

# Jak prowadzić analizy GMO w laboratorium urzędowym

Dr Anna Linkiewicz

Laboratorium Kontroli GMO, IHAR-PIB, Radzików

21.10.2022

# Rozporządzenie 2017/625

Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2017/625 z dnia 15 marca 2017 r.

w sprawie kontroli urzędowych i innych czynności urzędowych przeprowadzanych w celu zapewnienia stosowania prawa żywnościowego i paszowego oraz zasad dotyczących zdrowia i dobrostanu zwierząt, zdrowia roślin i środków ochrony roślin,

zmieniające rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 999/2001, (WE) nr 396/2005, (WE) nr 1069/2009, (WE) nr 1107/2009, (UE) nr 1151/2012, (UE) nr 652/2014, (UE) 2016/429 i (UE) 2016/2031, rozporządzenia Rady (WE) nr 1/2005 i (WE) nr 1099/2009 oraz dyrektywy Rady 98/58/WE, 1999/74/WE, 2007/43/WE, 2008/119/WE i 2008/120/WE, oraz uchylające rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 854/2004 i (WE) nr 882/2004, dyrektywy Rady 89/608/EWG, 89/662/EWG, 90/425/EWG, 91/496/EWG, 96/23/WE, 96/93/WE i 97/78/WE oraz decyzję Rady 92/438/EWG.

# GMO na rynku UE



# Analiza GMO - pytania

- Czy w próbie znajduje się GMO?
- Jakie zdarzenia transformacyjne („event”) są obecne w próbie?
- Czy są to zdarzenia transformacyjne autoryzowane w UE?
- Jeśli są autoryzowane, to jaka jest ich zawartość w próbie?



# Źródła: European Union Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed -EURL GMFF



JRC TECHNICAL REPORTS

Recommendation for the unit of measurement and the measuring system to report traceable and comparable results expressing GM content in accordance with EU legislation

Corbisier P., Barbante A., Berben G., Broothaerts W., De Loose M., Emons H., Georgieva Tz, Lievens A., Mazzara M., Papazova N., Perri E., Sowa S., Stebih D., Terzi V., Trapmann S.

2017



JRC TECHNICAL REPORT



**Guidelines for sample preparation procedures in GMO analysis**

*Prepared by the ENGL ad hoc working group on "sample preparation procedures"*



## Organizm zmodyfikowany genetycznie

Organizm, inny niż organizm człowieka, w którym materiał genetyczny został zmieniony w sposób niezachodzący w warunkach naturalnych, np. krzyżowania lub naturalnej rekombinacji (Dyrektywa 2001/18/WE)

- Rośliny
- Zwierzęta
- Mikroorganizmy
- Również organizmy powstałe na drodze NTG, w tym nowoczesnej mutagenезы



## Dyrektywa 2001/18/WE

### **W sprawie zamierzonego uwolnienia do środowiska organizmów genetycznie zmodyfikowanych**

Wprowadza definicję GMO i ramy pojęciowe dotyczące GMO do których odwoływać się będzie prawo UE. Reguluje też uwolnienie GMO do środowiska, również w celach doświadczalnych.

### **ZAŁĄCZNIK I B TECHNIKI OKREŚLONE W ART. 3**

Organizmy uzyskane za pomocą tych technik/metod modyfikacji genetycznej zostają wyłączone z zakresu niniejszej dyrektywy pod warunkiem że techniki te nie obejmują wykorzystania rekombinowanych cząsteczek kwasu nukleinowego lub organizmów zmodyfikowanych genetycznie innych, niż uzyskane za pomocą jednej lub więcej technik/metod wymienionych poniżej: 1) mutageneza; 2) fuzja komórek (w tym fuzja protoplastów) pochodzących z roślin, które mogą wymieniać materiał genetyczny na drodze tradycyjnych metod hodowli.

## Rozporządzenie 1829/2003

Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 22 września 2003 r. w sprawie genetycznie zmodyfikowanej żywności i środków żywienia zwierząt:

- Reguluje zasady wprowadzenia na rynek żywności i paszy GMO
- poddaje ocenie bezpieczeństwa w drodze procedury wspólnotowej żywość i pasze GMO i określa nowe wymagania dotyczące znakowania żywności zmodyfikowanej genetycznie,
- nakłada obowiązek na wnioskodawców dołączenia do dokumentacji metody ich próbkobrania i badania,
- wprowadza scentralizowaną procedurę oceny wniosków przez Europejski Urząd Bezpieczeństwa Żywności (European Food Safety Authority - EFSA).
- Ustala próg w przeliczeniu na składnik „nie więcej niż 0,9%”
- Wprowadza Unijne Europejskie Laboratorium Referencyjne dla żywności i paszy GM (EURL-GMFF)

## Rozporządzenie 1830/2003

Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 22 września 2003 r. dotyczące możliwości śledzenia i etykietowania organizmów zmodyfikowanych genetycznie oraz możliwości śledzenia żywności i produktów paszowych wyprodukowanych z organizmów zmodyfikowanych genetycznie.

- Wprowadza rejestry GMO.



# Progi znakowania dla GMO w EU

## Autoryzowane GMO

- **Żywność i pasza 0.9%** , niezamierzone, technicznie nieunikniona domieszka;  
Rozporządzenie 1829/2003/WE
- **Dla nasion nie jest ustalony próg** (granica wykrywalności - LOD, praktycznie 0.1% - granica oznaczalności LOQ).

