

MAGDALENA ŻURAWSKA-ZAJFERT
KATARZYNA GRELEWSKA-NOWOTKO
EWELINA ŻMIJEWSKA
ANNA LINKIEWICZ
JAROSŁAW NOWOSIELSKI
SŁAWOMIR SOWA

Laboratorium Kontroli GMO, Zakład Biotechnologii i Cytogenetyki Roślin
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — PIB, Radzików

Znaczenie walidacji metod wykrywania i ilościowego oznaczania organizmów zmodyfikowanych genetycznie dla celów kontroli GMO w Unii Europejskiej

The importance of validation for detection and quantification methods of genetically modified organisms for the purpose of GMO control in the European Union

Przed dopuszczeniem na rynek UE produkty zmodyfikowane genetycznie (GM) muszą zostać ocenione pod względem bezpieczeństwa dla zdrowia człowieka i zwierząt a w przypadku uprawy również pod względem bezpieczeństwa dla środowiska. Niezbędnym elementem autoryzacji GMO w UE jako żywność i pasza jest również opracowanie wiarygodnych metod wykrywania i oznaczania ilościowego modyfikacji genetycznych. Metody te umożliwiają identyfikację każdego autoryzowanego GMO i są stosowane przez państwa członkowskie dla potrzeb kontroli rynku. Zgodnie z zaleceniami Komisji Europejskiej do analiz jakościowych i ilościowych GMO wykorzystuje się metody molekularne oparte na technikach PCR i Real Time PCR. Walidacja tych metod, spełniająca określone wymagania, pozwala na uzyskiwanie wiarygodnych, powtarzalnych i porównywalnych wyników pozwalających kontrolować GMO na rynku europejskim.

Słowa kluczowe: autoryzacja, organizm genetycznie zmodyfikowany (GMO), metody oznaczania ilościowego, metody wykrywania, walidacja.

Before placing on the EU market all genetically modified (GM) products must be assessed in terms of safety for human and animal health and, in the case of crop cultivation in terms of safety for the environment. An essential component of the authorization of GMOs in the EU as a food and feed is also the development of reliable methods of detection and quantification of genetic modification. These methods allow to identify each authorized GMO and are applied by the Member States for control of the EU market. In accordance with the recommendations of the European Commission for

the qualitative and quantitative GMO analysis molecular methods based on the PCR and Real Time PCR techniques are developed. Validation of these methods, by checking if they meet specific requirements is a prerequisite to produce reliable, reproducible and comparable results which allow control of GMOs on the European market.

Key words: authorization process, genetically modified organism (GMO), quantification method, detection method, validation process

WSTĘP

Rośliny zmodyfikowane genetycznie (GM) uprawiane są na skalę komercyjną od 1996 roku. Do końca 2015 roku, powierzchnia ich upraw na świecie wzrosła ponad 100-krotnie z 1,7 miliona hektarów do 179,7 milionów hektarów. Rośliny GM uprawiane są w 28 krajach świata, w 19 z nich uprawy zajmują powyżej 50 tysięcy hektarów. Dwadzieścia dziewięć gatunków roślin do których wprowadzono 408 różnych modyfikacji genetycznych zostało autoryzowanych do uprawy na świecie. Największe obszary zajmują genetycznie zmodyfikowane: kukurydza, soja, bawełna i rzepak. W Unii Europejskiej (UE) do uprawy dopuszczona jest tylko jedna modyfikacja (kukurydza MON810). Powszechnie na rynku europejskim występują natomiast produkty paszowe zawierające genetycznie zmodyfikowane składniki. W Europie uprawy GM prowadzone są w Hiszpanii, Portugalii, Czechach, Rumuni i na Słowacji (James, 2015). Wykorzystanie inżynierii genetycznej w hodowli pozwala na komercjalizację nowych odmian roślin GM do których wprowadzane są głównie geny warunkujące odporność na szkodniki oraz tolerancję na herbicydy. Od kilku lat można zaobserwować także wprowadzanie do roślin uprawnych genów warunkujących określone cechy fizjologiczne, biochemiczne lub związane z rozmnażaniem i hodowlą np. odporność na suszę (kukurydza MON87460), zmianę kompozycji składu chemicznego (kukurydza 3272, ziemniak EH92-527-1 — Amflora), męską sterylność (rzepak MS8 × RF3), czy wprowadzanie wielu genów do jednej rośliny tzw. stacked events (MON863xMON810xNK603) (<http://www.gmo-compass.org/eng/gmo/db/>, <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp>, <http://cera-gmc.org/GMCrop Database>).

