

Przedstawianie i interpretacja wyników badań

Sławomir Sowa

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin Państwowy Instytut Badawczy w Radzikowie (IHAR)

Szkolenie dla Inspekcji,

28.10.2022 Warszawa

Analizy molekularne - jakie wymagania?

Bez określenia wymagań wykonanie analizy jest niemożliwe

Przykład GMO

- Progi maksymalne (dozwolony poziom domieszek GM w produktach i w partii nasion)
- Jaka dokładność analizy jest konieczna?
- Jaka niepewność pomiaru jest akceptowana ?
- Jakie informacje są potrzebne do wykonania badania?
- Jakie koszty analizy jesteśmy w stanie zaakceptować?

Różne wyniki analiz?

- Szczególnie przy małych zawartościach GM możliwe jest otrzymanie różnych wyników przy powtórnej analizie tej samej próbki (wyniki niejednoznaczne)
- Różne mogą być również wyniki analiz wykonywanych przez różne laboratoria
- Harmonizacja metod?
- Progi znakowania nie powinny być zbyt niskie ponieważ niepewność analizy zwiększa się wraz ze spadkiem zawartości GM w próbce (rosną również koszty)

Analizy - raport

Jakie informacje mogą znaleźć się w raporcie z badań?

Jakich informacji nie można podawać w raporcie z badań?

- Jak pobierano próbę?
- Jaka jest metoda analityczna?
- Jaka jest niepewność pomiaru?
- Jaki jest limit wykrywalności LOD?
- Jaki jest limit oznaczalności LOQ?
- Wynik analizy
- Interpretacja wyniku?

Analizy PCR

- Poszukiwana sekwencja DNA (matryca) musi być obecna (PFU)
- Kontrola pozytywna
- Kontrola bez matrycy (woda)
- Kontrola izolacji
- Kontrola inhibicji reakcji
- minimalna liczba cykli
- wartość Ct dla reakcji qPCR
- krzywa topnienia

Reprezentatywna próbka

Podpróba, próba pierwotna:

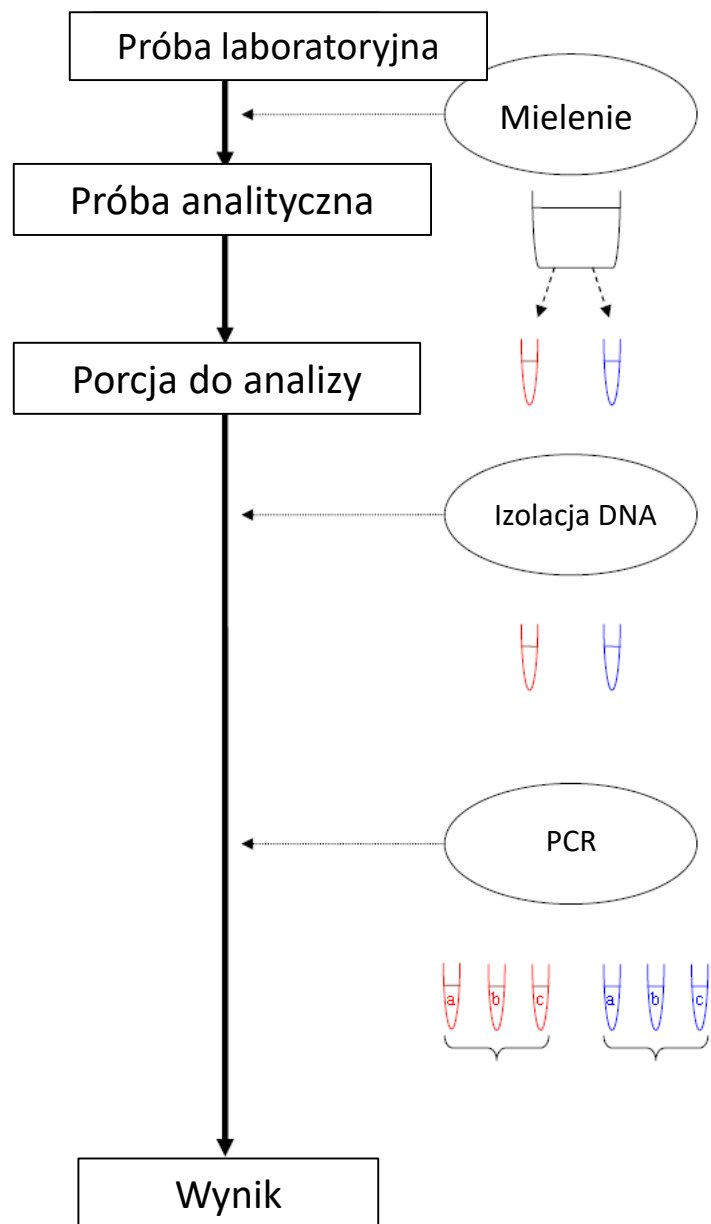
- Pojedyncza porcja pobrana losowo z partii

Próba laboratoryjna, próba złożona, próba mieszana

- Zbiór jednej lub wielu podprób pobrane z partii w celu wykonania analizy (reprezentatywna dla partii)

Próba analityczna

- Próba przygotowana z próbki laboratoryjnej poprzez mielenie (jeśli konieczne) i homogenizację.