## Nieautoryzowane GMO

- Zerowa tolerancja dla żywności i pasz,
- Zerowa tolerancja dla nasion
- Nie więcej niż 0.1% w paszach dla zwierząt - LLP (Rozporządzenie 619/2011/WE)

(GMO dozwolone w kraju trzecim, EFSA pozytywna ocena ryzyka, CRM dostępne, zwalidowana metoda przez EURL-GMFF)

**Próbobranie jest konieczne by sprawdzać wymagania dotyczące progu znakowania**

## Rozporządzenie 641/2004

- Wprowadza dokładne zasady implementowania Rozporządzenia 1829/2003 w odniesieniu do żywności i pasz GM
- Zawiera dane dotyczące walidacji metod (Aneks 1) i stosowania materiałów referencyjnych CRM (Aneks 2)
- Metody PCR i qPCR są standardem

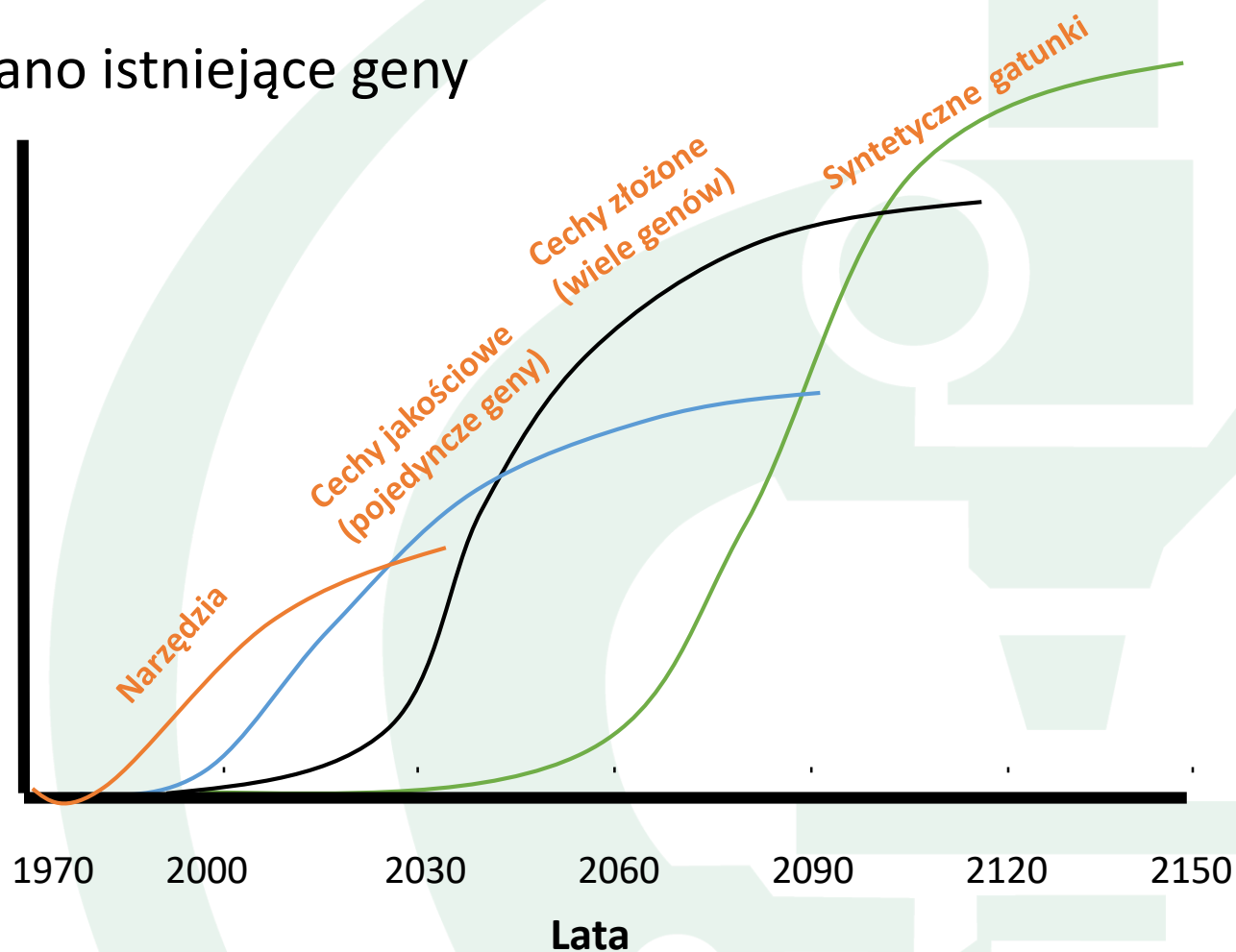
## Rozporządzenie 882/2004 zmienione przez Rozporządzenie 2017/625

- Wprowadza zasady oficjalnych kontroli przeprowadzanych w celu weryfikacji stosowania prawa odnośnie GMO w żywności i paszach
- Wprowadza EURL i NRL (Krajowe Laboratoria Referencyjne) i określa ich zadania
- ISO/IEC 17025 akredytacja

## Organizmy genetycznie zmodyfikowane (transgeniczne):

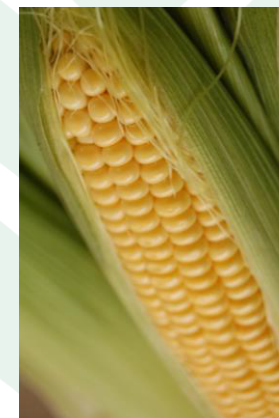
- wprowadzono nowe: DNA → białka → metabolity → cechy
- zablokowano istniejące geny

