

## Използване на сертифицирани референтни материали за количествено определяне на ГМО в храни и фуражи

*Настоящият документ предоставя информация и насоки за правилната употреба на референтните материали на СИЦ, сертифицирани по отношение на тегловния дял на техните генетично модифицирани (ГМ) съставки, получени в резултат на определено трансформационно събитие. В документа се обяснява как се формира измервателната система за количествено определяне на ГМО в контекста на ЕС.*

Автор: Stefanie Trapmann

Европейска комисия - Съвместен изследователски център

Retieseweg 111, 2440 Geel, Белгия

Имейл: stefanie.trapmann@ec.europa.eu

### ВЪВЕДЕНИЕ

В ЕС за генетично модифицираните организми (ГМО) трябва да се получи разрешение, преди да се допусне пускането им на европейския пазар. Регламент (ЕО) № 1830/2003 изисква хранителните и фуражните продукти, съдържащи повече от 0,9 % ГМО, да бъдат етикетирани. Съгласно Регламент (ЕС) № 619/2011 фуражът може да съдържа 0,1 (m/m) % ГМО, за който е в ход процедура за даване на разрешение или за който разрешението в ЕС е изтекло. За да бъде изпълнено законодателството на ЕС, количественото определяне на ГМО в хранителните/фуражните продукти трябва да бъде извършено по надежден начин. За тази цел решението за издаване на разрешение за всеки ГМО, публикувано от ЕС, посочва метода за откриване и сертифицирания референтен материал (СРМ), които формират измервателната система за количественото определяне. Официалният СРМ се използва за калибриране на специфичния за съответното събитие референтен метод на количествена PCR, валидиран от Референтната лаборатория на ЕС за ГМ храни и фуражи (EU-RL GMFF).

### ХАРАКТЕРИСТИКИ НА СРМ ЗА ГМО

Сертифицираните стойности на всички СРМ за ГМО от СИЦ са базирани на масите на изсушен генетично модифициран растителен материал (в повечето случаи прах от семена) и/или изсушен генетично немодифициран растителен материал. За СРМ, изискващи смесването на генетично модифицирани и немодифицирани материали, по време на сертифицирането масите се коригират с оглед на тяхното съдържание на вода и на оценките за чистотата им. Тегловният дял на генетично модифицирания материал се изчислява както следва:

коригирана маса на материал с ГМ

коригирана маса на материала + коригирана маса на материала без ГМ

Всеки СРМ за ГМО е сертифициран по отношение на тегловния дял на специфично трансформационно събитие (посочен в сертификата). СРМ може да бъде използван за количествено определяне единствено на това събитие, а съответният непроменен материал (генетично немодифициран материал) единствено за доказване на отсъствието на това събитие в количества под посочения в сертификата праг.

За всеки СРМ за ГМО в сертификата се посочват препоръчителните условия на съхранение. От производителя на РМ не може да се търси отговорност за промени, станали по време на съхранението на материала в помещенията на клиента, особено за отворени проби. Ако един СРМ за ГМО се използва многократно, трябва да се минимизира поемането на вода от хигроскопичните материали, като бутилката се затвори веднага след вземането на проба.

### МЕТОД ЗА КОЛИЧЕСТВЕНО ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ГМО

Количествената полимеразна верижна реакция (qPCR) е често използван метод за количествено определяне на ГМ съдържанието в хранителните и фуражни проби. Този основаващ се на ДНК метод за количествено определяне измерва съотношението между трансгенната, т.е. получена чрез генетичната модификация, дезоксирибонуклеинова киселина (ДНК) и ендогенната ДНК, която е специфична за съответния биологичен вид.

Предоставяните от СИЦ СРМ за ГМО са предназначени за използване заедно със специфичния за съответното събитие референтен метод на количествена PCR, валидиран от EU-RL GMFF. Подадените и

валидирани в съответствие с разпоредбите на Регламент (ЕО) № 1829/2003 методи за откриване на ГМО въз основа на количествена PCR са публично достъпни чрез началната страница на EU-RL GMFF (<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/StatusOfDossiers.aspx>). Ако CPM се използват в скринингови анализи, трябва да се вземе под внимание, че генетично немодифицираният CPM може да създаде позитивни сигнали при скрининговия анализ, докато те в действителност са отрицателни за специфичния за събитието метод. Следователно е необходимо позитивните скринингови сигнали да се интерпретират внимателно.

При изготвянето на CPM за ГМО се отделя специално внимание, за да се осигури, че генетично модифицираните и немодифицираните прахообразни материали са сходни по отношение на разпределението на размерите на техните частици. Това е особено важно, тъй като количеството на ДНК, която може да бъде извлечена, е в корелационна зависимост с размерите на частиците. Евентуални разлики в ефективността на процеса на извличане на ДНК от генетично модифицираните и от немодифицираните прахообразни материали ще окажат влияние на измереното чрез qPCR съдържание на ГМ материал. Освен това трябва да се използват само методи за извличане на ДНК, които са валидирани, че изпълняват изискванията за количествено определяне на ГМО, и които са доказали, че работят с различни разновидности от същия вид. При сертифицирането тегловният дял на ГМО в CPM се проверява, като се използва специфичен за събитието qPCR метод. Ако са наблюдавани различни нива на извличане на ДНК, тази информация се предоставя.