Wynik analizy odnosi się do analizowanej próby!!!

Próba przygotowana do analizy. Część wykorzystana do ekstrakcji DNA w jednym czasie.

Powtórzenia izolacji DNA z różnych porcji do analizy uzyskanych z tej samej próby analitycznej.

Powtórzenia PCR, reakcje PCR przeprowadzone na tym samym powtórzeniu ekstrakcji DNA analizowane w różnych probówkach (dołkach)

Próbobiorca.
Metoda bopierania próby.

Etapy analizy

Porcja do analizy

- Próba przygotowana do testu lub analizy. Część wykorzystana do ekstrakcji DNA w jednym czasie.

Powtórzenia ekstrakcji

- DNA wyizolowane z różnych porcji do analizy pobrane z tej samej próbki analitycznej.

Powtórzenia PCR

- Reakcje PCR przeprowadzone na tych samych powtórzeniach ekstrakcji DNA w różnych probówkach reakcyjnych

Wynik testu

- Wynikiem testu jest wartość Ct lub liczba kopii uzyskana z powtórzenia reakcji PCR

Interpretacja wyniku - harmonizacja

- Pobieranie prób ?
- Ta sama metoda analityczna?
- Projektowanie analizy (powtórzenia, kontrole, etc)
- Niepewności pomiaru (szacowanie, wyrażanie)

- Przedstawianie wyniku
- Interpretacja wyniku

Przykład – rozporządzenie 619/2011/WE

Rozporządzenie 619/2011/WE Harmonizacja oficjalnej kontroli pasz GM

- 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

Harmonizacja istotna w przypadku polityki zero tolerancji dla nieautoryzowanego GMO w paszy

Rozporządzenie 619/2011

- Dotyczy tylko pasz GM;
- Ustala techniczne zero na poziomie 0,1% - najniższy poziom zawartości GM wykorzystywany w walidacji metod przez Europejskie Laboratorium Referencyjne
- Harmonizuje próbkobranie i analizy w celach oficjalnych kontroli na terenie EU
- Materiał genetyczny musi:
 - Być autoryzowany w kraju poza UE;
 - Mieć aktualny lub wygasły wniosek do EFSA (Rozp. 1829/2003);
 - Wniosek o autoryzację w trakcie rozpatrywania przez min 3 miesiące
 - Pozytywna opinia EFSA w zakresie oceny bezpieczeństwa dla zdrowia i środowiska przy obecności poniżej 0.1%;
 - Zwaliowane przez EU-RL GMFF metody analiz ilościowych;
 - Dostępność certyfikowanych materiałów referencyjnych

Rozporządzenie Komisji (UE) Nr 619/2011

- harmonizacja urzędowych kontroli pasz pod kątem wykrywania materiałów GM poprzez przyjęcie wspólnych metod pobierania próbek
- metody powinny się opierać na uznanych protokołach naukowych i statystycznych i normach międzynarodowych
- Powinny obejmować:
 - Poszczególne etapy pobierania próbek
 - Środki ostrożności, jakie należy podjąć
 - Warunki, w jakich pobiera się próbki pierwotne i laboratoryjne
 - Zasady obchodzenia się z próbkami laboratoryjnymi
 - Zasady zamykania i etykietowania próbek
- Szczególne warunki dostosowane do sposobu pakowania paszy- hurtowe opakowanie produktów rolnych lub opakowanie zbiorcze lub jednostkowe

Rozporządzenie Komisji (UE) Nr 619/2011

- minimalna wymagana wartość graniczna wydajności (MRPL)- najniższy poziom materiału GM brany pod uwagę przez LR-UE do zatwierdzenia metod ilościowych
- 0,1% ułamek masy materiału GM w paszy
- MRPL- najniższa ilość lub stężenie analitu w próbce, które urzędowe laboratoria mają wiarygodnie wykrywać i potwierdzać

Rozporządzenie Komisji (UE) Nr 619/2011

Załącznik I- Metody pobierania próbek

- Stosuje się załącznik I do rozporządzenia (WE) 152/2009
- Materiał zmodyfikowany genetycznie uznaje się za substancję z dużym prawdopodobieństwem nierównomiernie rozłożoną w paszy
- W drodze odstępstwa od pkt 5.B.3, 5.B.4 i 6.4 załącznika I do rozporządzenia (WE) nr 152/2009
 - wielkość próbek zbiorczych materiałów paszowych nie jest mniejsza niż masa odpowiadająca **35 000** ziaren
 - a próbka końcowa nie jest mniejsza niż masa odpowiadająca **10 000** ziaren

Rozporządzenie Komisji (UE) Nr 619/2011

Roślina	Masa [g] odpowiadająca 10 000 ziaren/nasion	Masa [g] odpowiadająca 35 000 ziaren/nasion
Jęczmień, proso, owies, ryż, żyto, pszenica	400	1400
Kukurydza	3000	10500
Soja	2000	7000
Rzepak	40	140

Rozporządzenie Komisji (UE) Nr 619/2011

Załącznik II, A- Przygotowanie próbek do analizy

Stosuje się wymogi rozporządzenia (WE) nr 152/2009

1. Przygotowanie próbki końcowej

Urzędowe laboratoria stosują normy EN ISO 24276, ISO 21570, ISO 21569, ISO 21571, które wskazują strategie homogenizacji próbki laboratoryjnej, ograniczenia próbki laboratoryjnej do analitycznej, przygotowania próbki badawczej oraz ekstrakcji i badania docelowego analitu

2. Wielkość próbki do analizy

Powinna gwarantować oznaczenie ilościowe materiału zmodyfikowanego genetycznie przy obecności na poziomie MRPL (0,1%) przy statystycznym poziomie ufności 95%.