Kierunki  
rozwoju  
transgenezy



# Jakie nowe geny zawierają rośliny GMO?

- modyfikacje wprowadzające odporność na owady lub nicienie
- modyfikacje wprowadzające tolerancję na herbicydy
- zmiana cech jakościowych lub ilościowych (wyższy poziom lizyny, brak kofeiny)
- mają unieczynnione lub zmienione geny natywne
- inne



# GMO autoryzowane w UE jako żywność i pasza

- Bawełna (MON1445)  
Bawełna (MON15985)  
Bawełna (MON15985 x MON1445)  
Bawełna (MON531)  
Bawełna (MON531 x MON1445 )  
Bawełna (LLCotton25)...
- Rzepak (GT73)  
Rzepak (MS8, RF3, MS8xRF3)  
Rzepak (T45)...
- Soja (MON40-3-2)  
Soja (A2704-12)  
Soja (MON89788)  
  
Soja MON-87751-7 x MON-87701-2 x MON-87708-9 x  
MON-89788-1  
...  
Burak cukrowy (H7-1)
- Kukurydza (Bt11)  
Kukurydza (DAS1507)  
Kukurydza (GA21)  
**Kukurydza (MON810)**  
Kukurydza (MON863)  
Kukurydza (MON863 x NK603)  
Kukurydza (MON863 x MON810 )  
Kukurydza (NK603)  
Kukurydza (NK603 x MON810)  
Kukurydza (T25)  
Kukurydza (DAS59122)  
Kukurydza (DAS1507xNK603)  
Kukurydza (MON89034)  
Kukurydza (MON88017)  
Kukurydza (59122xNK603)  
Kukurydza (MIR604)  
Kukurydza (MON863xMON810xNK603) ....



# ANALIZA GMO – schemat postępowania

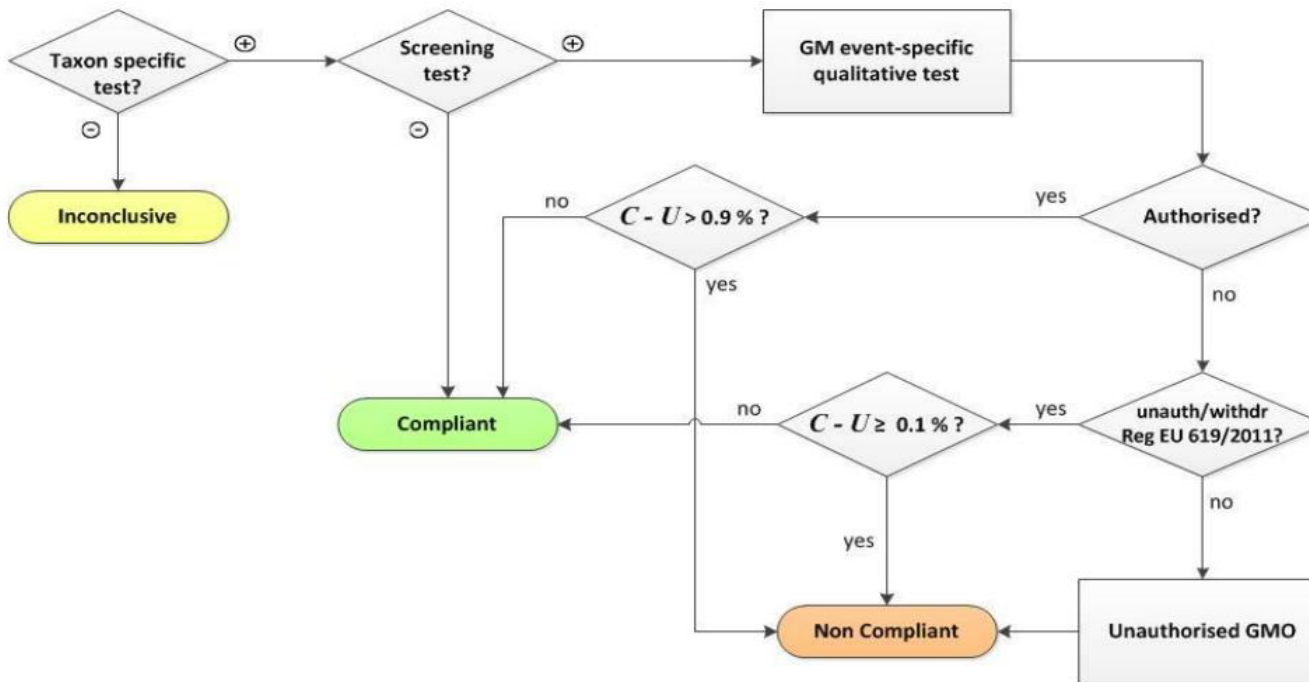


Figure 1: Decision tree compliance testing for food/feed products (with  $C$  being the measured GMO content and  $U$  the expanded uncertainty) not labelled for the presence of GMOs and their legal EU enforcement limits. Inconclusive denotes the situation in which the measurement request to detect and identify possible GM events for this taxon cannot be satisfied.