Od czasu Dyrektywy 90/219/WE w sprawie ograniczonego stosowania mikroorganizmów zmodyfikowanych genetycznie z 1990 roku i Konwencji z Rio de Janeiro o różnorodności biologicznej z 1992 roku zastosowanie inżynierii genetycznej do uzyskiwania GMO jest ściśle regulowane prawnie na terenie Unii Europejskiej. Prawodawstwo UE zapewnia również swobodny obrót przebadanych pod kątem bezpieczeństwa i zdrowia produktów GM na terenie UE. Produkty GM po uzyskaniu autoryzacji mogą być wprowadzane do obrotu we wszystkich państwach należących do UE. Jednym z elementów procesu autoryzacji jest walidacja metod identyfikacji GMO, a w przypadku żywności i pasz genetycznie zmodyfikowanych również ilościowego oznaczania GMO. Walidacja metod analitycznych jest nie tylko podstawowym elementem zapewnienia wiarygodności badań, ale również wymaganiem normy ISO/IEC 17025 „Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących”. Problemy z harmonizacją czyli ujednoczeniem metod analiz GMO stosowanych w Unii Europejskiej i krajach trzecich utrudniają oficjalną kontrolę GMO

oraz transparentność handlu produktami GMO na świecie. Walidacja metod analiz GMO jest jednym z ważniejszych elementów ich harmonizacji.

AUTORYZACJA GMO W UNII EUROPEJSKIEJ

W Unii Europejskiej istnieją dwie ścieżki autoryzacji przy wprowadzaniu GMO jako produktu lub składnika produktów. W przypadku autoryzacji GMO jako żywność i pasza obowiązuje proces autoryzacji zgodnie z Rozporządzeniem 1829/2003/WE, natomiast gdy GMO ma być autoryzowane tylko do uprawy, to obowiązuje Dyrektywa 2001/18. Prawo UE dopuszcza również ubieganie się o autoryzację jako żywność i pasza oraz do uprawy według Rozporządzenia 1829/2003/WE.

W procesie autoryzacji nowego GMO opartym na Rozporządzeniu 1829/2003/WE w sprawie zmodyfikowanej genetycznie żywności i paszy zgłoszenie zostaje przedłożone właściwemu organowi władzy państwowej i musi zawierać: cel i zakres, wszystkie istotne dane, badania i analizy ich wyników, plan monitoringu, propozycję etykietowania, metodę wykrywania, oznaczenie poufnych informacji. Właściwy organ władzy państwowej w ciągu 14 dni potwierdza otrzymanie aplikacji i przesyła dane do Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności – EFSA (European Food Safety Authority) (http://europa.eu/rapid/press-release_MEMO-07-117_en.htm; Plan D., Van den Eede G. 2010).

Druga droga autoryzacji to opracowanie oceny zagrożenia dla zdrowia ludzi, zwierząt i środowiska zgodnie z Dyrektywą 2001/18/WE dla każdego produktu, który ma być wprowadzony do obrotu i może znaleźć się w otwartym środowisku (np. materiał siewny). Na podstawie tej oceny dany produkt może być wykorzystany we wszystkich gałęziach przemysłu z wyłączeniem zastosowania jako żywność i pasza. Aplikant przedkłada dokumentację zawierającą informacje potrzebne do prawidłowego przeprowadzenia oceny ryzyka kompetentnemu organowi władzy w danym kraju, w którym po raz pierwszy GMO będzie wprowadzane na rynek. Po powiadomieniu pozostałych państw członkowskich UE właściwy organ ma 90 dni na podjęcie decyzji.

Niezależnie od tego, którą ścieżkę autoryzacji wybierze aplikant, zawsze obejmuje ona ocenę ryzyka dokonywaną przez EFSA, dotyczącą bezpieczeństwa dla ludzi, zwierząt, a w przypadku uprawy również dla środowiska.

Firma zgłaszająca nowy produkt GMO do zastosowania w żywności i/lub paszy przedstawia metodę wykrywania GMO, pobierania próbek i identyfikacji zdarzenia transformacyjnego oraz propozycję jego monitoringu po wprowadzeniu do obrotu.

Za ocenę naukową i walidację metod oznaczania GMO odpowiedzialne jest Laboratorium Referencyjne Unii Europejskiej ds. Żywności i Pasz GM (EURL-GMFF – European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed). Laboratorium to jest podmiotem akredytowanym według normy ISO/IEC 17025:2005 „Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących” i działa zgodnie z normą ISO 9001:2009 „System zarządzania jakością”.

Metody oznaczania GMO zgłaszane przez aplikanta poddawane są procesowi walidacji przeprowadzanemu przez EURL-GMFF i tylko po uzyskaniu pozytywnych

rezultatów walidacji są uznawane za oficjalne, spełniające wymagane kryteria ustanowione przez prawo unijne. Kryteria jakie musi spełniać proponowana przez aplikanta metoda oznaczania GMO, oparta na PCR i Real Time PCR, są określone w załączniku III do Rozporządzenia 503/2013/UE, w załączniku I Rozporządzenia 641/2004/WE oraz Rozporządzeniu 882/2004/WE. Proponowana przez aplikanta metoda oznaczania GMO musi być specyficzna dla zdarzenia transformacyjnego. Ponadto musi spełniać określone kryteria dla następujących parametrów: takich jak: zakres roboczy, dokładność, wydajność amplifikacji, liniowość (współczynnik R^2), powtarzalność, granica wykrywalności, granica oznaczalności, stabilność, odtwarzalność (ENGL-EURL-GMFF 2015).

