

Uporaba certificiranih referenčnih materialov za količinsko opredelitev GSO v hrani in krmi

Ta opomba o programu vsebuje informacije in napotke o pravilni uporabi referenčnih materialov Skupnega raziskovalnega središča, ki so certificirani za genetsko spremenjeni masni delež določenega dogodka, ki vključuje genetsko spremembo. Pojasnjuje, kako je zastavljen sistem meritev za količinsko opredelitev GSO v okviru EU.

Avtor: Stefanie Trapmann

Evropska komisija – Skupno raziskovalno središče

Retieseweg 111, 2440 Geel, Belgija

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

UVOD

Genetsko spremenjeni organizmi (GSO) morajo biti v EU najprej odobreni, preden jih je mogoče postaviti na evropski trg. Uredba (ES) št. 1830/2003 zahteva označevanje živil in krme, ki vsebujejo več kot 0,9 % GSO. V skladu z Uredbo (EU) št. 619/2011 sme krma vsebovati 0,1 (m/m) % GSO, za katerega je postopek odobritve v teku ali pa je dovoljenje za njegovo uporabo v EU poteklo. Za izvajanje zakonodaje EU je treba izvajati zanesljivo količinsko opredelitev GSO v živilih/krmi. Zato odločba o odobritvi posameznega GSO, ki jo izda ES, določa način odkrivanja in certificirani referenčni material (CRM), ki omogoča vzpostavitev merilnega sistema za količinsko opredelitev. Uradni CRM uporabljamo za umerjanje kvantitativne referenčne metode PCR za posamezne dogodke, ki hi je potrdil Evropski referenčni laboratorij za genetsko spremenjeno hrano in krmo (EU-RL GMFF).

LASTNOSTI CRM ZA GSO

Potrjene vrednosti Skupnega raziskovalnega središča za vse CRM za GSO temeljijo na masi posušenega genetsko spremenjenega rastlinskega materiala (v večini primerov semenskega prahu) in/ali posušenega genetsko nespremenjenega rastlinskega materiala. Pri CRM, pri katerih je potrebno mešanje genetsko spremenjenih in genetsko nespremenjenih materialov, se mase popravijo za vsebnost vode in ocenjeno čistost med postopkom certifikacije. Masni delež GS se izračuna kot:

popravljen masa GS

popravljen masa GS + popravljen masa genetsko nespremenjenega materiala

Vsak CRM za GSO je certificiran za masni delež določenega dogodka GS (kot je navedeno na certifikatu). CRM je dovoljeno uporabiti le za količinsko opredelitev tega dogodka, ustreznimi prazni material (genetsko nespremenjeni material) pa je dovoljeno uporabiti le za dokazovanje odsotnosti tega dogodka pod pragom, navedenim v certifikatu.

Priporočeni pogoji za skladiščenje vsakega CRM za GSO so navedeni na certifikatu. Proizvajalec RM ne more biti odgovoren za spremembe, do katerih pride med skladiščenjem materiala v prostorih stranke, zlasti pri odprtih vzorcih. Če je CRM za GSO uporabljen večkrat, je treba pri higroskopskih materialih zmanjšati vpijanje vode, tako da steklenico zapremo takoj po odvzemu vzorca.

METODA KOLIČINSKE OPREDELITVE GSO

Za količinsko opredelitev vsebnosti GM v vzorcih hrane in krme običajno uporabljamo kvantitativno polimerazno verižno reakcijo (qPCR). Ta metoda količinske opredelitve na podlagi DNK meri razmerje med transgeno deoksiribonukleinsko kislino (DNK), tj. pridobljeno iz genske spremembe, in endogeno DNK, ki je značilna za biološko vrsto.