# Analizie na obecność GMO poddaje się:

- Tkanki roślinne, zwierzęce
- Nasiona
- Produkty żywnościowe, składniki i dodatki do żywności
- Pasze

*Dostępne musi być DNA lub białko*

## Analizy GMO – na jakie etapy zwrócić szczególną uwagę

- ✓ Próbobranie
- ✓ Postępowanie z próbkami
- ✓ Metody izolacji DNA
- ✓ Skrining PCR i jego zakres
- ✓ Identyfikacja GMO
- ✓ Ilościowe oznaczenie autoryzowanych GMO
- ✓ Raportowanie wyniku i niepewność

# Próbobranie

Zgodnie z wytycznymi dla pobierania reprezentatywnych prób z danego materiału

## **Rec. 787/2004/CE on technical guidance for GMO sampling**

(ZALECENIE KOMSJI z dnia 4 października 2004 r.  
w sprawie wytycznych technicznych w zakresie pobierania próbek i wykrywania organizmów zmodyfikowanych genetycznie oraz materiałów produkowanych z organizmów zmodyfikowanych genetycznie lub w składzie produktów w kontekście rozporządzenia (WE) nr 1830/2003)

- Pasze
- Żywność
- Nasiona

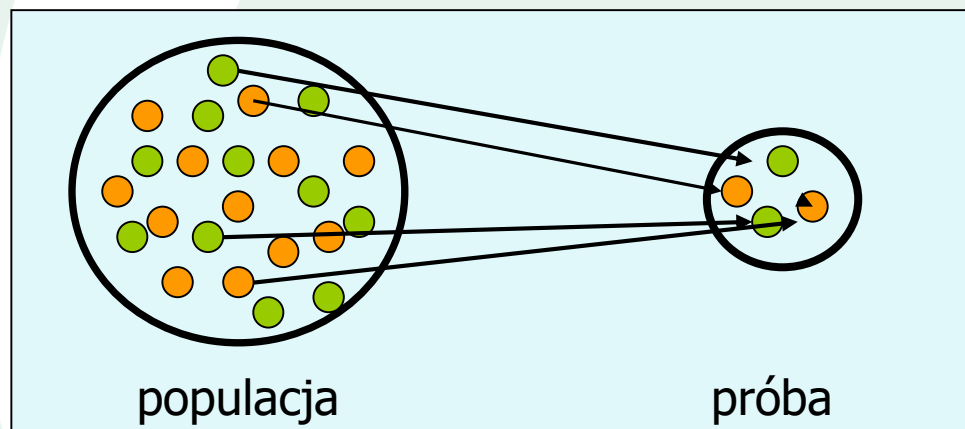
## Pobieranie prób

**Populacja** = zbiór zjawisk, elementów podlegających badaniom statystycznym ze względu na pewną właściwość (cechę zmienną)

**Próba** = zespół elementów wylosowanych z populacji generalnej, podzbiór populacji generalnej. Musi być odpowiednio liczna i pobrana z zachowaniem warunku losowości.

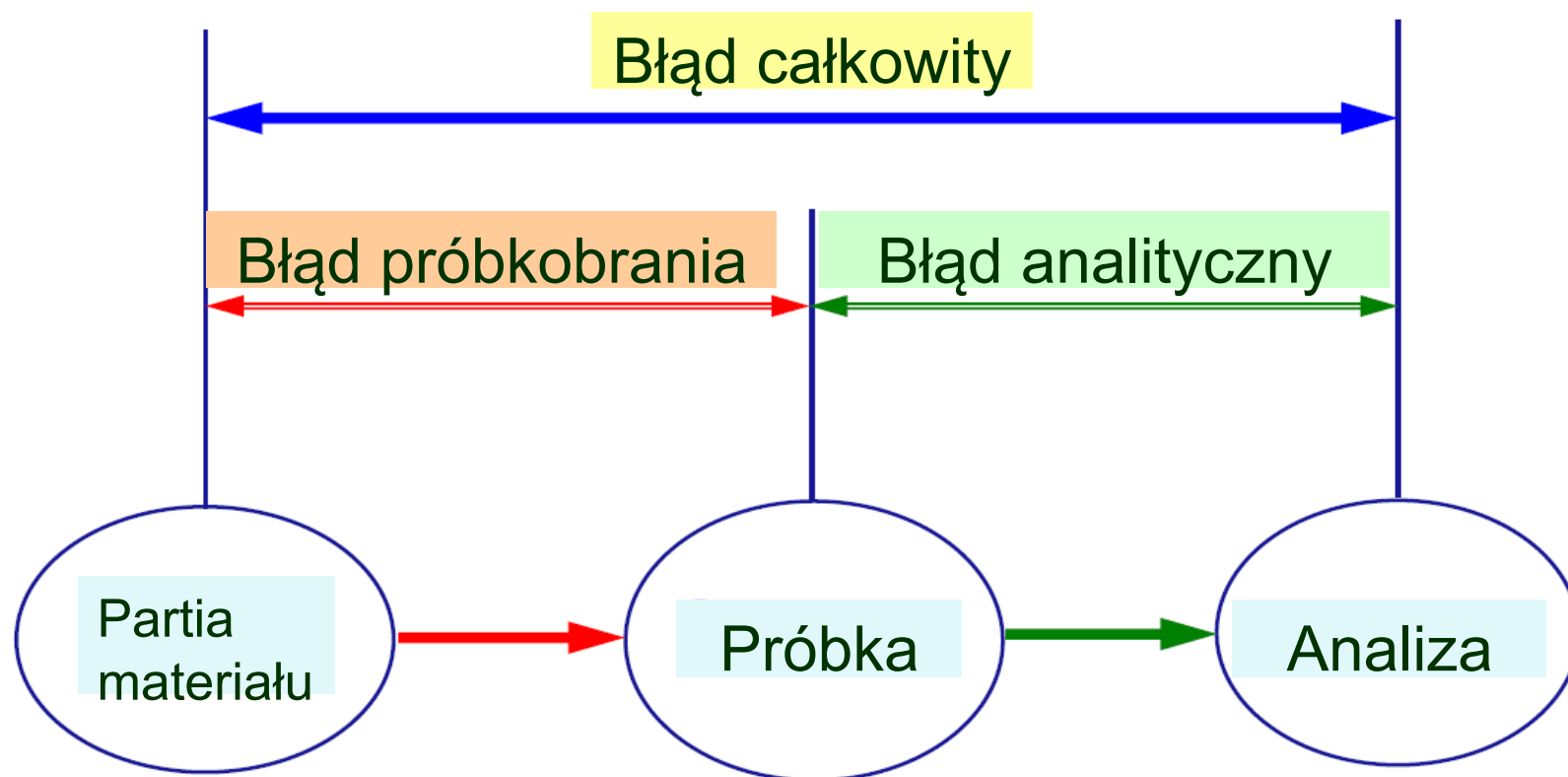
Im większa próba tym bardziej reprezentatywna dla całej populacji.