Proces walidacji metody przez EURL-GMFF składa się z kilku etapów. Aplikant przesyła do EURL-GMFF dokumentację zawierającą m.in. opis pełnej sekwencji insertu wraz z sekwencją fragmentów DNA roślinnego otaczających miejsce jego włączenia, metodę oznaczania danego zdarzenia transformacyjnego oraz próbki niezbędne do przeprowadzenia dalszych testów przez EURL-GMFF. Po przyjęciu przez EURL-GMFF przesłanej dokumentacji kolejny krok w procesie walidacji to naukowa ocena danych związanych z proponowaną metodą i przesłanymi próbkami. Weryfikowane jest spełnienie wymagań w zakresie wykonanych badań dostarczonych jako dowód przez aplikującego. W przypadku oceny pozytywnej następuje eksperymentalne testowanie nadesłanych próbek oraz metod ekstrakcji i wykrywania GMO zaproponowanych przez aplikującego. Po ich akceptacji nadesłana metoda jest poddawana międzylaboratoryjnej walidacji w Europejskiej Sieci Laboratoriów ds. GMO (ENGL — European Network of GMO Laboratories). W walidacji tej bierze udział kilkanaście (dwanaście lub więcej) losowo wybranych laboratoriów należących do ENGL. Walidacja międzylaboratoryjna przeprowadzana jest zgodnie z wytycznymi zawartymi w przewodniku „IUPAC Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies” i normą ISO 5725 „Dokładność (poprawność i precyzja) metod pomiarowych i wyników pomiarów”. Zebrane dane z międzylaboratoryjnych walidacji są poddawane analizie statystycznej. W przypadku gdy nadesłana metoda była już zwalidowana następuje jej weryfikacja.

Na każdym etapie procesu walidacji EURL-GMFF dokonuje oceny. W przypadku oceny negatywnej aplikant proszony jest o przesłanie wyjaśnień lub dostanie brakujących informacji. W takim przypadku, w zależności od złożonych wyjaśnień, proces walidacji jest kontynuowany lub przerywany. Proces walidacji zakończony jest raportem, który określa przydatność metody do proponowanego zastosowania. Raport końcowy jest przesyłany do EFSA i/lub zgłaszającego.

Informacje dotyczące statusu walidacji wszystkich zgłoszonych do EURL-GMFF metod wraz z walidacyjnymi i technicznymi raportami oraz protokoły walidacji są publikowane na stronie internetowej EURL-GMFF (<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/>).

HARMONIZACJA ANALIZ GMO W UE

Za walidację metod analiz GMO w UE odpowiedzialne jest ww. Laboratorium Referencyjne Unii Europejskiej ds. Żywności i Pasz GM. EURL-GMFF działa w ramach

Wspólnego Centrum Badawczego (Joint Research Centre — JRC) będącego jednostką Komisji Europejskiej. Misją centrum jest zapewnienie wsparcia naukowego i technicznego dla koncepcji, rozwoju, wdrażania i monitorowania polityki UE. W jego skład wchodzi dyrektoriaty, składające się z wielu sekcji zlokalizowanych w pięciu miejscowościach europejskich: Seville, Petten, Isprze, Geel i Karlsruhe. Jedną z nich jest sekcja F „Zdrowie, konsumenci i materiały referencyjne” z siedzibą w Geel, w Belgii. Sekcja ta składa się z 6 oddziałów naukowych wśród których jest Jednostka Zgodności Żywności i Paszy (Food & Feed Compliance), której częścią jest Laboratorium Referencyjne Unii Europejskiej ds. Żywności i Pasz GM (https://ec.europa.eu/jrc/sites/jrcsh/files/jrc-organigramme_en.pdf).

EURL-GMFF jest wspomagane przez Europejską Sieć Laboratoriów GMO (European Network of GMO Laboratories — ENGL), która działa jako naukowe forum doradcze w zakresie pobierania próbek i analiz GMO oraz działa w celu harmonizacji metod stosowanych w ramach oficjalnej kontroli.

