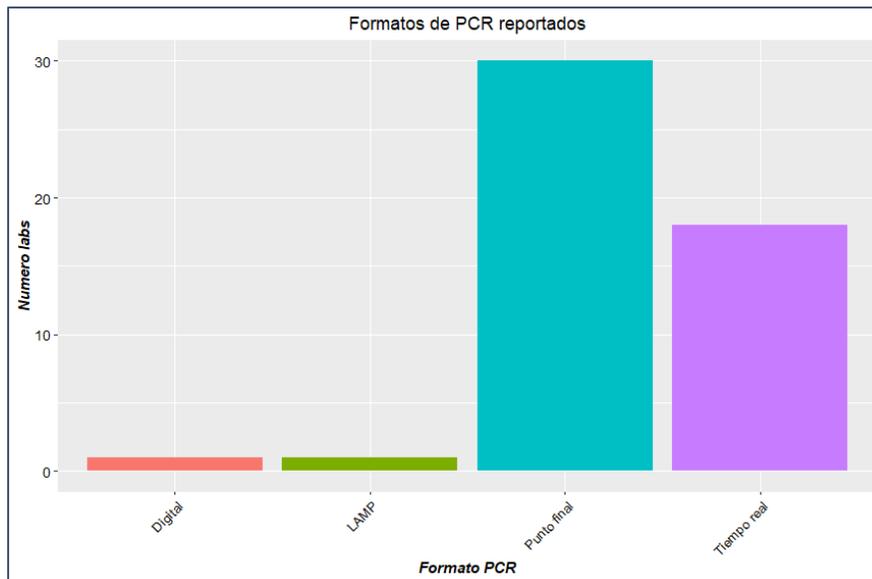
En cuanto al número de métodos implementados por laboratorio, el 7% de los laboratorios reportó uno método, el 21% dos métodos, el 50% cuatro métodos y el 21% cinco métodos (Figura 2).

Figura 2: Número de métodos reportados por laboratorio



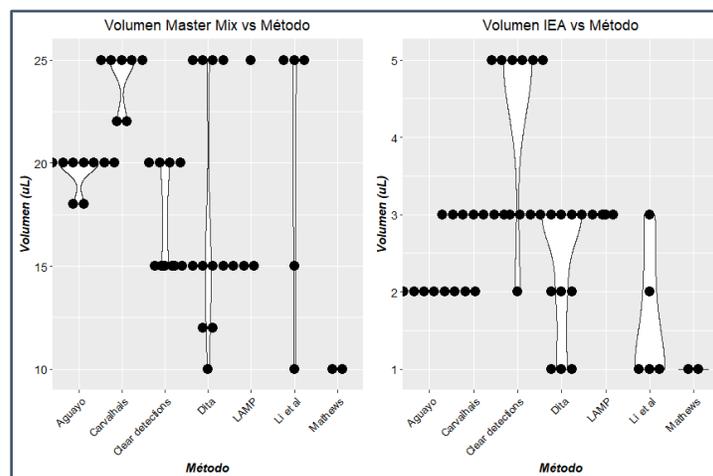
La técnica más empleada fue PCR punto final con el 60%, seguida de PCR tiempo real con el 36%, en menor proporción PCR digital y PCR isotérmica. (Figura 3)

Figura 3. Plataformas de PCR reportadas por los laboratorios



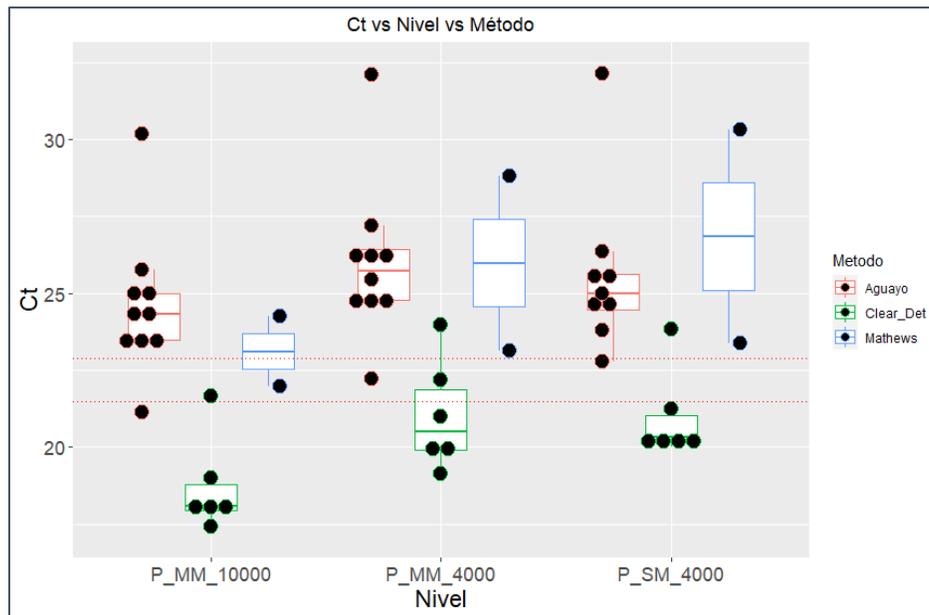
La figura 4 presenta la relación de volúmenes tanto para la mezcla de reacción como para el IEA empleados por los laboratorios, de acuerdo con los diferentes protocolos implementados.

