

## Sertifikuotų etaloninių medžiagų naudojimas GMO kiekybiniam įvertinimui maiste ir pašaruose

2006 m. rugsėjo mėn.

Naujausia versija: 2019 m. rugpjūčio mėn.

Autorius: Stefanie Trapmann

Europos Komisija – Jungtinių tyrimų centras  
Retieseweg 111, 2440 Geel, Belgium

El. paštas: stefanie.trapmann@ec.europa.eu

*Šioje pastaboje dėl taikymo pateikiama informacija ir rekomendacijos, kaip tinkamai naudoti JTC etalonines medžiagas su sertifikuota konkreto genetinio modifikavimo įvykio genetiškai modifikuotos (GM) masės dalimi. Jame paaiškinama, kaip ES kontekste nustatoma GMO kiekybinio įvertinimo matavimo sistema.*

### IVADAS

ES genetiškai modifikuotiems organizmams (GMO) turi būti suteiktas leidimas, prieš leidžiant jais prekiauti Europos rinkoje. Pagal Reglamentą (EB) Nr. 1830/2003 reikalaujama, kad visi maisto produktai ir pašarai, kuriuose yra daugiau nei 0,9 % GMO, būtų ženklinami. Pagal Reglamentą (ES) Nr. 619/2011 pašaruose gali būti 0,1 (m/m) % GMO, dėl kurių atliekama leidimo suteikimo procedūra arba kurių leidimas baigė galioti. Siekiant įgyvendinti ES teisės aktus, reikia patikimai kiekybiškai įvertinti GMO kiekį maiste ir pašaruose. Todėl EB sprendime dėl leidimo suteikimo kiekvienam GMO nurodomas aptikimo metodas ir sertifikuota etaloninė medžiaga (SEM), naudota nustatant matavimo sistemą kiekybiniam įvertinimui. Oficiali SEM naudojama kalibruojant konkreto įvykio PGR etalono metodą, patvirtintą Europos etaloninės genetiškai modifikuoto maisto ir pašarų laboratorijos (ES-RL GMFF).

### GMO SEM SAVYBĖS

Sertifikuotos visų GMO SEM vertės, pateiktos JTC, yra pagrįstos džiovinta genetiškai modifikuotų augalų medžiaga (dažniausiai sėklų milteliais) ir (arba) džiovinta genetiškai nemodifikuotų augalų medžiaga. SEM, kuriems reikia maišyti genetiškai modifikuotą ir genetiškai nemodifikuotą medžiagą, masė koreguojama pagal vandens kiekį joje ir grynumo sertifikavimo metu įvertį. GM masės dalis skaičiuojama kaip:

*koreguota GM masė*

*koreguota GM masė + koreguota ne GM masė*

Kiekviena GMO SEM sertifikuojama konkreto genetinio modifikavimo įvykio (nurodyto sertifikate) masės daliai. SEM galima naudoti tik kiekybiškai įvertinant šį įvykį ir atitinkamą pradinę medžiagą (ne GM medžiagą) galima naudoti tik įrodant šio įvykio nebuvimą žemiau sertifikate nurodytos ribos.

Rekomenduojamos laikymo sąlygos kiekvienai GMO SEM nurodytos sertifikate. EM gamintojas negali būti laikomas atsakingu už pokyčius, įvykusius laikant medžiagą kliento patalpose, ypač

atidarytų mėginių. Jei GMO SEM naudojama kelis kartus, reikia sumažinti higroskopinių medžiagų vandens sugėrimą, užkemšant buteliuką iš karto paėmus mėginį.

### GMO KIEKYBINIO ĮVERTINIMO METODAS

Kiekybinė polimerazės grandinės reakcija (kPGR) dažnai naudojama kiekybiškai įvertinti GM turinį maisto ir pašarų mėginiuose. Taikant šį DNR pagrįstą kiekybinio įvertinimo metodą, matuojamas santykis tarp transgeninės, t. y. genetinės modifikacijos būdų gautos, dezoksiribonukleino rūgšties (DNR) ir endogeninės DNR, kuri yra būdina biologinei rūšiai.