Генетичният състав на различните части на семената на едноседелните растения (напр. на ендосперма, семенната обвивка и зародиша на царевичката) е различен и стойността на съотношението на ДНК в произведеното от цели зърна пълнозърнесто брашно е различна от тази на произведеното от рафинирани зърна (съдържащи само ендосперма) брашно. СИЦ използва пълнозърнести брашна за своите CPM за ГМО.

Всички CPM за ГМО от СИЦ са произведени по гравиметричен метод, като са използвани чисти генетично немодифицирани и модифицирани растителни материали. Те са сертифицирани по отношение на тегловния дял на ГМО, като подпомагат прилагането на праговете за тегловен дял, посочени в

съответното законодателство на ЕС за храни и фуражи. Повечето CPM за ГМО са предназначени да бъдат използвани като калибратори за измервания чрез qPCR.

Измервателната система за количественото определяне на ГМО в правния контекст на ЕС се установява с официалния CPM, посочен в решението за издаване на разрешение, и с валидирания от EU-RL измервателен метод и затова не е необходимо коригиране. Също така тук не е необходимо да се взема предвид комутативността, която е ключова характеристика за референтните материали, ако се прилагат различни измервателни методи.

### КОД НА CPM ЗА ГМО

Всеки CPM за ГМО има индивидуален код, който е от комбинация от букви и цифри. Общият формат е ERM-BF123xy. Обозначението „ERM®“ сочи марката (защитена търговска марка за Европейски референтен материал), а „BF“ сочи, че това е растителен CPM, сертифициран по отношение на ГМ съдържанието. Последващите три цифри са специфични за всяко отделно събитие. Обозначението „x“ е малка буква, варираща от „a“ до „g“, и се добавя след кода за събитието, за да обозначи равнището на тегловния дял (т.е. ERM-BF412a = номинално 0 g/kg, ERM-BF412b = номинално 1000 g/kg, ERM-BF412c = номинално 1 g/kg, ERM-BF412d = 10 g/kg, номинално ERM-BF412e = 100 g/kg). Обозначението „y“ е малка буква, варираща от „k“ до „z“, и обозначава втора, трета и т.н. производствена серия на CPM. Първата производствена серия е без това допълнително обозначение „y“.

В повечето случаи се произвеждат материали с пет различни нива на концентрация на комплект: номинални 0 и 100 % и смеси от по 0,1, 1 и 10 (m/m) %. За да се улесни разпознаването на различните равнища тегловен дял, се използват цветово кодирани капачки: номинално 0 g/kg = сребриста, номинално 1000 g/kg = черна, номинално 1 g/kg = златиста, номинално 10 g/kg = червена, номинално 100 g/kg = кафява.

За всяка производствена серия са използвани различни растителни материали (напр. партиди семена). Освен това разпределението на размерите на частиците може да е различно, въпреки че се полагат всички усилия, за да се запази непроменено между старите и новите серии. Поради това калибровъчните криви, установени с всяка нова серия CPM, може да се различават от тези, установени със старата серия, и когато

се използва CPM от нова серия за пръв път, следва да се започнат нови диаграми за контрол на качеството. Подобно, препоръчва се за всички приложения, включително калибриране и контрол на качеството, да се премине от използването на старата серия към използване на новата серия. С цел проследяемост винаги трябва да се посочва конкретния CPM, използван за калибрирането.

статистическа оценка. Когато материалът се използва за калибриране, лабораторията трябва да осигури, че използва сертифицираните стойности (вж. примера).

Известен брой CPM за ГМО са сертифицирани по отношение на идентичността си (т.е. ERM-BF421b). Такива CPM са предназначени да се използват като положителни контролни проби напр. при скрининг. Те следва да се използват за потвърждаване на наличието (или отсъствието) на определено трансформационно събитие, но не са подходящи за количествено определяне на ГМО.

Някои CPM за ГМО са сертифицирани с асиметричен интервал на неопределеност. Ако такъв CPM се използва за контрол на изместването (вж. Application Note 1 за ERM), „положителната“ неопределеност се използва, когато средната стойност на измерените резултати надвишава сертифицираната стойност, а „отрицателната“ неопределеност – когато средната стойност на измерените резултати е по-малка от сертифицираната стойност.