EURL-GMFF funkcjonuje zgodnie z systemem zarządzania jakością według normy ISO/IEC 9001 i jest akredytowane zgodnie z wymaganiami norm ISO/IEC 17025 „Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących”, która potwierdza jego kompetencje w zakresie wykrywania i ilościowego oznaczania GMO. Jako organizator porównań międzylaboratoryjnych umożliwiających harmonizację, EURL-GMFF posiada akredytację zgodnie z normą ISO/IEC 17043 „Ocena zgodności — Ogólne wymagania dotyczące badania biegłości”. Główne zadania EURL-GMFF powiązane są z naukową oceną i walidacją metod wykrywania oraz ilościowego oznaczania genetycznych modyfikacji w żywności i paszach. Proces ten jest integralną częścią autoryzacji żywności i pasz GM w UE. Ponadto EURL-GMFF, zapewnia próbki kontrolne do walidowanych metod GMO, określa wytyczne do pobierania próbek i analiz GMO, określa akceptowane kryteria dla metod wykrywania GMO oraz określa kryteria konieczne dla przygotowania danej metody wykrywania GMO, rozwiązuje kwestie sporne związane np. z wynikami testów międzylaboratoryjnych (Rozp. 1829/2003/WE). Kolejnymi ważnymi zadaniami EURL-GMFF wynikającymi z Rozporządzenia 882/2004/WE są: koordynacja pracy Krajowych Laboratoriów Referencyjnych ds. GMO (National Reference Laboratories — NRLs), dostarczanie referencyjnych metod analitycznych dla GMO; koordynacja wdrażania nowych metod poprzez organizowanie testów porównawczych i dostarczenie odpowiednich badań zgodnych z ogólnie akceptowanymi protokołami; koordynacja wdrażania nowych metod; szkolenia dla pracowników NRLi i ekspertów z krajów rozwijających się; wsparcie techniczne dla Komisji Europejskiej szczególnie w przypadkach kontrowersyjnych analiz; współpraca z laboratoriami w krajach trzeciego świata odpowiedzialnymi za analizy żywności i pasz.

Powyższe zadania realizowane są przy wsparciu sieci ENGL, która została powołana przez Unię Europejską w 2002 roku. ENGL tworzą laboratoria referencyjne zgodne z Rozporządzeniem 120/2014/UE (dawniej 1981/2006/WE). Obecnie w skład ENGL wchodzi 95 oficjalnych laboratoriów krajowych, z 28 państw członkowskich UE oraz Norwegii, Szwajcarii i Turcji.

Europejska Sieć Laboratoriów ds. GMO odgrywa ważną rolę w harmonizacji i normalizacji: narzędzi i metod próbkowania, wykrywania, identyfikacji oraz ilościowego oznaczania GMO w szerokiej gamie produktów, obejmujących materiał siewny, ziarno, żywność i pasze.

Podstawowym celem ENGL jest pomoc laboratoriom w rozwiązywaniu problemów w zakresie wykrywania, identyfikacji i ilościowego oznaczania GMO. ENGL organizuje spotkania plenarne w celu wymiany doświadczeń; powołuje grupy robocze dla problemowych tematów; prowadzi współpracę badawczą i wymianę naukowców; organizuje szkolenia; koordynuje przepływ informacji technologicznej pomiędzy członkami ENGL; umożliwia wymianę literatury naukowej.

W celu zapewnienia harmonizacji w analizach GMO na terenie UE zostały powołane Krajowe Laboratoria Referencyjne ds. GMO. Wymagania dla tych laboratoriów są określone w prawodawstwie UE. Laboratoria takie m.in. muszą być akredytowane zgodnie z normą ISO/IEC 17025, muszą posiadać odpowiednio wykwalifikowany personel, wyposażenie umożliwiające przeprowadzenie analiz GMO, powinny współpracować z EURL-GMFF i należeć do ENGL (Rozp. 882/2004/WE).

Krajowe Laboratoria Referencyjne wspierane są przez EURL-GMFF m.in. w zakresie walidacji nowych metod identyfikacji i ilościowego oznaczania GMO, które są proponowane przez firmy chcące wprowadzić nowe produkty GM na rynek.

W identyfikacji i ilościowym oznaczaniu GMO w UE rutynowo stosowane są techniki wykorzystujące PCR i Real Time PCR, ze względu na ich wysoką czułość i specyficzność związaną z możliwością określenia danej modyfikacji. Zanim zostaną one zatwierdzone przez UE, przechodzą proces walidacji. Zwaliowane metody są zawarte w kompendium metod (EURL-GMFF, ENGL 2011) oraz zamieszczone na stronie internetowej EURL-GMFF (<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/StatusOfDossiers.aspx>). Liczba walidowanych metod stale wzrasta. Do 2010 roku było ich 4-5 rocznie. Od 2012 roku, po wejściu w życie Rozporządzenia Komisji (UE) nr 619/2011, liczba metod analiz GMO wzrosła średnio do 13 rocznie.