Pobieranie próbek jest zawsze źródłem błędu → **błąd próbkobrania**

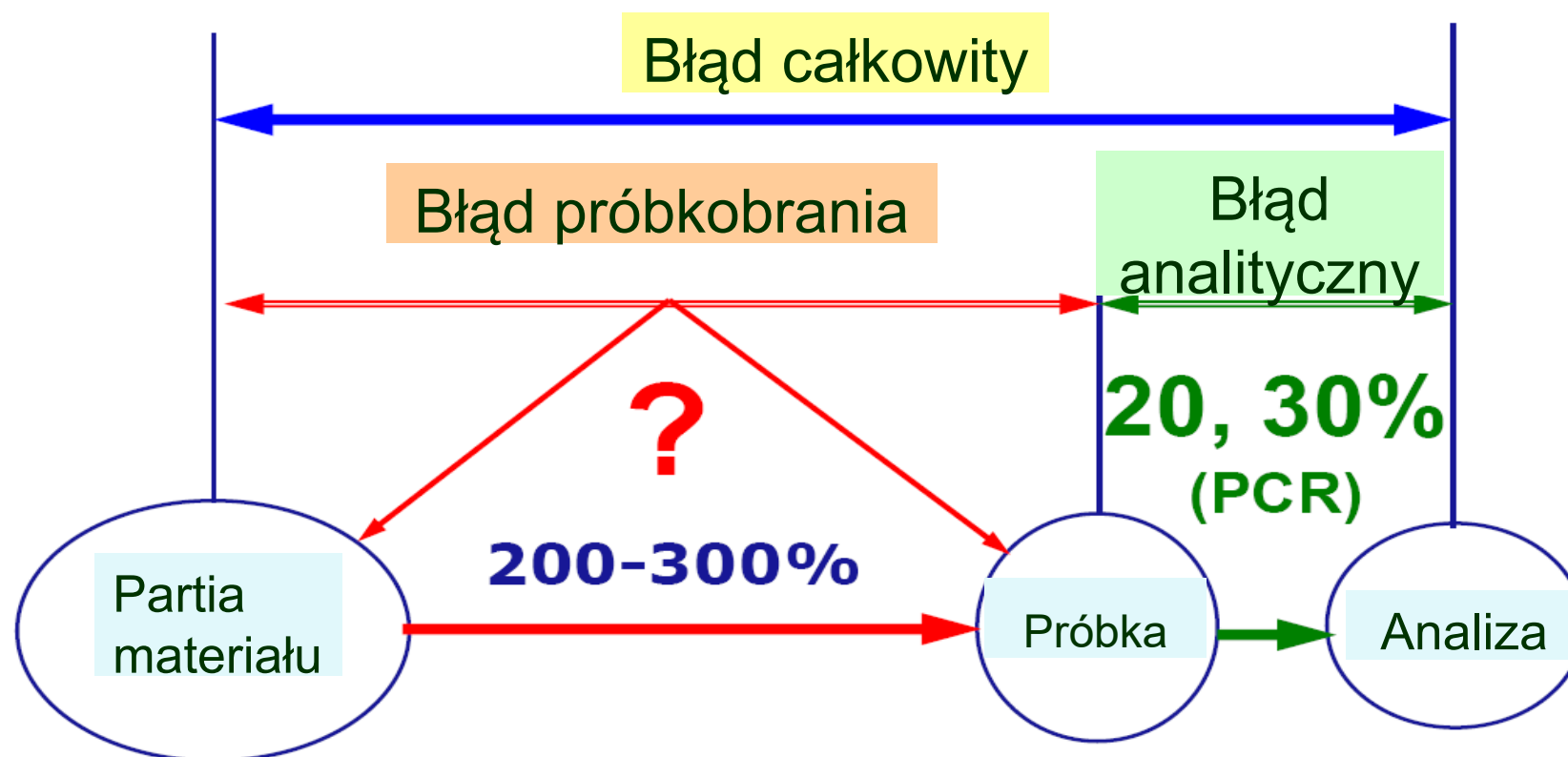




# Źródła błędów analizy



## Źródła błędu analizy



Błąd próbkobrania stanowi większą część błędu całkowitego

## Podstawowe zasady pobieranie próbek

- Cel: zminimalizowanie błędu próbkobrania
- Próbka – **reprezentatywna** dla populacji
- Dokładność wyniku- dokładność pobrania próbki (reprezentatywność próbki)
- Strategia pobierania próbek- funkcja właściwości populacji