CRM za GSO, ki jih je izdalo Skupno raziskovalno središče, so namenjeni za uporabo s kvantitativno referenčno metodo PCR za posamezne dogodke, ki jo je potrdil EU-RL GMFF. Kvantitativne metode odkrivanja PCR, predložene in potrjene v skladu z Uredbo (ES) št. 1829/2003, so javnosti dostopne na domači strani EU-RL GMFF (<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/StatusOfDossiers.aspx>). Če se CRM uporabljajo pri presejalnih testih, mora uporabnik upoštevati, da lahko CRM za genetsko nespremenjeni organizem s presejalnim testom ustvari pozitivne signale, čeprav obstajajo resnični negativni rezultati iz metode za posamezni dogodek. Zato je treba pozitivne presejalne signale razlagati previdno.

Med pripravo CRM za GSO je potrebna posebna pozornost pri zagotavljanju, da so si genetsko spremenjeni in genetsko nespremenjeni praški podobni glede na porazdelitev velikosti delcev. To je še posebej pomembno, saj je količina DNK, ki jo je mogoče pridobiti, povezana z velikostjo delcev. Različne stopnje učinkovitosti pridobivanja DNK iz genetsko spremenjenih in genetsko nespremenjenih praškov lahko vpliva na vsebnost GS, izmerjeno s qPCR. Poleg tega je treba uporabiti samo metode pridobivanja DNK, ki potrjeno izpolnjujejo zahteve za količinsko

opredelitev GSO in ki so dokazano uporabne pri različnih sortah iste vrste. Pri certifikaciji z metodo qPCR za posamezni dogodek preverijo masni delež GS. Če opazijo razliko v pridobivanju DNK, je ta informacija vključena v certifikat.

Genska sestava različnih delov semen monokotiledonov (npr. koruzni endosperm, semenski plašč in kalček) se razlikuje, vrednost razmerja DNK v polnozrnatih moki iz celega zrnja pa se razlikuje od moke, proizvedene iz rafiniranega zrnja (ki vsebuje samo endosperm). Skupno raziskovalno središče za svoje CRM za GSO uporablja moko iz celega zrnja.

Vsi CRM za GSO iz Skupnega raziskovalnega središča so gravimetrično proizvedeni z uporabo čistih rastlinskih gensko spremenjenih in gensko nespremenjenih materialov. Certificirani so za masni delež GS, ki podpira uporabo pragov masnega deleža, določenih v ustrezni zakonodaji EU za hrano in krmo. Večina CRM za GSO je namenjena uporabi kot kalibranti za meritve qPCR.

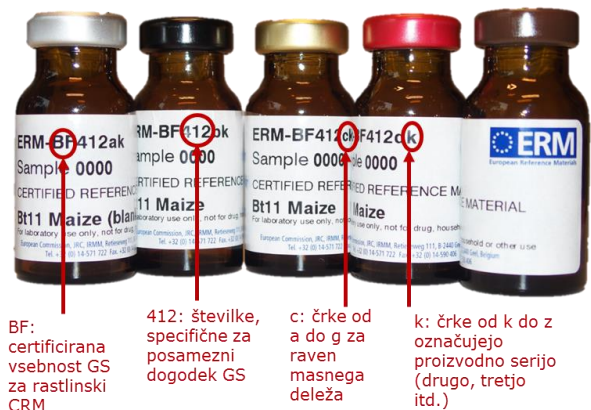
Merilni sistem za količinsko opredelitev GSO v pravnem okviru EU vzpostavi uradni CRM, opredeljen v odločbi o odobritvi, in potrjeno merilno metodo EU-RL, zato popravki niso potrebni. Tudi tukaj ni treba upoštevati zamenljivosti, ki je za referenčne materiale ključna značilnost, če uporabimo druge metode merjenja.

OZNAKA KODA CRM ZA GSO

Vsak CRM za GSO ima lastno oznako, ki je sestavljena iz kombinacije črk in števil. Splošna oblika zapisa je ERM-BF123xy. »ERM®« opredeljuje blagovno znamko (zaščitena blagovna znamka evropskega referenčnega materiala), BF pa pomeni, da ima ta rastlina certifikat CRM za vsebnost GS. Naslednje tri številke so specifične za vsak posamezen dogodek. Spremenljivka x pomeni majhno črko od a do g, ki je dodana za oznako dogodka in pomeni raven masnega deleža (tj. ERM-BF412a = nazivna vrednost 0 g/kg, ERM-BF412b = nazivna vrednost 1000 g/kg, ERM-BF412c = nazivna vrednost 1 g/kg, ERM-BF412d = nazivna vrednost 10 g/kg, ERM-BF412e = nazivna vrednost 100 g/kg). Spremenljivka y je majhna črka od k do z, ki označuje drugo, tretjo itd. proizvodno serijo CRM. Prva proizvodna serija ne vsebuje te dodatne črke y.

