

Využití certifikovaných referenčních materiálů ke kvantifikaci GMO v potravinách a krmivech

Září 2006

Poslední revize: Srpen 2019

Tato poznámka k aplikaci přináší informace a pokyny ke správnému používání referenčních materiálů Spojeného výzkumného centra Evropského společenství (JRC) certifikovaných z hlediska jejich geneticky modifikovaného (GM) hmotnostního podílu konkrétní linie GM. Vysvětluje se zde způsob zavedení systému měření pro kvantifikaci GMO v kontextu EU.

Autor: Stefanie Trapmann

Evropská komise - Spojené výzkumné středisko
Retieseweg 111, 2440 Geel, Belgie

E-mail: stefanie.trapmann@ec.europa.eu

ÚVOD

V Evropské unii se vyžaduje schválení geneticky modifikovaných organismů (GMO) dříve, než bude povoleno jejich uvedení na evropský trh. Nařízení (ES) č. 1830/2003 vyžaduje označování potravin a krmiv s obsahem GMO nad 0,9%. Podle nařízení (EU) č. 619/2011 může krmivo obsahovat 0,1 (m/m)% GMO, u kterého je proces autorizace v řízení, nebo pro které povolení v EU již vypršelo. K uplatnění právních předpisů EU musí být kvantifikace GMO v potravinách či krmivech prováděna spolehlivým způsobem. Při rozhodnutí o povolení každého GMO zveřejněného Evropskou komisí se proto specifikuje způsob detekce a certifikovaný referenční materiál (CRM), kterým se ustavuje systém měření pro kvantifikaci. Oficiální CRM se používá ke kalibraci kvantitativní referenční metody PCR pro konkrétní linii s ověřením Evropskou referenční laboratoří pro GM potraviny a krmiva (EU - RL GMFF).

CHARAKTERISTIKY CRM GMO

Certifikované hodnoty všech CRM GMO od Spojeného výzkumného centra Evropského společenství (JRC) vycházejí z množství sušeného geneticky modifikovaného rostlinného materiálu (ve většině případů semenného prášku) a/nebo sušeného geneticky nemodifikovaného rostlinného materiálu. U CRM se vyžaduje promíchání geneticky modifikovaných s geneticky nemodifikovanými materiály, hmotnosti se korigují na obsah vody a odhady čistoty během certifikaci. Hmotnostní podíl GM se vypočte následovně:

$$\frac{\text{korigovaná hmotnost GM prášku}}{\text{korig. hm. GM prášku} + \text{korig. hm. prášku z gen. nemodif. semen}}$$

Každý CRM GMO se certifikuje z hlediska hmotnostního podílu geneticky modifikovaného materiálu pro konkrétní linii GM (jak je uvedeno na certifikátu). Z toho důvodu lze CRM použít pouze ke stanovení hmotnostního podílu materiálu uvedeného v certifikátu a odpovídající slepý vzorek (nikoliv GM) lze použít pouze na důkaz, že

nebyla překročena mezní hodnota uvedená v certifikátu.

Pro každý CRM GMO jsou v certifikátu uvedeny doporučené podmínky skladování. Výrobce RM neodpovídá za změny, ke kterým dojde během skladování materiálu v prostorách zákazníka, zejména za otevřené vzorky. Pokud se CRM GMO používá vícekrát, je nutné uzavřením láhve bezprostředně po odebrání vzorku minimalizovat absorpci vody z hygroskopických materiálů.

ZPŮSOB KVANTIFIKACE GMO

Ke kvantifikaci obsahu GM ve vzorcích potravin a krmiv se běžně používá kvantitativní polymerázová řetězová reakce (RT-PCR). Touto kvantifikační technikou na bázi DNA se měří poměr transgenní kyseliny deoxyribonukleové (DNA), tj. odvozené od genetické modifikace, a endogenní DNA, která je specifická pro biologický druh.