Figura 4. Volúmenes de mezcla de reacción y muestra reportados por los laboratorios



De acuerdo con los resultados de tipo cuantitativo, relacionados con los métodos por PCR tiempo real (Aguayo, Matthews y Clear Detections), independiente del grado de dispersión obtenido, éstos fueron adecuados para la asignación como positivo o negativo, teniendo en cuenta el nivel de concentración de las muestras empleadas (Figura 5).

Figura 5. Respuesta instrumental (Ct) vs muestras del IEA



MM: Con matriz de ADN Genómico de banano; SM: Sin Matriz.

Finalmente, la tabla 8 presenta la relación de los diferentes controles tanto positivos como negativos reportados por los laboratorios, en sus procesos de medición.

Tabla 8. Controles reportados por los laboratorios para el proceso de medición.

Tipo	Control positivo	Control negativo
ADN sintético	gBlock FocR4T (Aguayo) PAC FocTR4	Agua ADN sintético / in vitro PACCOX
ADN genómico	Micelio FocR4T ADN planta infectada	ADN micelio (<i>F. solani</i> , <i>F. ananatum</i> , FocR1) ADN planta banano

11. RECOMENDACIONES O COMENTARIOS AL PROCESO DE MEDICIÓN DE LOS LABORATORIOS PARTICIPANTES

De manera general y de acuerdo con la información reportada por los laboratorios, se evidencia como la mayoría han empleado protocolos con diferentes métodos de ensayo basados en PCR, empleando diferentes reactivos, plataformas, y condiciones experimentales que son adecuados para la detección de secuencias genéticas de ADN de FocR4T, en los niveles de concentración empleados en el presente EA, donde el proceso de medición no contempló la extracción de ADN.

Para los protocolos que hacen uso de la respuesta instrumental por PCR tiempo real en la clasificación de las muestras como positivas o negativas, se evidenció un riesgo asociado a la declaración de un falso negativo por efectos de una respuesta alta en términos de Ct (Ciclo umbral en PCR tiempo real), el cual debe correlacionarse con los valores obtenidos para los controles empleados por los laboratorios en el proceso de medición.

Los laboratorios disponen de un conjunto de métodos de medición basados en diferentes formatos de PCR, con diferentes dianas de detección, así como protocolos de tamizaje y confirmación que les permite establecer diferentes algoritmos de medición para asegurar el resultado del proceso de medición y/o detección.

12. ASESORÍA

Los participantes pueden solicitar asesoría relacionada con el análisis estadístico y la interpretación de los resultados presentados en este informe. Para acceder a esta, enviar la solicitud a través del correo contacto@inm.gov.co.

13. APELACIONES

Si un participante se encuentra en desacuerdo con los resultados frente a la evaluación de desempeño y tiene evidencia objetiva que sustente su solicitud, puede realizar una apelación y para ello debe diligenciar el formato M-05-F-009 que se envía anexo a este informe. Este formato se recibe diligenciado a través del correo electrónico contacto@inm.gov.co con copia al correo comparaciones@inm.gov.co, máximo 5 días hábiles de la fecha del envío del informe final. La respuesta a la apelación se enviará vía correo electrónico en un plazo máximo de 30 días calendario.

Las razones de una apelación deben asociarse en las siguientes situaciones específicas:

- 1.) Transcripción errónea de resultados en el informe final por parte del proveedor de EA que afecte el indicador de desempeño y la evaluación del mismo,
- 2.) El tratamiento estadístico de los resultados del ensayo de aptitud,
- 3.) Evaluación de desempeño,
- 4.) Las recomendaciones presentadas por los expertos técnicos.

14. REFERENCIAS

1. NTC-ISO/IEC 17043, Evaluación de la conformidad. Requisitos generales para los Ensayos de Aptitud, Bogotá, D.C.: Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC), 2010.
2. NTC ISO 13528, Métodos estadísticos para utilizar en ensayos de aptitud mediante comparaciones interlaboratorios, Bogotá: Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC), 2017.
3. Aguayo, J., et al. (2017). "Development of a hydrolysis probe-based real-time assay for the detection of tropical strains of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 4." PLoS ONE 12(2): e0171767
4. Matthews, M. C., Mostert, D., Ndayihanzamaso, P., Rose, L. J., & Viljoen, A. (2020). Quantitative detection of economically important *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense strains in Africa in plants, soil and water. PLoS One, 15(7), e0236110.
5. Dita, M., et al. (2010). "A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana *Fusarium* wilt pathogen." Plant pathology 59(2): 348-357.

CLAUDIA ANGÉLICA GUILLÉN
Subdirectora de Servicios Metrológicos y Relación
con el Ciudadano

EDNA JULIETH VILLARRAGA FARFÁN
Subdirectora de Metrología Química y Biología

Elaboró: Gustavo Gómez Escobar
John Emerson Leguizamón Guerrero

Revisó: Claudia Patricia Tere Peña
Luis Felipe Santos
Antonio García Tarquino
Oscar Dix Luna
María Mercedes Arias
Isabel Cristina Calle
Lida Velandia Rey (O)
Angela María Rubiano (O)

----- Fin del informe -----