V večini primerov je v nizu proizvedenih pet različnih ravni koncentracije: nazivni vrednosti 0 in 100 % in mešanice 0,1, 1, 10 (m/m) %. Za lažje prepoznavanje različnih masnih deležev se uporabljajo barvni pokrovčki: nazivna vrednost 0 g/kg = srebrni, nazivna vrednost 1000 g/kg = črni, nazivna vrednost 1 g/kg = zlati, nazivna vrednost 10 g/kg = rdeči, nazivna vrednost 100 g/kg = rjavi.

Vsaka serija CRM je bila obdelana z različnimi rastlinskimi materiali (npr. serijami semen). Poleg tega se lahko porazdelitev velikosti delcev razlikuje kljub vsem prizadevanjem, da bi bila konstantna pri starejših in novejših serijah. Zato je mogoče, da se umeritvene črte, opredeljene za nove serije CRM, razlikujejo od tistih za stare serije, ob prvi uporabi CRM iz nove serije pa je treba začeti novo kontrolno karto. Prav tako jo je priporočljivo spremeniti za vse namene, vključno z umerjanjem in nadzorom kakovosti, in namesto starih začeti uporabljati nove serije. Zaradi sledljivosti je treba vedno opredeliti CRM, ki se uporablja za umerjanje.



Slika 1: nabor CRM za GSO

POSEBNI VIDIKI CERTIFIKACIJE

Za večino CRM za GSO je na voljo tudi čisti prašek gensko nespremenjenih organizmov in čisti prašek gensko spremenjenih organizmov. Certifikat za gensko nespremenjene organizme vsebuje masni delež GSO, »manjši od« danega, na podlagi meje zaznavnosti (LOD) metode, uporabljene za opisovanje. Čisti prašek GSO je certificiran za vsebnost masnega deleža, »večjega od« danega, glede na število testiranih semen in statistično vrednotenje. Laboratorij mora pri uporabi za umerjanje poskrbeti za uporabo certificiranih vrednosti (glejte primer).

Nekaj CRM za GSO je certificiranih glede identitete (tj. ERM-BF421b). Takšni CRM so namenjeni uporabi kot pozitivni kontrolni vzorci v npr. presejalnih vajah. Uporabiti jih je treba za potrditev prisotnosti (ali odsotnosti) določenega dogodka GSO, niso pa primerni za količinsko opredelitev GSO.

Nekateri CRM za GSO so certificirani z asimetričnim razponom negotovosti. Če tak CRM

uporabimo za nadzor pristranskosti (glejte opombo o programu ERM 1), je treba v primeru, da povprečni rezultat meritev presega potrjeno vrednost, uporabiti »pozitivno vrednost negotovosti« in »negativno vrednost negotovosti«, če je povprečni rezultat meritev nižji od certificirane vrednosti.

Certificiranih je bilo nekaj CRM za GSO za specifične ravni koncentracije dodatno k

masnemu deležu GS, za njihovo razmerje števila kopije DNK za GS (tj. ERM-BF413e, ERM-BF415e, ERM-BF425c, ERM-BF427c), poleg tega je bil na voljo ustrezni kalibrant na osnovi plazmida (tj. ERM-AD413, ERM-AD415, ERM-AD425, ERM-AD427). Pri uporabi za preskušanje skladnosti v okviru EU je treba rezultate meritev pretvoriti iz razmerij števila kopije DNK v masne deleže. Upoštevajte, da EU-RL GMFF v ta namen zagotavlja uveljavljene pretvorbene faktorje.