Rozporządzenie Komisji (WE) nr 152/2009
ustanawiające metody pobierania próbek i dokonywania analiz do celów urzędowej kontroli pasz

Pobieranie próbek (załącznik I)

•Personel

Próbki pobierane są przez osoby upoważnione do tego celu przez państwa członkowskie

•Aparatura i sprzęt

Sprzęt do pobierania próbek musi być wykonany z materiałów, które nie zanieczyszczą kontrolowanego produktu. Taki sprzęt może być urzędowo zatwierdzony przez państwa członkowskie.

Rozporządzenie Komisji (WE) nr 152/2009

ustanawiające metody pobierania próbek i dokonywania analiz do celów urzędowej kontroli pasz

Próbki zbiorcze Liczba p.z. różni się w zależności od rozmiaru kontrolowanej partii. Całkowita waga próbek pierwotnych tworzących każdą próbkę zbiorczą jest nie mniejsza niż 4 kg.

Wielkość próbek zbiorczych	
Pasze sypkie	
Waga partii [t]	Min. liczba próbek zbiorczych
Do 1	1
1- 10	2
10- 40	3
>40	4
Pasze opakowane	
Rozmiar partii [ilość opakowań]	Min. liczba próbek zbiorczych
1- 16	1
17- 200	2
201- 800	3
>800	4

Wielkość próbki zbiorczej \geq masa 35 000 nasion

Rozporządzenie Komisji (WE) nr 152/2009
ustanawiające metody pobierania próbek i dokonywania analiz do celów
urzędowej kontroli pasz

Próbki końcowe

- Otrzymywane z każdej próbki zbiorczej w wyniku redukcji.
- Wymagana analiza przynajmniej 1 próbki końcowej na próbkę zbiorczą
- Waga próbki końcowej do analizy ≥ 500 g

Próbka końcowa \geq masa 10 000 nasion



JRC SCIENCE AND POLICY REPORTS

Revised Guidance on the Detection of Genetically Modified Rice Originating from China Using Real-Time PCR for the detection of P-35S, T-nos and Cry1Ab/Ac