Harmonizacja w analizach GMO nakłada na Krajowe Laboratoria Referencyjne obowiązek stosowania metod identyfikacji GMO polecanych przez EURL-GMFF. Implementacja tak dużej liczby pojawiających się każdego roku nowych metod jest dużym wyzwaniem dla NRLi. Krajowe Laboratoria Referencyjne stają przed problemami wyboru i dostosowania kryteriów akceptacji dla wdrażanych nowych metod w laboratorium, określenia liczby przeprowadzonych testów zanim dana metoda zostanie wprowadzona do rutynowych analiz, czyli określenia kryteriów walidacji czy weryfikacji dla nowowprowadzanych metod.

Konieczność wdrażania wszystkich oficjalnych metod analiz GMO przez NRLe jest dużym wyzwaniem, pod względem ponoszonych kosztów, potrzebnego czasu jak i nakładów pracy.

WALIDACJA METOD ANALIZ GMO I JEJ PARAMETRY

Spośród szeregu metod oznaczania zawartości GMO w produktach i materiale roślinnym wykorzystujących techniki molekularne oparte na analizie kwasów nukleinowych czy białek oraz metody chemiczne i fizykochemiczne (Bonfini i in., 2001; Taverniers, 2005), w UE zastosowanie znalazły metody oparte na technice PCR (polymerase chain reaction — łańcuchowa reakcja polimerazy) czyli powielaniu sekwencji docelowej DNA prowadzonej w kontrolowanych warunkach reakcji. W krajach Unii Europejskiej dla każdego zarejestrowanego GMO musi istnieć wysoce specyficzna metoda jego ilościowego oznaczania (metoda specyficzna dla zdarzenia transformacyjnego tzw. metoda event-specific). Oficjalne metody ilościowej analizy GMO wykorzystują technikę PCR w czasie rzeczywistym — Real Time PCR, gdzie stężenie amplifikowanego DNA jest monitorowane w każdym cyklu reakcji poprzez pomiar poziomu sygnału fluorescencji wprost proporcjonalnego do ilości amplifikowanego produktu. Ilość danej modyfikacji w badanej próbce jest przedstawiana w procentach masowych GM w stosunku do masy danego składnika lub procentach kopii GM w przeliczeniu na genom haploidalny danego składnika (np. 0,5% soi Roundup Ready w soi). Metody ilościowe wykorzystujące technikę Real Time PCR wymagają zastosowania certyfikowanych materiałów referencyjnych (CRM — certified reference materials) o określonej certyfikowanej ilości danej modyfikacji genetycznej oraz przeprowadzenia reakcji dla genu referencyjnego, co umożliwi ilościowe oszacowanie modyfikacji w badanej próbce. Gen referencyjny jest to gen endogenny, gatunkowo-specyficzny, który powinien występować w pojedynczej liczbie kopii w genomie haploidalnym rośliny i powinien być powielany w taki sam sposób jak GM (Taverniers I. 2005).

Metody stosowane w oficjalnej kontroli w UE dla detekcji i ilościowego oznaczania autoryzowanych GMO muszą być metodami zwalidowanymi.

Walidacja jest potwierdzeniem spełnienia wymagań odnoszących się do konkretnego zastosowania, poprzez zbadanie i przedstawienie obiektywnego dowodu. Walidacja jest zawsze kompromisem pomiędzy kosztami, ryzykiem, możliwościami technicznymi laboratorium i potrzebami klientów (ISO/IEC 17025:2005).

Norma ISO/IEC 17025:2005 określa zakres metod badawczych, które muszą być zwalidowane. Walidacja może obejmować metody nieznormalizowane, metody stworzone przez laboratorium, czy metody znormalizowane jeśli są stosowane poza przewidzianym dla nich zakresem.

Zwalidowane wcześniej metody, czy metody znormalizowane wprowadzane do laboratorium powinny być przed zastosowaniem zweryfikowane. Weryfikacja polega na potwierdzeniu metod, przez przedstawienie obiektywnego dowodu, że spełniają wyspecyfikowane wymagania (ISO 9000:2006).

Weryfikacja daje odpowiedź czy laboratorium używa w odpowiedni sposób wystandaryzowanej metody, tak że jej określone parametry są zgodne dla próbek analizowanych tą metodą w laboratorium. Podstawowym elementem weryfikacji jest

wyznaczenie przez laboratorium poprawności i precyzji dla stosowanej metody (ENGL, 2011).

W analizach GMO dokumentami, które odnoszą się do walidacji i weryfikacji metod identyfikacji i ilościowego oznaczania GM są dwa przewodniki wydane przez EURL-GMFF i ENGL. Pierwszy z nich „Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing” zawiera parametry walidacji oraz schemat postępowania przy wdrażaniu nowego GMO na rynek europejski. Pierwsze wydanie tego przewodnika z 2008 roku skierowane było do firm aplikujących o autoryzację GMO, natomiast kolejne wydanie z 2015 roku skierowane jest także do NRLi i innych laboratoriów ds. GMO.