PRIMER UPORABE ČISTIH CRM ZA GSMO IN NJIHOVIH VREDNOSTI ZA NEGOTOVOST

Naslednje informacije najdete v certifikatih o analizah za ERM-BF412ak in ERM-BF412bk (<https://crm.jrc.ec.europa.eu/>):

	Masni delež koruze Bt11 ¹⁾	
	Certificirana vrednost [g/kg]	Negotovost [g/kg] ⁴⁾
ERM-BF412ak	< 0,12 ²⁾	-
ERM-BF412bk	> 970 ³⁾	-

1) Gensko spremenjena koruza z edinstvenim identifikatorjem SYN-BTØ11-1.

2) Certificirani referenčni material je pridobljen iz običajnih nespremenjenih semen koruze. Pri uporabi tega kvantitativnega testa polimerazne verižne reakcije za posamezni dogodek, ki cilja dogodek pri koruzi Bt11, onesnaženje v tem materialu ni bilo zaznано. Meja zaznave (LOD) je bila 0,12 g/kg. Pravi masni delež koruze Bt11 s 95 % zaupanjem je nižji od 0,12 g/kg. Potrjena vrednost je sledljiva po mednarodnem sistemu enot (SI).

3) Ta certificirani referenčni material je bil pripravljen iz gensko spremenjenih semen koruze Bt11. Certificirana vrednost temelji na genski čistosti koruznega praška glede na koruzo Bt11. Skupaj 209 semen je bilo posamično testiranih za prisotnost dogodka koruze Bt11, od tega je bil rezultat pozitiven pri 207. Pravi masni delež koruze Bt11 s 95 % zaupanjem je višji od 970 g/kg. Potrjena vrednost je sledljiva po mednarodnem sistemu enot (SI).

4) Negotovost je razširjena merilna negotovost s količnikom zajetja $k = 2$, ki ustreza stopnji zaupanja približno 95 %, ocenjena po Navodilih 98-3 ISO/IEC z naslovom Navodila ISO o izražanju negotovosti pri merjenju (GUM:1995), ISO, 2008.

Na podlagi navedenih informacij je mogoče sklepati, da je CRM ERM-BF412ak certificiran za vsebnost < 0,12 g Bt11/kg in da v materialu praška ni bilo zaznано nikakršno onesnaženje. Pravi masni delež koruze Bt11 s 95 % zaupanjem je nižji od 0,12 g/kg. Zato je treba v nadaljnjih izračunih, vključno s postavitvijo umeritvenih krivulj, uporabiti vrednost 0 g/kg.

CRM ERM-BF412bk je certificiran za vsebnost > 970 g/kg. Pri 207 od 209 testiranih semen je bilo pozitivnih glede prisotnost dogodka koruze Bt11. Pravi masni delež koruze Bt11 s 95 % zaupanjem je višji od 970 g/kg. Za nadaljnje izračune je treba pri postavljanju umeritvene krivulje za to GS uporabiti ocenjeno genetsko čistost 990 g/kg. Upoštevajte, da je treba pri CRM za čisti prašek GSO, v katerem ni bilo zaznanega onesnaženja, uporabiti vrednost 1000 g/kg.

V vseh primerih je treba uporabljeno vrednost negotovosti izračunati z intervalom med številsko vrednostjo in dano mejno vrednostjo, deljeno s $\sqrt{3}$. Na primer:

ERM-BF412ak: Uporabljena vrednost je 0,0 g/kg; negotovost je $0,12 \text{ g/kg} - 0 \text{ g/kg} / \sqrt{3} = 0,07 \text{ g/kg}$

ERM-BF412bk: Uporabljena vrednost na podlagi genske čistosti je $207 / 209 * 1000 = 990 \text{ g/kg}$. »Negativna vrednost negotovosti« je $990 - 970) / \sqrt{3} = 11,5 \text{ g/kg}$. »Pozitivna vrednost negotovosti« je 10 g/kg, saj mogoča vsebnost GS ne more preseči 1000 g/kg.