Antoon Lievens
Marco Mazzara
Joachim Kreysa

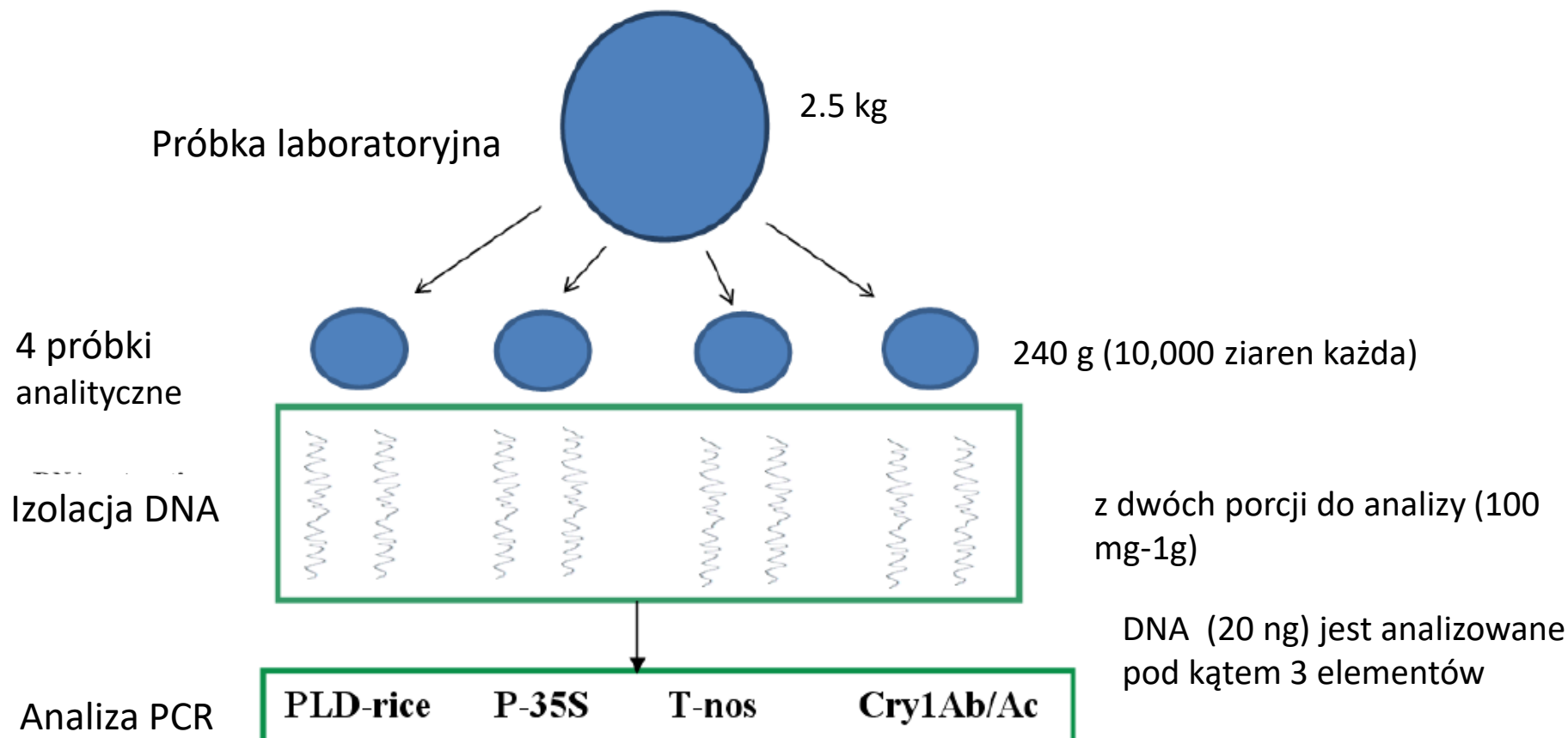
2014



- Produkty ryżowe pochodzące z Chin zanieczyszczone nieautoryzowanym ryżem Bt63, RASFF z 2006 – Decyzja Komisji 2008/289/EC
- Ryż linie: Kefeng6, Kemingdao1, RASFF. Decyzja Komisji 2011/884/EU
- Brak info. dotyczącej struktury molekularnej, sekwencji nukleotydów, certyfikowane materiały referencyjne
- Nowa Decyzja Komisji 2013/287/EU uaktualnia i wyjaśnia metody detekcji (minimalizując możliwość pojawienia się fałszywie pozytywnych wyników)

Procedura skryningu PCR w celu wykrycia obecności ryżu GM w produktach pochodzących z Chin

Partie ryżu – produkty z ziarnem



Wynik analizy real-time PCR skринing (3 przykładowe wyniki)

Product A	Subsample 1	Subsample 2	Subsample 3	Subsample 4
PLD-rice	+/+	+/+	+/+	+/+
P-35S	-/-	-/-	-/-	-/-
T-nos	-/-	-/-	-/-	-/-
CryIAb/Ac	-/-	-/-	-/-	-/-

Outcome:
No positive
results

Conclusion:
GM negative

Product B	Subsample 1	Subsample 2	Subsample 3	Subsample 4
PLD-rice	+/+	+/+	+/+	+/+
P-35S	-/-	-/-	-/-	-/-
T-nos	-/-	+/+	-/-	-/-
CryIAb/Ac	-/-	+/+	-/-	-/-

Outcome:
Positive
results

Conclusion:
GM positive

Product C	Subsample 1	Subsample 2	Subsample 3	Subsample 4
PLD-rice	+/+	+/+	+/+	+/+
P-35S	-/-	-/-	-/-	-/-
T-nos	+/-	-/-	-/-	+/+
CryIAb/Ac	-/-	-/-	-/-	+/+

Outcome:
Positive
results

Conclusion:
GM positive

Product D	Subsample 1	Subsample 2	Subsample 3	Subsample 4
PLD-rice	+/+	+/+	+/+	+/+
P-35S	-/-	-/-	-/-	-/-
T-nos	+/+	-/-	-/-	-/-
CryIAb/Ac	-/-	-/-	-/-	-/-