Drugim dokumentem jest przewodnik z 2011 roku dotyczący sposobu postępowania NRLi oraz innych laboratoriów ds. GMO przy weryfikacji wprowadzanych metod analiz GMO - „Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods”. Dokument ten ujednocila terminy i definicje oraz proponuje konkretne podejście do wyznaczania określonych parametrów podczas weryfikacji metod.

Walidacja może obejmować szereg parametrów. Należą do nich: granica wykrywalności, granica oznaczalności, selektywność/specyficzność metody, czułość, precyzja, liniowość, powtarzalność, odtwarzalność, zakres roboczy, poprawność (dokładność), wydajność amplifikacji, stabilność - odporność na czynniki zewnętrzne oraz niepewność pomiaru (wielkość ściśle związana z walidacją) (ISO/IEC 17025:05, 2005; ENGL, 2011; ENGL, 2015). Weryfikacja natomiast obejmuje: precyzję, poprawność (błąd systematyczny), liniowość (współczynnik R^2), wydajność amplifikacji, granicę wykrywalności, granicę oznaczalności (ENGL, 2011).

Parametry walidacji charakteryzują daną metodę badawczą w określonych przyjętych kryteriach i są uniwersalne dla szerokiego spektrum badań, w różnych dziedzinach nauki. Specyficzne natomiast są kryteria jakie muszą one spełniać i sposób ich szacowania. W analizach GMO podczas walidacji oceniane są następujące parametry:

- **stabilność** (robustness) - zdolność metody lub urządzenia do odporności na działanie czynników zewnętrznych - wytrzymałość metody, urządzenia. Np. dla metody PCR czynniki, które mogą wpływać na jej stabilność to: termocykler, master mix, objętość reakcji, stężenie starterów i sond, temperatura przyłączania starterów;
- **czułość** (sensitivity) - najmniejsza ilość składnika, która daje sygnał i może być oznaczana daną metodą badawczą;
- **selektywność, specyficzność** (selectivity, specificity) - miara zdolności metody do wykrywania określonego fragmentu DNA z mieszaniny;
- **powtarzalność** (repeatability) - stopień zgodności między wynikami przy powtarzaniu badania w określonych warunkach, tą samą metodą badawczą, określana przez względne odchylenie standardowe w warunkach powtarzalności (RSDr). Kryterium akceptacji: $RSDr \leq 25\%$;
- **odtworzalność wewnątrzlaboratoryjna** (reproducibility) — stopień zgodności między wynikami przy powtarzaniu badania przez wszystkich analityków tą samą metodą badawczą w określonych warunkach, określana przez względne odchylenie

standardowe w warunkach odtwarzalności (RSDr). Kryterium akceptacji: $RSDr < 35\%$;

- **zakres roboczy** (dynamic range) — zakres w którym metoda zachowuje jednorodność, liniowość. Zakres ten można określić jako zakres stosowania, w którym można osiągnąć akceptowalną poprawność i precyzję. Kryterium akceptacji: RSDr i poprawność $\leq 25\%$;
- **poprawność**, błąd systematyczny, dokładność (trueness, bias) - stopień zgodności między średnią wartością uzyskaną z dużej serii pomiarów, a przyjętą wartością odniesienia. Poprawność metody powinna zostać sprawdzona poprzez analizę odpowiednich materiałów referencyjnych z certyfikowaną zawartością oznaczanego składnika. Kryterium akceptacji: $\pm 25\%$ od oczekiwanej wartości wzorcowej;
- **liniowość** (linearity) — zdolność do uzyskiwania wyników pomiaru wprost proporcjonalnych do stężenia substancji oznaczanej w próbce, w określonym zakresie – zgodnie z wyznaczonym równaniem funkcji regresji $y=ax+b$. Zależność między obiema zmiennymi charakteryzuje współczynnik korelacji r . Kryterium akceptacji: współczynnik determinacji $R^2 \geq 0,98$;
- **wydajność amplifikacji** (amplification efficiency) — zależy od współczynnika nachylenia krzywej standardowej (slope). Slope = -3,32 odpowiada 100% wydajności. Kryterium akceptacji: $-3,1 \geq \text{slope} \geq -3,6$;
- **precyzja** (precision — relative standard deviations of repeatability — RSDr) — względne odchylenie standardowe wyników w warunkach powtarzalności. Warunki powtarzalności to warunki, w jakich uzyskano wyniki badań prowadzonych tą samą metodą, na identycznym materiale badawczym, w tym samym laboratorium, przez tego samego użytkownika, przy użyciu tego samego sprzętu, w krótkich odstępach czasu (Rozp. 619/2011/UE);
- **granica wykrywalności** (LOD — limit of detection) — najmniejsza ilość analitu lub najmniejsze jego stężenie w próbce badanej, które zostały wykazane badaniami międzylaboratoryjnymi lub odpowiednią walidacją, możliwe do wykrycia w sposób nie podlegający wątpliwości, lecz niekoniecznie możliwe do oznaczenia ilościowego (PN-EN ISO 24276). Jest to najmniejsza ilość substancji badanej jaką można wykryć w badanej próbce daną metodą badawczą. LOD powinno być mniejsze od 1/20 stężenia docelowego, np. dla 0,9% teoretyczna wartość LOD powinna być mniejsza od 0,045% (ENGL, 2015).
- **granica oznaczalności** (LOQ — limit of quantification) — najmniejsza ilość analitu lub najmniejsze jego stężenie w próbce badanej, które zostały wykazane badaniami międzylaboratoryjnymi lub odpowiednią walidacją, możliwe do oznaczania ilościowego z akceptowaną precyzją i dokładnością (PN-EN ISO 24276). Jest to najmniejsza ilość substancji badanej jaką można pewnie oznaczyć ilościowo z akceptowalnym poziomem precyzji i dokładności. LOQ powinno być mniejsze od 1/10 stężenia docelowego przy względnym odchyleniu standardowym w warunkach powtarzalności ($RSDr \leq 25\%$), np. dla 0,9% teoretyczna wartość LOQ powinna być mniejsza od 0,09% (ENGL, 2015).