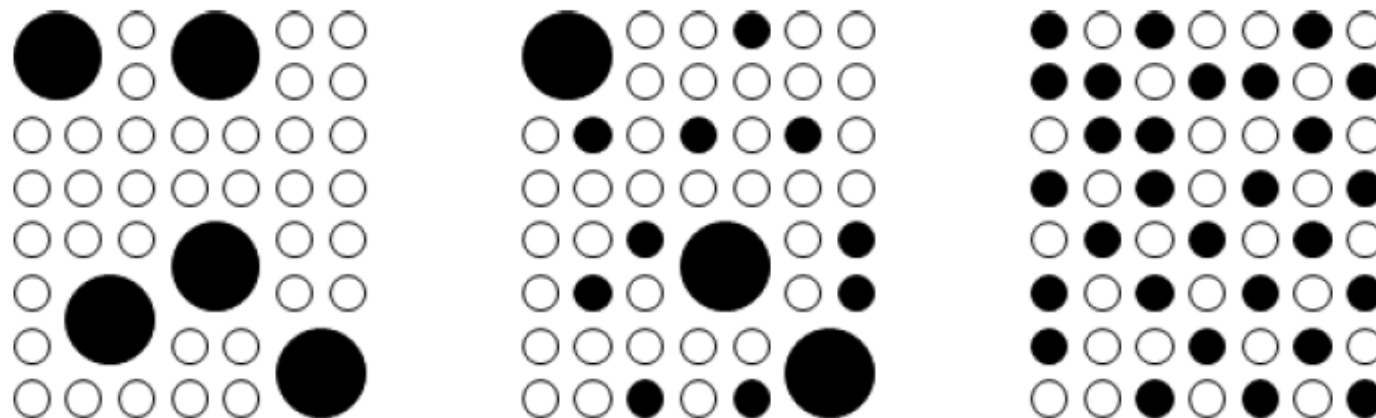
# Pobieranie próbek do analizy GMO

Rodzaje materiałów:

- „surowe” materiały np. nasiona
- półprodukty, dodatki do żywności np. skrobia kukurydziana, lecytyna sojowa
- żywność i pasze

Duże partie materiału- mały rozmiar próbki poddawanej analizie

## Charakterystyka materiału GM

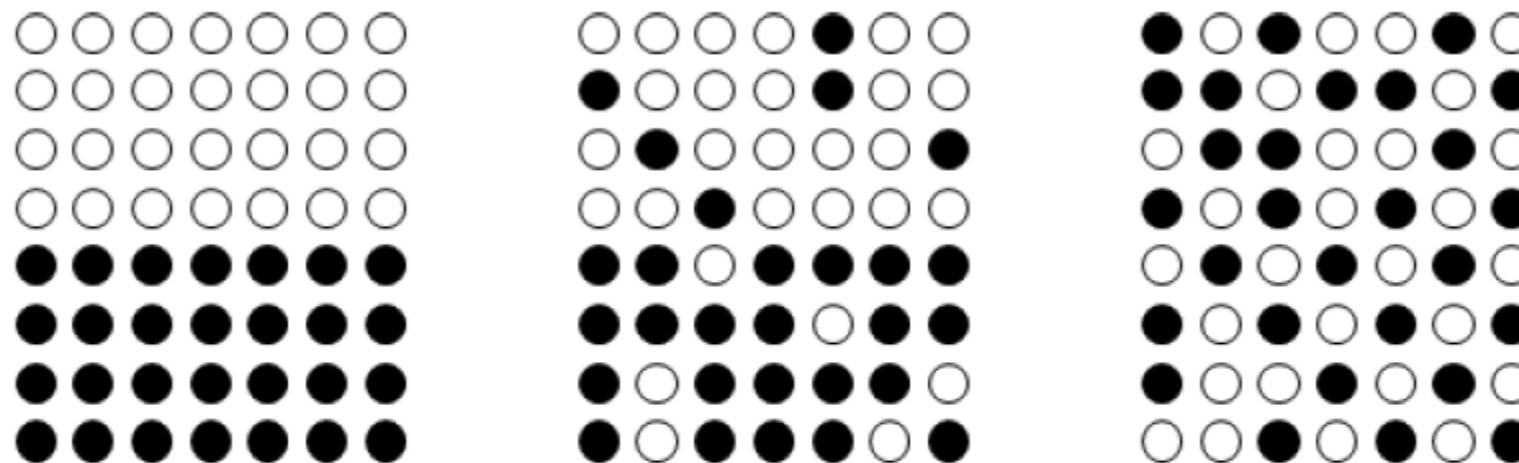


Heterogeniczność składu

- Rozdrabnianie (kruszenie/cięcie/mielenie) lub inne metody zmieniające fizyczne właściwości próbki
- Mieszanie nie wpływa na zmianę heterogeniczności składu prób