JTC pateiktos GMO SEM skirtos naudoti kartu su konkreto įvykio kiekybinio PGR etaloniniu metodu, patvirtintu ES-RL GMFF. Kiekybiniai PGR aptikimo metodai, pateikti ir patvirtinti pagal Reglamento (EB) Nr. 1829/2003 nuostatas, pasiekiami visuomenei pagrindiniame ES-RL GMFF puslapyje (<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/StatusOfDossiers.aspx>). Jei SEM naudojami atrankinės patikros tyrimams, naudotojas turi atsižvelgti, kad ne GMO SEM gali sukurti teigiamus signalus atrankinės patikros tyrimo metu, nors jie yra tikrai neigiami konkreto įvykio metodui. Todėl teigiamus atrankinės patikros signalus reikia interpretuoti atsargiai.

Ruošiant GMO SEM taikomas ypatingas dėmesys, siekiant užtikrinti, kad GM ir ne GM milteliai būtų panašūs dalelių dydžių pasiskirstymo atžvilgiu. Tai itin svarbu, nes išgaunamos DNR kiekis koreliuoja su dalelių dydžiu. Skirtingas DNR išgavimo iš GM ir ne GM efektyvumas turėtų įtakos GM kiekiui, matuojamam kPGR. Be to, galima naudoti tik DNR išgavimo metodus, patvirtintus dėl GMO kiekybinio įvertinimo reikalavimų atitikties ir kurių veiksmingumas su skirtingomis tos pačios rūšies veislėmis yra įrodytas. Sertifikuojant SEM GM masės dalies išgavimas patikrinamas naudojant konkreto įvykio kPGR metodą. Jei nustatomas skirtingas DNR išgaunamumas, ši informacija yra pateikiama.

Genetinė skirtingų vienaskilčių sėklų dalių (pvz., kukurūzo endospermo, sėklos luobelės ir gemalo) sudėtis skiriasi ir viso grūdo miltų DNR santykio vertė skiriasi nuo sijotų miltų (sudarytų tik iš endospermo). JTC naudoja viso grūdo miltus GMO SEM.

Visos JTC pateiktos GMO SEM yra gravimetriškai pagamintos naudojant gryną ne GM ir GM augalinę medžiagą. Jos sertifikuotos GM masės daliai, palaikančiai atitinkamuose maistui ir pašarams taikomuose ES teisės aktuose nustatytą masės dalies ribinių verčių įgyvendinimą. Didžioji dalis GMO SEM skirtos naudoti kaip kalibravimo priemonės kPGR matavimui.

GMO kiekybinio įvertinimo ES teisiniame kontekste matavimo sistema yra nustatyta pagal oficialią SEM, nurodytą sprendime suteikti leidimą, ir ES-RL patvirtintą matavimo metodą, todėl nereikia taikyti jokių korekcijų. Analogiškai, čia nereikia atsižvelgti į pakeičiamumą, kuris yra esminė charakteristika etaloninėms medžiagoms, jei taikomi skirtingi matavimo metodai.

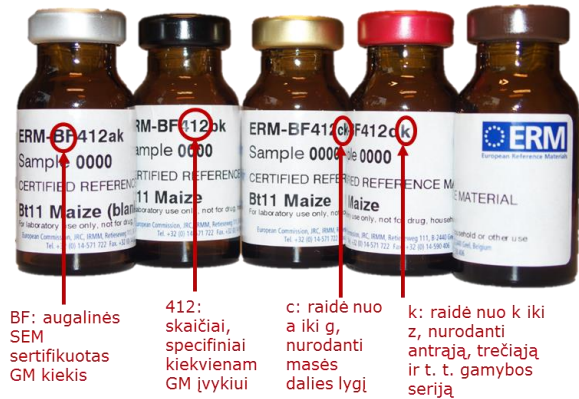
### GMO SEM KODAS

Kiekviena GMO SEM turi atskirą kodą, sudarytą iš raidžių ir skaičių kombinacijos. Bendrasis formatas yra ERM-BF123xy. „ERM“ nurodo prekės ženklą (saugomą prekės ženklą, reiškiantį „European Reference Material“ – Europos etaloninė medžiaga), o BF nurodo, kad tai yra augalinė SEM, sertifikuota dėl GM turinio. Toliau esantys trys skaičiai yra specifiniai kiekvienam konkrečiam įvykiui. x yra mažoji raidė nuo a iki g, įrašoma po įvykio kodo ir nurodanti masės dalies lygį (t. y. ERM-BF412a = nominalas 0 g/kg, ERM-BF412b = nominalas 1000 g/kg, ERM-BF412c = nominalas 1 g/kg, ERM-BF412d = nominalas 10 g/kg, ERM-BF412e = nominalas 100 g/kg). y yra mažoji raidė nuo k iki z ir nurodo antrąją, trečiąją ir t. t. SEM gamybos seriją. Pirmoji gamybos serija yra be šios papildomos raidės y.