Outcome:
Dissimilar
result

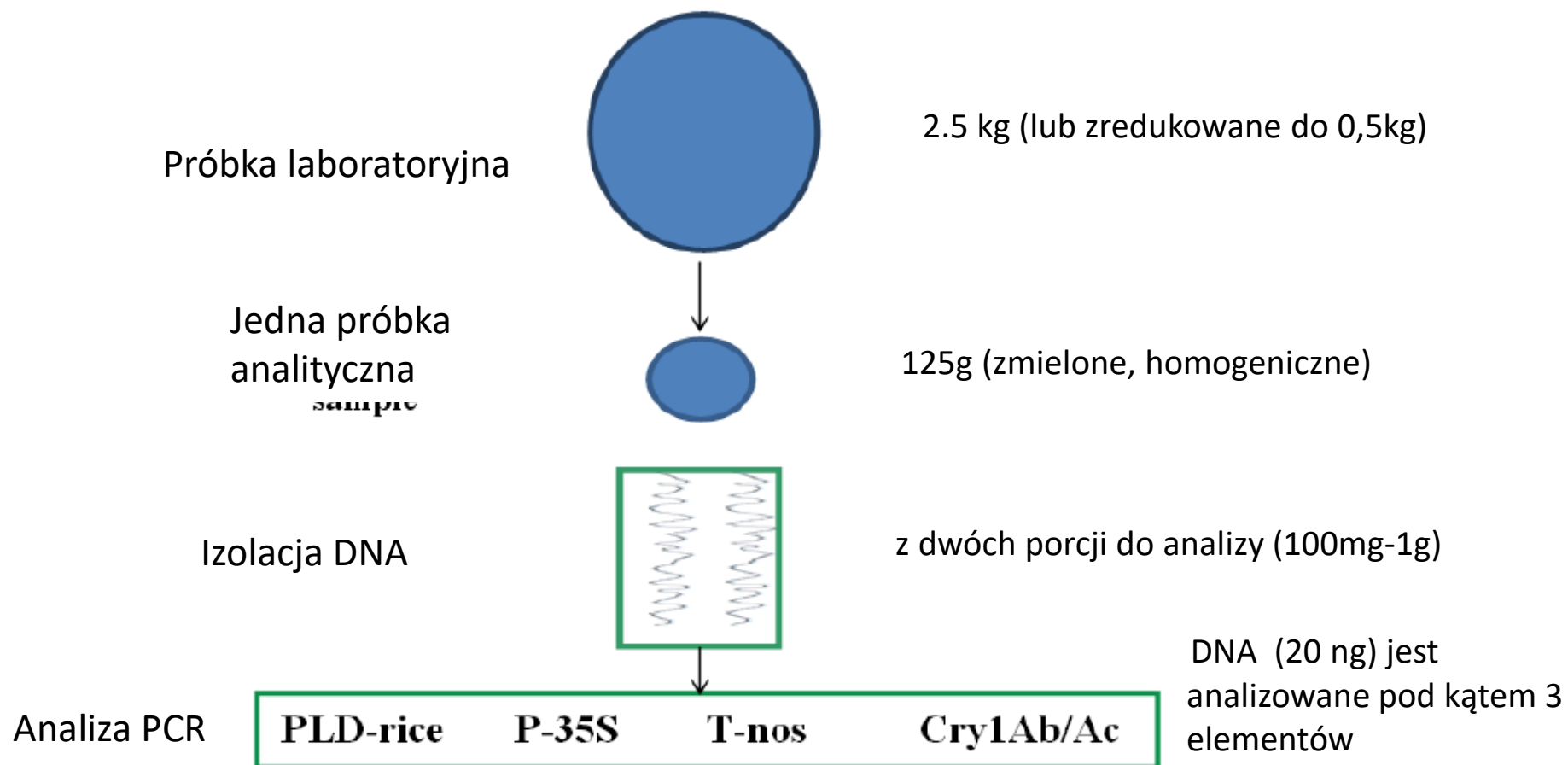
Conclusion:

Retest: if "+"
if "-"

GM positive
GM negative

Procedura skryningu PCR w celu wykrycia obecności ryżu GM w produktach pochodzących z Chin

Partie ryżu – produkty przetworzone



Wynik skryningu real-time PCR (3 przykładowe wyniki)

konkluzja

Product A	Sample A	GM negative
PLD-rice	+/+	
P-35S	-/-	
T-nos	-/-	
Cry1Ab/Ac	-/-	GM positive
Product B	Sample B	
PLD-rice	+/+	
P-35S	+/+	
T-nos	-/-	GM positive
Cry1Ab/Ac	-/-	
Product C	Sample C	
PLD-rice	+/+	
P-35S	-/-	GM positive
T-nos	-/-	
Cry1Ab/Ac	+/+	

Jak poprawnie wykonać analizę

- Wiedza naukowa
- Znajomość regulacji prawnych
- Odpowiednio dobrane wyposażenie
- Zwalidowane metody
- Personel i jego kompetencje
- Zarządzanie (jakość i organizacja)
- Koszty

Stosowanie metod analizy i wyrażanie wyników

1. Warunki ogólne

Urzędowe laboratoria muszą :

- być zgodne z wymogami ISO 17025 i stosować ilościowe metody analizy, które zostały zatwierdzone przez laboratorium referencyjne Unii Europejskiej we współpracy z europejską siecią laboratoriów dla GMO.
- gwarantować, że są w stanie przeprowadzić wystarczająco precyzyjnie (względne odchylenie standardowe w warunkach powtarzalności mniejsze lub równe 25 %) analizę na poziomie 0,1 % ułamka masy materiału zmodyfikowanego genetycznie w paszy.