W trakcie walidacji metod wykrywania, identyfikacji i ilościowego oznaczania GMO w procesie autoryzacji GMO w UE, EURL-GMFF przy wsparciu NRLi analizuje pełne spektrum powyższych parametrów. W przypadku metod opracowywanych w Krajowych Laboratoriach Referencyjnych czy akredytowanych laboratoriach badawczych ds. GMO zakres analizowanych parametrów może być różny w zależności od użytej metody, możliwości laboratorium i potrzeb klienta. Laboratoria walidują metody w przypadku kiedy stosują metody nowe, własne, nieznormalizowane czy zmienione, a weryfikują w przypadku wykorzystywania metod już zwalidowanych, czy ujętych w normach. Obligatoryjność walidacji czy weryfikacji metod analiz GMO ma na celu zapewnienie ich harmonizacji i eliminację wyników niespełniających ogólnie przyjętych kryteriów.

W UE stosowanie zwalidowanych metod ilościowego oznaczania GMO ma za zadanie zapewnienie porównywalnych wyników otrzymywanych przez laboratoria referencyjne zgodne z Rozporządzeniami 120/2014/UE i 882/2004/WE.

W krajach członkowskich UE Rozporządzenie 1829/2003/WE nakłada obowiązek znakowania produktów zawierających GM, wytworzonych przy pomocy GMO m.in.: żywność, składniki żywności, dodatki do żywności, pasze, dodatki do paszy i substancje smakowe. Znakowaniu podlegają produkty w których zawartość GM przekracza próg 0,9% w odniesieniu do składnika. Nie są znakowane produkty w których zawartość GMO jest mniejsza od 0,9% w stosunku do składnika, jeśli jest niezamierzona lub technicznie nieunikniona. W przypadku pasz dla których procedura wydawania zezwolenia jest w toku lub zezwolenie wygasło Rozporządzenie 619/2011/UE dopuszcza zawartość na poziomie 0,1% masowego. Oba Rozporządzenia kładą nacisk na harmonizację stosowanych metod w kontrolach urzędowych, dlatego tak ważne jest stosowanie zwalidowanych metod oznaczania GMO.

PODSUMOWANIE

W niniejszej pracy scharakteryzowano proces autoryzacji GMO w UE oraz walidację metod wykrywania i ilościowego oznaczania genetycznie zmodyfikowanych organizmów. Walidacja metod analiz GMO ma bardzo istotne znaczenie w procesie ich autoryzacji ponieważ dostarcza dowodów, że metoda wykorzystywana do wykrywania i ilościowego oznaczania GMO spełnia stawiane jej wymagania. Walidacja umożliwia również harmonizację tych metod, zapewniając powtarzalne i porównywalne wyniki. Proces autoryzacji GMO na rynku europejskim jest procesem obejmującym wiele aspektów, w tym bezpieczeństwo GMO dla środowiska, zdrowia ludzi i zwierząt. Autoryzacja zapewnia dostępność zwalidowanych metod identyfikacji i ilościowego oznaczania nowych GMO dzięki czemu możliwa jest kontrola rynku europejskiego pod kątem obecności produktów żywnościowych, paszy czy roślin GM. Dzięki wytycznym EURL-GMFF laboratoria ds. GMO mogą postępować w sposób ujednolicony podczas przeprowadzania analiz.