Dageliu atveju rinkinyje gaminami du skirtingi koncentracijos lygiai: nominalus 0 ir 100 % bei mišiniai – 0,1, 1, 10 (m/m) %. Kad būtų lengviau atskirti skirtingus masės dalies lygius, naudojami spalvomis pažymėti dangteliai: nominalas 0 g/kg = sidabrinis, nominalas 1000 g/kg = juodas, nominalas 1 g/kg = auksinis, nominalas 10 g/kg = raudonas, nominalas 100 g/kg = rudas.

Kiekviena SEM gamybos serija apdorota naudojant skirtingas augalines medžiagas (pvz., sėklų partijas). Be to, dalelių dydžių pasiskirstymas gali skirtis, nepaisant visų pastangų išlaikyti jį pastovų tarp senesnių ir naujesnių serijų. Todėl kalibravimo linijos nustatytos su bet kokia nauja SEM serija, gali skirtis nuo kalibravimo linijų, nustatytų su sena serija, ir kai pirmą kartą panaudojama naujos serijos SEM, reikia pradėti naują kokybės kontrolės lentelę. Taip pat

rekomenduojama visiems taikymams, įskaitant kalibravimą ir kokybės kontrolę, pereiti nuo senos serijos prie naujosios. Dėl atsekamumo visada reikia naudoti konkrečią kalibravimui naudotą SEM.



1 pav.: GMO SEM rinkinys

### SPECIFINIAI SERTIFIKAVIMO ASPEKTAI

Taip pat yra daugelio GMO SEM grynė GMO milteliai ir gryni GMO milteliai. Ne GMO yra sertifikuoti, kad juose yra „mažiau nei“ nurodyta masės dalis GMO, remiantis charakterizavimui naudojamo metodo aptikimo riba (AR). Gryni GMO milteliai yra sertifikuoti, kad juose yra „daugiau nei“ nurodyta masės dalis, remiantis tirtų sėklų skaičiumi ir statistiniu įverčiu. Naudojama kalibravimui, laboratorija turi naudoti sertifikuotas vertes (žr. pavyzdį).

Kai kurios GMO SEM yra sertifikuotos dėl jų tapatybės (t. y. ERM-BF421b). Tokios SEM skirtos naudoti kaip teigiami kontroliniai mėginiai, pvz., atrankai. Juos reikia naudoti, norint patvirtinti konkretaus GMO įvykio buvimą arba nebuvimą, bet jie nėra tinkami kiekybiniam GMO įvertinimui.

Kai kurios GMO SEM sertifikuotos su asimetriniu neapibrėžtumo diapazonu. Jei tokia SEM naudojama tendencingumo kontrolei (žr. 1 SEM pastabą dėl taikymo), reikia naudoti „teigiamą neapibrėžtumą“, jei vidutinis matavimo rezultatas viršija sertifikuotą vertę, ir „neigiamą neapibrėžtumą“, jei vidutinis matavimo rezultatas yra mažesnis nei sertifikuota vertė.

Kai kurių GMO SEM sertifikuota ne tik GM masės dalis, bet ir konkretus jų GM DNR kopijų skaičiaus santykio (t. y. ERM-BF413e, ERM-BF415e, ERM-BF425c, ERM-BF427c) koncentracijos lygis, ir pateikta atitinkama kalibravimo medžiaga plazmidžių pagrindu (t. y. ERM-AD413, ERM-AD415, ERM-AD425, ERM-AD427). Jei naudojama teisinės atitikties bandymui ES, matavimo rezultatus reikia konvertuoti iš DNR kopijų skaičiaus santykio į masės dalį. Atkreipkite dėmesį, kad ES-RL GMFF pateikia šiam tikslui nustatytus konvertavimo koeficientus.