2. Zasady interpretacji wyników

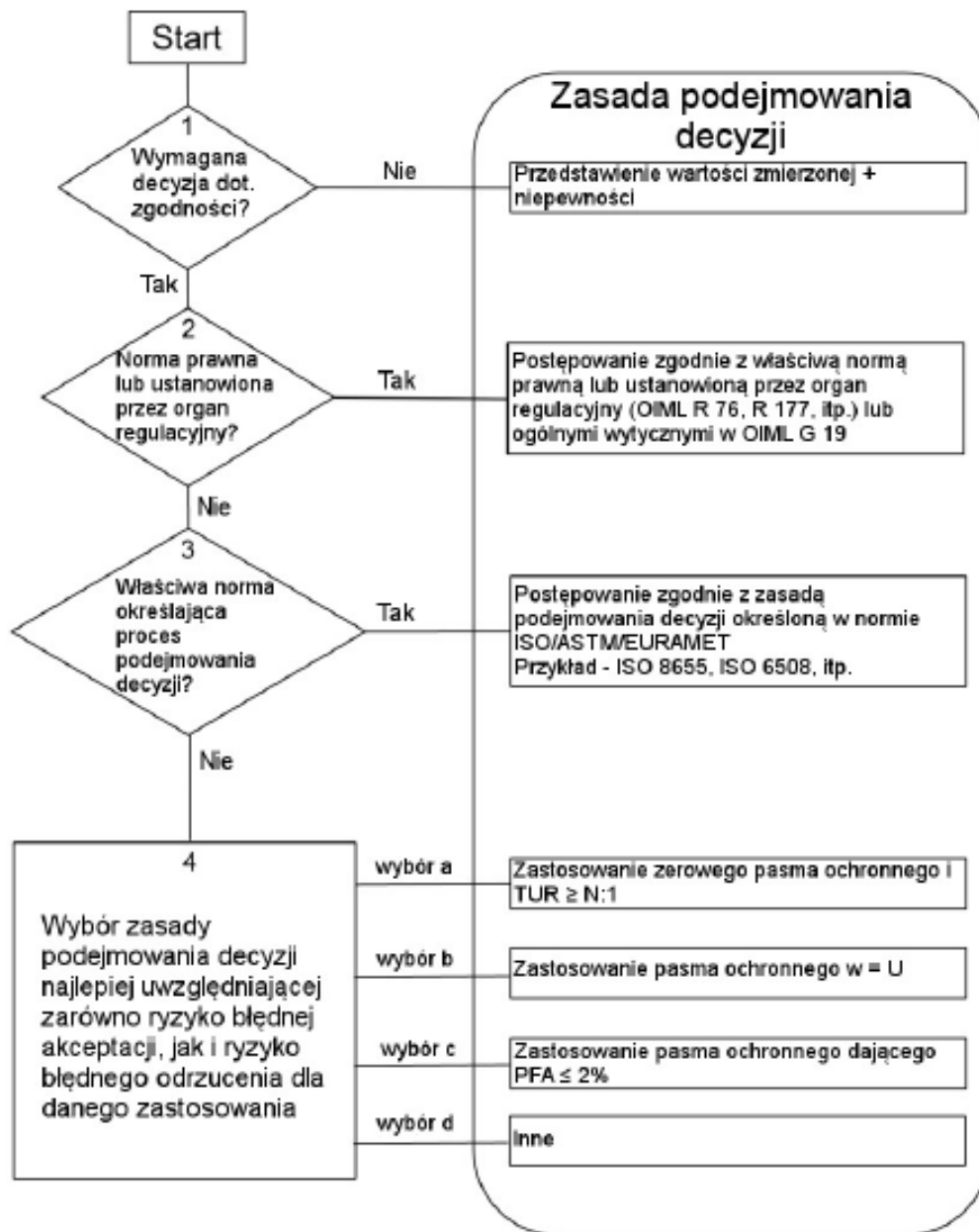
Aby zapewnić poziom ufności około 95 %, wynik analizy należy zapisać jako $x \pm U$, gdzie x oznacza wynik analizy dla jednego zdarzenia transformacyjnego, a U oznacza odpowiednią rozszerzoną niepewność pomiaru.

Stwierdzenie zgodności - norma PN-EN ISO/IEC17025:2018-02

Laboratorium powinno przedstawiać stwierdzenie zgodności w taki sposób, aby stwierdzenie jasno identyfikowało:

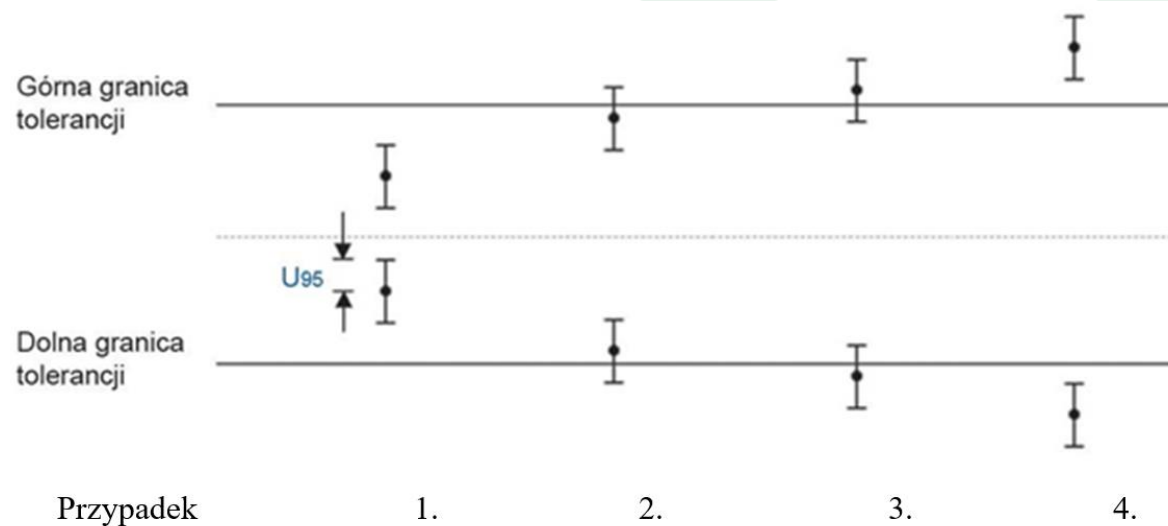
- do których wyników odnosi się stwierdzenie zgodności,
- które specyfikacje, normy bądź ich części są spełnione, a które nie,
- zastosowaną zasadę podejmowania decyzji (o ile nie jest ona właściwie określona we wskazanej specyfikacji lub normie).