## Charakterystyka materiału GM

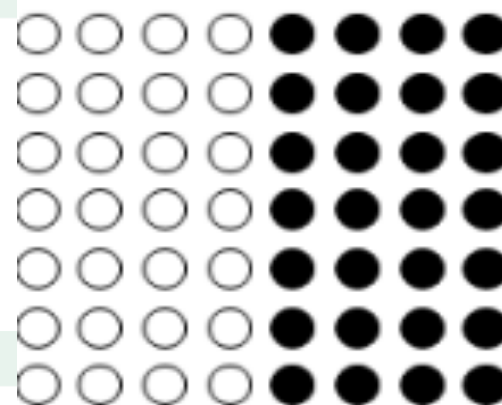
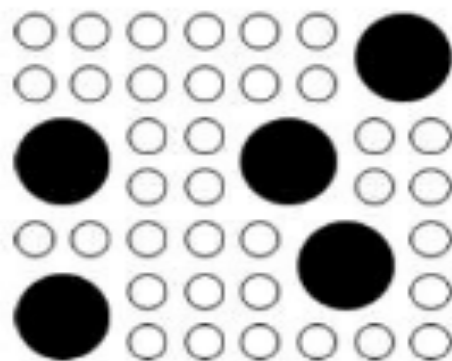


Heterogeniczność rozkładu

- Mieszanie ogranicza heterogeniczność rozkładu prób
- Podzielenie na mniejsze próby redukuje heterogeniczność rozkładu

## Błędy związane z charakterystyką analizowanego materiału

- Błędy wynikające z niejednorodności próbki
- Heterogeniczność składu- różna wielkość cząstek w próbce
- Heterogeniczność rozkładu- niejednorodny rozkład cząstek w próbce
- Stężenie analitu ma wpływ na wielkość błędu (im niższa zawartość docelowego analitu, tym większa niepewność pomiaru dla tego parametru)



## Procedury pobierania próbek do analizy GMO określają:

- Maksymalną wielkość partii materiału
- Wielkość i liczbę podpróbek z partii
- Wielkość próbki zbiorczej z partii
- Sposób utworzenia próbki laboratoryjnej
- Wielkość próbki laboratoryjnej
- Sposób postępowania z próbką laboratoryjną