Materiály CRM GMO uvolněné ze Spojeného výzkumného centra Evropského společenství (JRC) jsou určeny k použití ve spojení s kvantitativní referenční metodou PCR pro konkrétní linii ověřené orgánem EU-RL GMFF. Kvantitativní metody detekce PCR předložené a ověřené v souladu s ustanovením nařízení (ES) č. 1829/2003 jsou přístupné veřejnosti na domovské stránce EU-RL GMFF (<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/StatusOfDossiers.aspx>).

Pokud se CRM používají při screeningových testech, musí uživatel vzít v úvahu, že materiál CRM, který není geneticky modifikovaným organismem (GMO), může u screeningového testu vytvářet pozitivní signály, zatímco u metody pro konkrétní linii je negativní. V důsledku toho je nutné pozitivní screeningové signály interpretovat velmi pečlivě.

Při přípravě CRM pro kvantifikaci GMO se zvláštní péče věnovala zajištění toho, aby byly geneticky modifikovaný prášek a geneticky nemodifikovaný prášek podobné, pokud jde o rozložení velikosti částic. Toto je obzvláště důležité ve vztahu k množství extrahovatelné DNA v obou prášcích.

Různá účinnost extrakce geneticky modifikovaného a geneticky nemodifikovaného prášku by ovlivnila hodnotu koncentrace měřenou RT-PCR. Proto by se měly použít pouze ty metody extrakce, které byly validovány pro splnění uvedeného požadavku. Během certifikace se hmotnostní podíl genetické modifikace ověřuje použitím metody RTPCR specifické pro danou linii. Byla-li pozorována odlišná extrahovatelnost DNA, jsou tyto informace k dispozici. Genetické složení různých částí semen jednoděložných rostlin (např. kukuřičný endosperm, osemení a zárodek kukuřice) se různí a hodnota poměru DNA v celozrnné mouce vyrobené z celých zrn se liší od mouky vyrobené z rafinovaných zrn (obsahujících pouze endosperm). Centrum JRC používá pro své CRM GMO celozrnnou mouku.

Všechny CRM pro kvantifikaci GMO od centra JRC jsou gravimetricky vyráběny za použití čistých geneticky nemodifikovaných i modifikovaných rostlinných materiálů. Jsou certifikovány z hlediska hmotnostního podílu GM podporujícího dodržování prahových hodnot hmotnostního podílu stanovených v odpovídajících právních předpisech EU pro potraviny a krmiva. Většina CRM GMO je určena k použití jako kalibrátor pro měření RT-PCR.

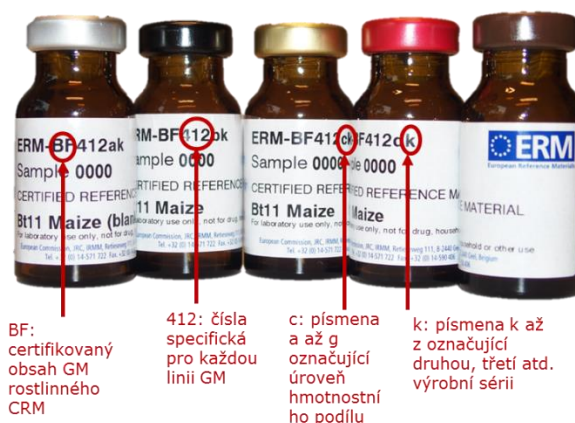
Měřicí systém pro kvantifikaci GMO v právním kontextu EU je stanoven oficiálním CRM stanoveným v rozhodnutí o povolení a metodou měření validovanou orgánem EU-RL, proto není nutné provádět žádnou korekci. Stejně tak se zde nemusí brát v úvahu komutabilita, která je rozhodující vlastností referenčních materiálů, jsou-li použity různé metody měření.