Zasada podejmowania decyzji – reguła opisująca w jaki sposób wartość niepewności pomiaru jest uwzględniana przy określaniu zgodności z wyspecyfikowanymi wymaganiami



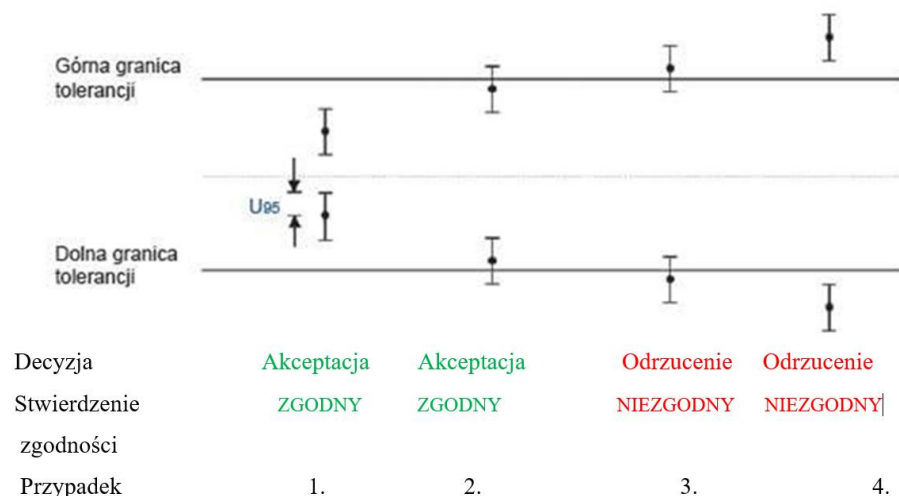
Schemat postępowania przy stwierdzaniu zgodności ze specyfikacją

Stwierdzenie zgodności



1. Wynik wraz z przedziałem niepewności rozszerzonej pomiaru zawiera się w granicach tolerancji.
2. Wynik nominalny zawiera się w granicach tolerancji a przedział niepewności rozszerzonej pomiaru przechodzi przez granicę tolerancji.
3. Wynik nominalny jest poza granicami tolerancji, a przedział niepewności rozszerzonej zawiera się częściowo w granicach tolerancji.
4. Wynik wraz z przedziałem niepewności rozszerzonej pomiaru znajduje się w całości poza granicami tolerancji.

Zasada prostej akceptacji



- Laboratorium stwierdza jego zgodność gdy wynik pomiaru znajduje się poniżej granicy (lub w przedziale określonej tolerancji).
- Laboratorium odrzuca wynik (stwierdza jego niezgodność), gdy znajduje się on powyżej ustalonej granicy (lub poza przedziałem określonej tolerancji).
- Przy zastosowaniu tej zasady stwierdzenia zgodności dla wyników pomiarów mogą być przedstawione jako:
 - **Akceptacja (ZGODNY)** – uzyskane wyniki mieszczą się w granicy danej tolerancji. Ryzyko błędnej akceptacji wynosi do 50% w przypadku wyników zbliżonych do granicy tolerancji.
 - **Odrzucenie (NIEZGODNY)** - jeden lub więcej wyników jest poza granicą tolerancji. Ryzyko błędnego odrzucenia wynosi do 50% w przypadku wyników zbliżonych do granicy tolerancji.

Zasada podejmowanie decyzji w oparciu o pasmo ochronne (guard band)

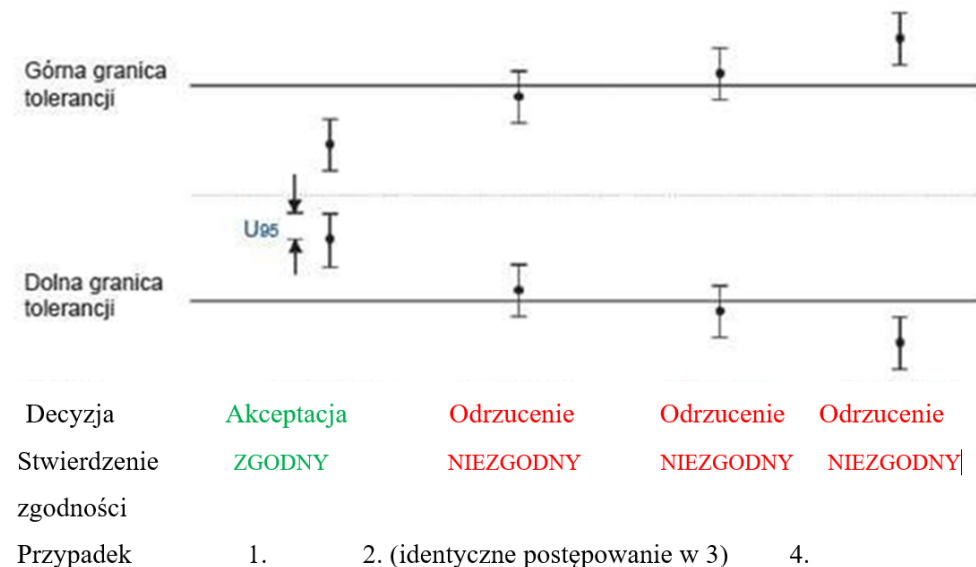
W tej zasadzie wykorzystywane jest tzw. pasmo ochronne „guard band”, które pozwala na ustalenie strefy akceptacji i strefy odrzucenia. W tej instrukcji przyjęto, że pasmo ochronne stanowi wartość niepewności.