## GRYNŲ GMO SEM IR JŲ NEAPIBRĖŽTUMŲ NAUDOJIMO PAVYZDYS

Toliau pateiktą informaciją galima rasti ERM-BF412ak ir ERM-BF412bk analizės sertifikatuose (<https://crm.jrc.ec.europa.eu/>):

	Bt11 kukurūzų masės dalis <sup>1)</sup>	
	Sertifikuota vertė [g/kg]	Neapibrėžtumas [g/kg] <sup>4)</sup>
ERM-BF412ak	< 0,12 <sup>2)</sup>	-
ERM-BF412bk	> 970 <sup>3)</sup>	-

1) Genetiškai modifikuoti kukurūzai, kurių unikalus identifikatorius yra SYN-BTØ11-1.

2) Sertifikuota etaloninė medžiaga pateikta iš įprastų, nemodifikuotų kukurūzų sėklų. Naudojant konkretaus įvykio kiekybinį polimerazės grandinės reakcijos tyrimą, skirtą kukurūzo Bt11 įvykiui, teršalų šioje medžiagoje nerasta. Aptikimo riba (AR) buvo 0,12 g/kg. Su 95 % tikimybe kukurūzų Bt11 masės dalis medžiagoje yra mažesnė nei 0,12 g/kg. Sertifikuota vertė atsekama pagal tarptautinę matų sistemą (SI).

3) Ši sertifikuota etaloninė medžiaga pagaminta iš genetiškai modifikuotų kukurūzų Bt11 sėklų. Sertifikuota vertė pagrįsta kukurūzų Bt11 miltelių genetiniu grynumu. Iš viso 209 sėklos buvo atskirai patikrintos, ar yra kukurūzų Bt11 įvykis, 207 iš jų rezultatas buvo teigiamas. Su 95 % tikimybe kukurūzų Bt11 masės dalis medžiagoje yra didesnė nei 970 g/kg. Sertifikuota vertė atsekama pagal tarptautinę matų sistemą (SI).

4) Neapibrėžtumas yra išplėstinis neapibrėžtumas, kurio aprėpties koeficientas  $k = 2$  atitinka maždaug 95 % pasikliautinąjį lygį, įvertintą pagal „ISO/IEC Guide 98-3, Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement“ (ISO/IEC vadovas 98-3, neapibrėžtumo išreiškimo matavimuose vadovas, GUM:1995), ISO, 2008.

Remiantis aukščiau pateikta informacija, galima daryti išvadą, kad SEM ERM-BF412ak sertifikuota, kad joje yra < 0,12 g Bt11/kg ir kad miltelių pavidalo medžiagoje teršalų neaptikta. Su 95 % tikimybe kukurūzų Bt11 masės dalis medžiagoje yra mažesnė nei 0,12 g/kg. Todėl tolesniems skaičiavimams, įskaitant kalibravimo kreivių nustatymą, reikia naudoti 0 g/kg vertę.

SEM ERM-BF412bk sertifikuota, kad joje yra > 970 g/kg. 207 iš 209 tirtų sėklų rastas kukurūzų Bt11 įvykis. Su 95 % tikimybe kukurūzų Bt11 masės dalis medžiagoje yra didesnė nei 970 g/kg. Tolesniuose skaičiavimuose, nustatant šio GM kalibravimo kreivę, reikia naudoti genetinio grynumo įvertį 990 g/kg. Atkreipkite dėmesį, kad grynų GMO miltelių SEM, kuriose nerasta teršalų, reikia naudoti 1000 g/kg.

Visais atvejais naudojamas neapibrėžtumas apskaičiuojamas pagal intervalą tarp skaitinės vertės ir pateiktos ribos, padalytos iš  $\sqrt{3}$ . Pavyzdžiui:

ERM-BF412ak: naudojama vertė yra 0,0 g/kg; neapibrėžtumas yra  $(0,12 \text{ g/kg} - 0 \text{ g/kg}) / \sqrt{3} = 0,07 \text{ g/kg}$

ERM-BF412bk: naudojama vertė, remiantis genetiniu grynumu, yra  $207 / 209 * 1000 = 990 \text{ g/kg}$ . „Neigiamas neapibrėžtumas“ yra  $(990-970) / \sqrt{3} = 11,5 \text{ g/kg}$ . „Teigiamas neapibrėžtumas“ yra 10 g/kg, nes įmanomas GM kiekis negali viršyti 1000 g/kg.