KÓD CRM GMO

Každý CRM GMO má svůj individuální kód, který se skládá z kombinace písmen a číslic. Obecný formát je ERM-BF123xy. Kód „ERM®“ specifikuje značku (ochranná známka pro evropský referenční materiál) a BF určuje, že se jedná o rostlinný CRM certifikovaný z hlediska obsahu GM. Následující tři čísla jsou specifická pro každou konkrétní linii. x je malé písmeno v rozmezí od a do g a uvádí se za kódem linie k označení úrovně hmotnostního podílu (např. ERM-BF412a = jmenovitá 0 g/kg, ERM-BF412b = jmenovitá 1000 g/kg, ERM-BF412c = jmenovitá 1 g/kg, ERM-BF412d = 10 g/kg, jmenovitá ERM-BF412e = 100 g/kg). Y je malé písmeno v rozmezí od k do z a označuje druhou, třetí atd. výrobní sérii CRM. První výrobní série se dodává bez tohoto dodatečného písmene y. Ve většině případů se vyrábí pět různých koncentračních úrovní na sadu: jmenovitá 0 a 100% a směsi 0,1, 1, 10 (m/m)%. K usnadnění

identifikace různých úrovní hmotnostních podílů se používají barevně značené uzávěry: jmenovitá 0 g/kg = stříbrný, jmenovitá 1000 g/kg = černý, jmenovitá 1 g/kg = zlatý, jmenovitá 10 g/kg = červený, jmenovitá 100 g/kg = hnědý.

Každá výrobní série CRM byla zpracována s použitím různých rostlinných materiálů (např. šarží osiva). Rozložení velikosti částic se navíc může lišit i přes veškeré úsilí o udržení stálosti mezi starší a novější sérií. Kalibrační linie vytvořené s jakoukoli novou sérií CRM se proto mohou lišit od kalibračních linií vytvořených se starou sérií a při prvním použití CRM z nové série by se měl zahájit nový přehled kontroly kvality. Stejně tak se doporučuje tato změna z používání staré série na novou u všech aplikací, včetně kalibrace a kontroly kvality. Z důvodů sledovatelnosti by se měl vždy specifikovat konkrétní CRM použitý ke kalibraci.



Obrázek 1: Sada CRM GMO

ZVLÁŠTNÍ CERTIFIKAČNÍ ASPEKTY

U většiny CRM GMO je k dispozici také čistý geneticky nemodifikovaný prášek, jakož i čistý prášek GMO. Geneticky nemodifikovaný prášek je certifikován s tím, že obsahuje „méně než“ daný hmotnostní podíl GMO na základě mezní hodnoty detekce (LOD) u metody použité pro charakterizaci. Čistý GMO prášek je certifikován s tím, že obsahuje „více než“ daný hmotnostní podíl na základě počtu testovaných semen a statistického vyhodnocení. Při kalibraci musí laboratoř zajistit použití certifikovaných hodnot (viz příklad).

Několik CRM GMO je certifikováno z hlediska identity (např. ERM-BF421b). Takové CRM jsou určeny k použití jako vzorky pozitivní kontroly, např. při screeningových cvičeních. Měly by se využívat k potvrzení přítomnosti (nebo

nepřítomnosti) konkrétního případu GMO, nejsou však vhodné ke kvantifikaci GMO.

Některé CRM GMO byly certifikovány s asymetrickým rozsahem nejistoty. Pokud se takový CRM použije k regulaci zkreslení (viz poznámka k aplikaci 1 ERM), je nutné použít „kladnou nejistotu“ v případě, že průměrný výsledek měření překročí certifikovanou hodnotu, a naopak „zápornou nejistotu“ v případě, že průměrný výsledek měření je nižší než certifikovaná hodnota.

U několika CRM GMO specifické úrovně koncentrace proběhla certifikace (kromě hmotnostního podílu GM) z hlediska jejich poměru počtu kopií DNA GM (např. ERM-BF413e, ERM-BF415e, ERM-BF425c, ERM-BF427c) a byl zajištěn odpovídající kalibrátor na bázi plazmidu (např. ERM-AD413, ERM-AD415, ERM-AD425, ERM-AD427). V případě použití k testování souladu s právními předpisy v EU musí být výsledky měření převedeny z poměru počtu kopií DNA na hmotnostní podíl. Podotýkáme, že orgán GMFF EU-RL poskytuje za tímto účelem zavedené převodní faktory.