LITERATURA

- Bonfini L., Heinze P., Kay S., Van Den Eede G. 2002. Review of GMO detection and quantification techniques. European Commission, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, Food Products and Consumer Goods Unit, EUR 20384 EN
- Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC - Commission Declaration.
- Directive 90/219/EEC 1990. Contained use of genetically modified micro-organisms.
- Dyrektywa 90/219/WE 1990. W sprawie ograniczonego stosowania mikroorganizmów zmodyfikowanych genetycznie.
- Dyrektywa 2001/18/WE 2001. W sprawie zamierzonego uwalniania do środowiska organizmów zmodyfikowanych genetycznie i uchylająca dyrektywę Rady 90/220/EWG;
- ENGL 2011. Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods.
- ENGL, EURL-GMFF 2015. Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing.
- EURL-GMFF, ENGL 2011. Compendium of reference methods for GMO analysis.
- ISO/IEC 17043:2011. Ocena zgodności -- Ogólne wymagania dotyczące badania biegłości.
- ISO/IEC 17043:2010 Conformity assessment -- General requirements for proficiency testing
- ISO 5725 2002. Dokładność (poprawność i precyzja) metod pomiarowych i wyników pomiarów.
- ISO 5725 1994. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results.
- ISO 9001:2009. System zarządzania jakością.
- ISO 9001:2015. Quality management systems — Requirements
- ISO/IEC 17025:2005. Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących.
- ISO/IEC 17025:2005 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
- IUPAC 1995. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. Pure & Appl. Chem. 67 (2) 331-343.
- James C. 2015. 20th Anniversary (1996 to 2015) of the Global Commercialization of Biotech Crops and Biotech Crop Highlights in 2015. The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA) 51.
- Plan D., Van den Eede G. 2010. The EU Legislation on GMOs. European Commission, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection EUR 24279 EN 5-10.
- Rozporządzenia 619/2011/UE 2001. Ustanawiające metody pobierania próbek i dokonywania analiz do celów urzędowej kontroli paszy pod kątem występowania materiału genetycznie zmodyfikowanego, dla którego procedura wydawania zezwolenia jest w toku lub dla którego zezwolenie wygasło.
- Rozporządzenie 120/2014/UE 2014. Zmieniające Rozporządzenie (WE) nr 1981/2006 ustalające szczegółowe zasady wykonania przepisów art. 32 Rozporządzenia (WE) nr 1829/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady w odniesieniu do wspólnotowego laboratorium referencyjnego dla organizmów zmodyfikowanych genetycznie.
- Rozporządzenie 1829/2003/WE 2003. W sprawie zmodyfikowanej genetycznie żywności i paszy.
- Rozporządzenie 503/2013/UE 2013. W sprawie wniosków o zatwierdzenie genetycznie zmodyfikowanej żywności i paszy zgodnie z Rozporządzeniem (WE) nr 1829/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady oraz zmieniające Rozporządzenia (WE) nr 641/2004 i (WE) nr 1981/2006 załącznik III.
- Rozporządzenie 641/2004/WE 2004. W sprawie szczegółowych zasad wykonywania Rozporządzenia (WE) nr 1829/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady odnoszącego się do wniosków o zatwierdzenie nowego typu żywności i paszy genetycznie zmodyfikowanej, powiadamiania o istniejących produktach oraz przypadkowym lub technicznie nieuniknionym występowaniu materiału genetycznie zmodyfikowanego, który pomyślnie przeszedł ocenę ryzyka załącznik I.
- Rozporządzenie 882/2004/WE 2004. W sprawie kontroli urzędowych przeprowadzanych w celu sprawdzenia zgodności z prawem paszowym i żywnościowym oraz regułami dotyczącymi zdrowia zwierząt i dobrostanu zwierząt.

Taverniers I. 2005. Development and implementation of strategies for GMO quantification in an evolving European context. Universiteit Gent Faculteit Bio-Ingenieurswetenschappen.

Strony internetowe:

Baza GMO na rynku europejskim: <http://www.gmo-compass.org/eng/gmo/db/> (dostęp 02.11.2016).

Baza dopuszczonych GMO na świecie: <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp> (dostęp 27.01.2017).

Baza GMO na rynku światowym: <http://cera-gmc.org/GMCropDatabase> (dostęp 02.11.2016).

Informacje na temat legislacji UE w kwestiach GMO, strona Komisji Europejskiej: http://europa.eu/rapid/press-release_MEMO-07-117_en.htm (dostęp 14.11.2016).

Proces walidacji metod przez EURL-GMFF: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/Description%20CRL%20validation%20process.pdf> (dostęp 27.10.2016).

Strona EURL-GMFF - <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/> (dostęp 27.10.2016).

Schemat organizacyjny JRC: https://ec.europa.eu/jrc/sites/jrcsh/files/jrc-organigramme_en.pdf (dostęp 27.10.2016).

Wykaz walidowanych metod przez EURL-GMFF: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/StatusOfDossiers.aspx> (dostęp 27.10.2016).