Фигура 1: Комплект CPM за ГМО

### СПЕЦИФИЧНИ АСПЕКТИ НА СЕРТИФИЦИРАНЕТО

Към повечето CPM за ГМО има също и чист генетично немодифициран прахообразен материал, както и чист генетично модифициран прахообразен материал. Генетично немодифицираният материал е сертифициран, че съдържа „по-малко от“ определен тегловен дял на ГМО въз основа на границата на откриваемост (LOD) на метода, използван за охарактеризиране. Чистият генетично модифициран прахообразен материал е сертифициран, че съдържа „повече от“ определен тегловен дял въз основа на изследвания брой семена и

Известен брой CPM за ГМО с определено ниво на концентрация са сертифицирани освен по отношение на тегловния дял на ГМО, също и по отношение на тяхното съотношение на броя на копията на ГМ ДНК (т.е. ERM-BF413e, ERM-BF415e, ERM-BF425c, ERM-BF427c), като се предоставя и съответен калибратор на плазмидна основа (т.е. ERM-AD413, ERM-AD415, ERM-AD425, ERM-AD427). Ако се използват за проверка на законово съответствие в ЕС, резултатите от измерването трябва да се преобразуват от съотношения на броя на копията на ДНК в тегловни дялове. Отбележете, че за тази цел EU-RL GMFF предоставя установени коефициенти за преобразуване.

## ПРИМЕР ЗА ИЗПОЛЗВАНЕТО НА ЧИСТИ СРМ ЗА ГМО И ТЕХНИТЕ НЕОПРЕДЕЛЕНОСТИ

Следната информация може да бъде намерена в сертификатите за анализ за ERM-BF412ak и ERM-BF412bk (<https://crm.jrc.ec.europa.eu/>):

	Тегловен дял на царевица Bt11 <sup>1)</sup>	
	Сертифицирана стойност [g/kg]	Неопределеност [g/kg] <sup>4)</sup>
ERM-BF412ak	< 0,12 <sup>2)</sup>	-
ERM-BF412bk	> 970 <sup>3)</sup>	-

- 1) Генетично модифицирана царевица с единен идентификатор SYN-BTØ11-1.
- 2) Сертифицираният референтен материал е произведен от конвенционални, немодифицирани зърна от царевица. При използване на специфичен за събитието анализ въз основа на количествена полимеразна верижна реакция, целящ трансформационното събитие на царевица Bt11, не е установено замърсяване в този материал. Границата на откриваемост (LOD) е 0,12 g/kg. При 95 % доверителност, действителният тегловен дял на царевица Bt11 в материала е под 0,12 g/kg. Сертифицираната стойност е проследима до Международната система единици (SI).
- 3) Този сертифициран референтен материал е произведен от генетично модифицирани зърна от царевица Bt11. Сертифицираната стойност е базирана на генетичната чистота на царевичния прахообразен материал спрямо царевица Bt11. Общо 209 зърна са изследвани поотделно за наличието на трансформационно събитие на царевица Bt11, от които 207 са дали положителни резултати. При 95 % доверителност, действителният тегловен дял на царевица Bt11 в материала е над 970 g/kg. Сертифицираната стойност е проследима до Международната система единици (SI).
- 4) Неопределеността е разширената неопределеност при коефициент на покритие  $k = 2$ , съответстваща на ниво на доверителност от около 95 %, изчислена в съответствие с Ръководство 98-3 на ISO/IEC, Ръководството за изразяване на неопределеността при измерване (GUM:1995), ISO, 2008.

Въз основа на горната информация може да се заключи, че CRM ERM-BF412ak е сертифициран, че съдържа < 0,12 g Bt11/kg, и че в прахообразния материал не е установено замърсяване. При 95 % доверителност, действителният тегловен дял на царевица Bt11 в материала е под 0,12 g/kg. Следователно, за по-нататъшни изчисления, включително създаване на калибровъчни криви, следва да се използва стойността 0 g/kg.

CRM ERM-BF412bk е сертифициран, че съдържа > 970 g/kg. 207 от 209 изследвани зърна са дали положителни резултати за наличието на трансформационно събитие за царевица Bt11. При 95 % доверителност, действителният тегловен дял на царевица Bt11 в материала е над 970 g/kg. За по-нататъшни изчисления, при създаването на калибровъчна крива за тази ГМ, за оценка на генетичната чистота следва да се използва стойността 990 g/kg. Отбележете, че за СРМ за чист генетично модифициран прахообразен материал, в който не е установено замърсяване, следва да се използва стойността 1000 g/kg.

Във всички случаи неопределеността, която следва да се използва, се изчислява според интервала между числовата стойност и посочената пределна стойност, разделено на  $\sqrt{3}$ . Например:

ERM-BF412ak: Използваната стойност е 0,0 g/kg; неопределеността е  $0,12 \text{ g/kg} - 0 \text{ g/kg} / \sqrt{3} = 0,07 \text{ g/kg}$

ERM-BF412bk: Използваната стойност, базирана на генетичната чистота, е  $207 / 209 * 1000 = 990 \text{ g/kg}$ . „Отрицателната“ неопределеност е  $(990-970) / \sqrt{3} = 11,5 \text{ g/kg}$ . „Положителната“ неопределеност е 10 g/kg, тъй като възможното съдържание на ГМО не може да надвишава 1000 g/kg.