PŘÍKLAD POUŽITÍ ČISTÝCH CRM GMO A SOUVISEJÍCÍCH NEJISTOT

V analytických certifikátech pro ERM-BF412ak a ERM-BF412bk lze nalézt následující informace (<https://crm.jrc.ec.europa.eu/>):

	Hmotnostní podíl kukuřice ¹⁾	
	Certifikovaná hodnota [g/kg]	Nejistota [g/kg] ⁴⁾
ERM-BF412ak	< 0,12 ²⁾	-
ERM-BF412bk	> 970 ³⁾	-

1) Geneticky modifikovaná kukuřice s jedinečným identifikátorem SYN-BTØ11-1.

2) Certifikovaný referenční materiál byl vyroben z konvenčních nemodifikovaných semen kukuřice. Při použití testu kvantitativní polymerázové řetězové reakce se zaměřením na linii kukuřice Bt11 nebyla v tomto materiálu detekována žádná kontaminace. Mezní hodnota detekce (LOD) byla 0,12 g/kg. Při 95% spolehlivosti je skutečný hmotnostní podíl kukuřice Bt11 nižší než 0,12 g/kg. Certifikovaná hodnota je dohledatelná v souladu s Mezinárodním systémem jednotek (SI).

Tento certifikovaný referenční materiál byl vyroben z geneticky modifikovaných semen kukuřice Bt11. Certifikovaná hodnota vychází z genetické čistoty kukuřičného prášku s ohledem na kukuřici Bt11. Celkem bylo na přítomnost kukuřice Bt11 jednotlivě testováno 209 semen, z čehož 207 semen mělo pozitivní výsledek. Při 95% spolehlivosti je skutečný hmotnostní podíl kukuřice Bt11 vyšší než 970 g/kg. Certifikovaná hodnota je dohledatelná v souladu s Mezinárodním systémem jednotek (SI).

4) Uvedená nejistota je rozšířenou nejistotou s koeficientem pokrytí $k = 2$, který odpovídá hladině spolehlivosti přibližně 95%, odhadnutou v souladu s normou/dokumentem ISO/IEC Guide 98-3, *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement* (GUM:1995), ISO, 2008.

Na základě výše uvedených informací lze dojít k závěru, že CRM ERM-BF412ak je certifikován tak, aby obsahoval <0,12 g Bt11/kg, a že v práškovém materiálu nebyla detekována žádná kontaminace. Při 95% spolehlivosti je skutečný hmotnostní podíl kukuřice Bt11 nižší než 0,12 g/kg. Pro další výpočty by se při stanovení kalibrační křivky pro tento GM měla použít odhadovaná genetická čistota 990 g/kg.

Materiál CRM ERM-BF412bk byl certifikován z hlediska obsahu >970 g/kg. Z celkového počtu 209 testovaných semen bylo 207 shledáno pozitivními na přítomnost linie kukuřice Bt11. Při 95% spolehlivosti je skutečný hmotnostní podíl kukuřice Bt11 vyšší než 970 g/kg. Pro další výpočty by se při stanovení kalibrační křivky pro tento GM měla použít odhadovaná genetická čistota 990 g/kg. U certifikovaného referenčního materiálu pro GMO ve formě čistého prášku, kde nebyla zjištěna žádná kontaminace, by se měla použít hodnota 1000 g/kg.

Ve všech případech se nejistota, která se má použít, vypočítá na základě rozdílu mezi číselnou hodnotou a danou mezní hodnotou děleno $\sqrt{3}$. Například:

ERM-BF412ak: Použitá hodnota je 0,0 g/kg; Nejistota je $0,12 \text{ g/kg} - 0 \text{ g/kg} / \sqrt{3} = 0,07 \text{ g/kg}$

ERM-BF412bk: Použitá hodnota, vycházející z genetické čistoty, je $207/209 \times 1000 = 990 \text{ g/kg}$. „Záporná nejistota“ je $990-970 / \sqrt{3} = 11,5 \text{ g/kg}$. „Kladná nejistota“ je 10 g/kg, neboť možný obsah GM nesmí překročit 1 000 g/kg.