European Commission

JRC TECHNICAL REPORT



**Guidelines for sample preparation procedures in GMO analysis**

*Prepared by the ENGL ad hoc working group on "sample preparation procedures"*

2014

Report EUR 27021 EN

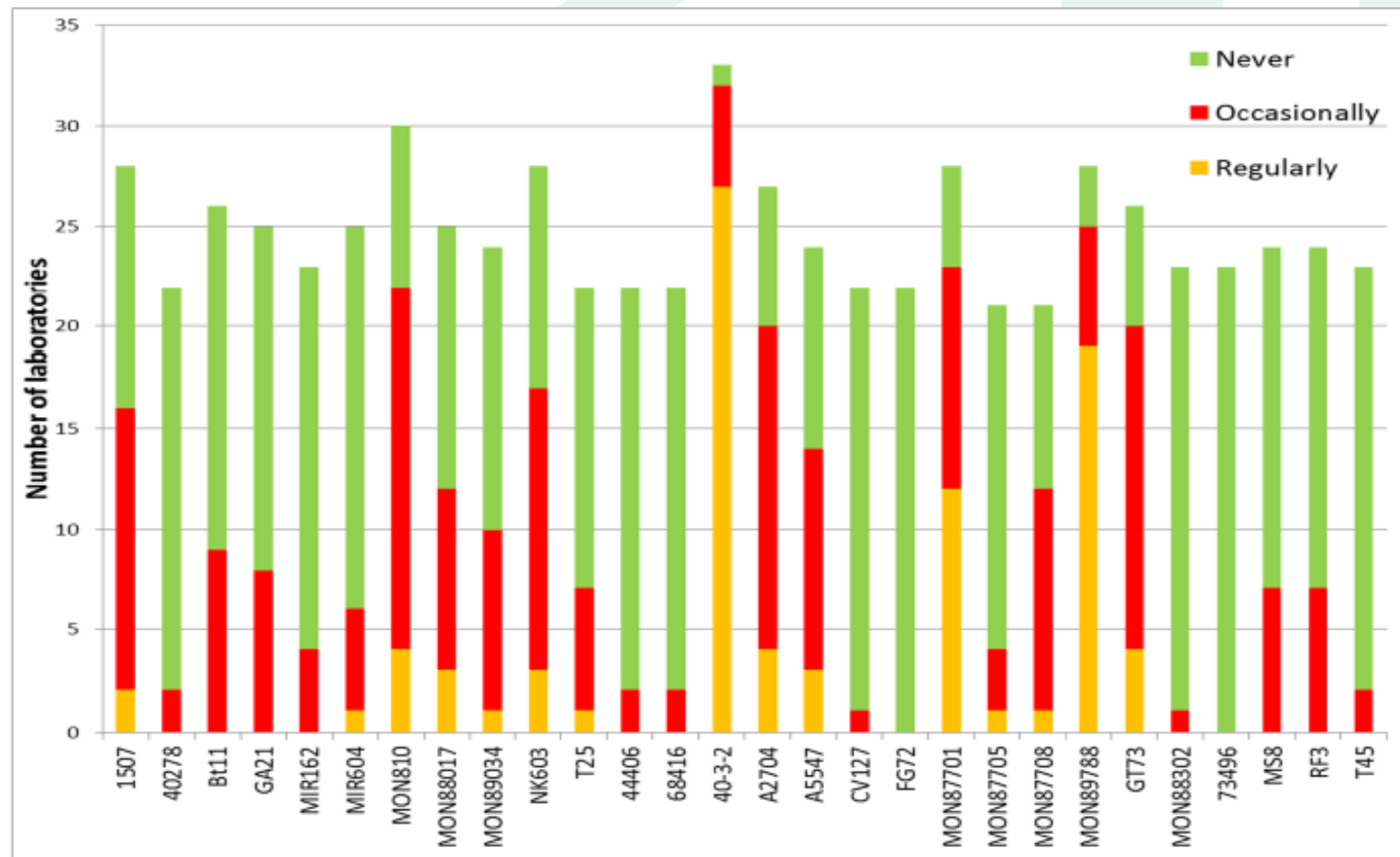


## Postępowanie z próbkami

Wytyczne dla przygotowania próbek w analizach GMO

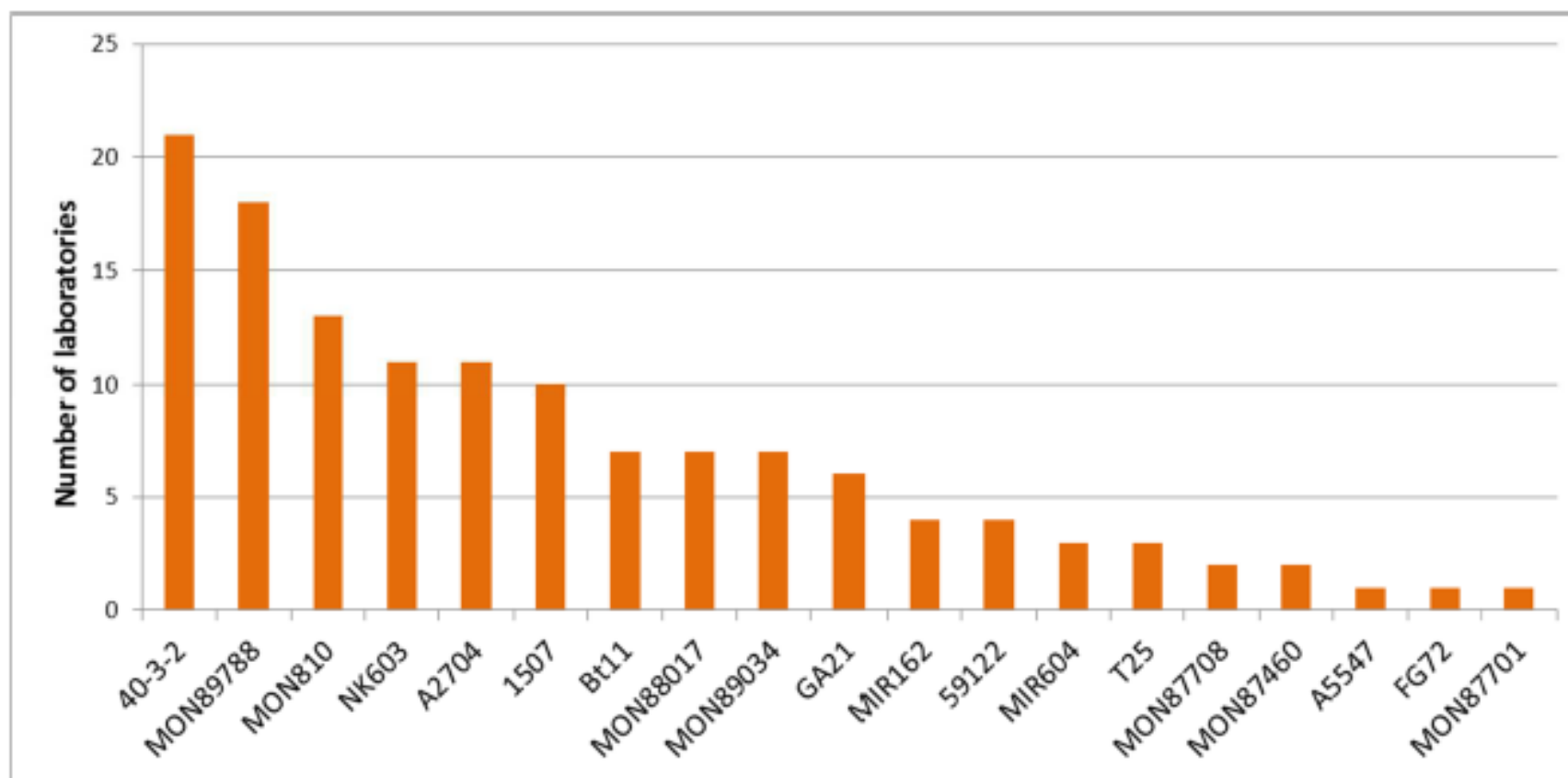
- Dokument powstał na podstawie ISO 6498:2012
- Procedury zaadaptowano dla żywności, pasz, nasion
- Najważniejsze procedury dotyczą: wielkości próbki laboratoryjnej, techniki zmniejszania masy próbki, rozdrabniania, mieszania

# GMO wykrywane w paszach - na podstawie ankiet w laboratoriach urzędowych UE w 2018





# GMO w żywności – na podstawie ankiet w laboratoriach urzędowych UE w 2018



## Analizy GMO - jakie wymagania?

Bez określenia wymagań, wykonanie analizy jest niemożliwe.

- Progi maksymalne (dozwolony poziom domieszek GM w produktach i w partii nasion)
- Tolerancja zerowa jest praktycznie niemożliwe do spełnienia, każda metoda ma LOD
- Jaka dokładność analizy jest konieczna? Czy chcemy analizować każde nasiono?
- Niepewność pomiaru?
- Jakie informacje są potrzebne do wykonania badania?
- Jakie koszty analizy jesteśmy w stanie zaakceptować?

- Dziękuję za uwagę!

KONTAKT: [A.Linkiewicz@ihar.edu.pl](mailto:A.Linkiewicz@ihar.edu.pl)