- wartości między górną granicą oraz górnym przedziałem niepewności stanowią pasmo ochronne górne.
- wartości między dolną granicą oraz dolnym przedziałem niepewności stanowią pasmo ochronne dolne.

Zasada podejmowanie decyzji w oparciu o pasmo ochronne (guard band)

Podejście pierwsze

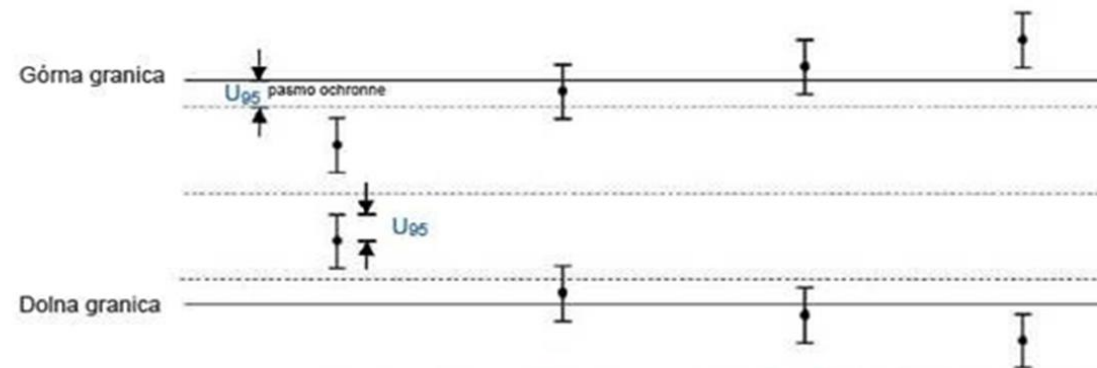
- Akceptacja (zgodność) z uwzględnieniem pasma ochronnego przy 95% poziomie ufności (U95); wynik pomiaru znajduje się w strefie akceptacji. Ryzyko błędnej akceptacji wynosi poniżej 2,5%.
- Odrzucenie (niezgodność) z uwzględnieniem pasma ochronnego przy 95% poziomie ufności (U95); wynik pomiaru znajduje się w strefie odrzucenia. Ryzyko błędnego odrzucenia wynosi poniżej 2,5%.
- Jeżeli wynik pomiaru znajduje się w strefie odrzucenia, pewność stwierdzenia niezgodności tego wyniku z wymaganiem jest bliska 97,5%. Ryzyko błędnego odrzucenia jest mniejsze niż 2,5%.



Zasada podejmowanie decyzji w oparciu o pasmo ochronne (guard band)

Podjęcie drugie

- Dopuszczona jest warunkowa akceptacja (warunkowa zgodność) oraz warunkowe odrzucenie (warunkowa niezgodność). Stan ten jest orzekany, jeżeli wynik znajduje się w paśmie ochronnym przy odpowiedniej strefie akceptacji lub odrzucenia.
- Akceptacja (zgodność)** – wynik znajduje się w strefie akceptacji. Ryzyko błędnej akceptacji wynosi poniżej 2,5%.
- Warunkowa akceptacja** – wynik mieści się w polu tolerancji w paśmie ochronnym przy 95% poziomie ufności (U_{95}). Jednak rozszerzona niepewność wyniku przekroczyła granicę tolerancji. Dla wyniku bliskiego granicy tolerancji, ryzyko błędnego przyjęcia wynosi do 50%.
- Warunkowe odrzucenie** – wynik znajduje się poza granicami tolerancji. Jednak rozszerzona niepewność wyniku znajduje się w polu tolerancji w paśmie ochronnym przy 95% poziomie ufności (U_{95}). Dla wyniku bliskiego granicy tolerancji, ryzyko błędnego odrzucenia wynosi do 50%.
- Odrzucenie (niezgodność)** – wynik znajduje się w strefie odrzucenia. Ryzyko błędnego odrzucenia wynosi poniżej 2,5%.



Decyzja	Akceptacja	Warunkowa Akceptacja	Warunkowe odrzucenie	Odrzucenie
Stwierdzenie zgodności	ZGODNY	ZGODNY WARUNKOWO	NIEZGODNY	NIEZGODNY
Przypadek	1.	2.	3.	4.

Zasada - akceptowanie wyniku poza granicami tolerancji, z przedziałem niepewności rozszerzonej zawierającej się częściowo w granicach tolerancji

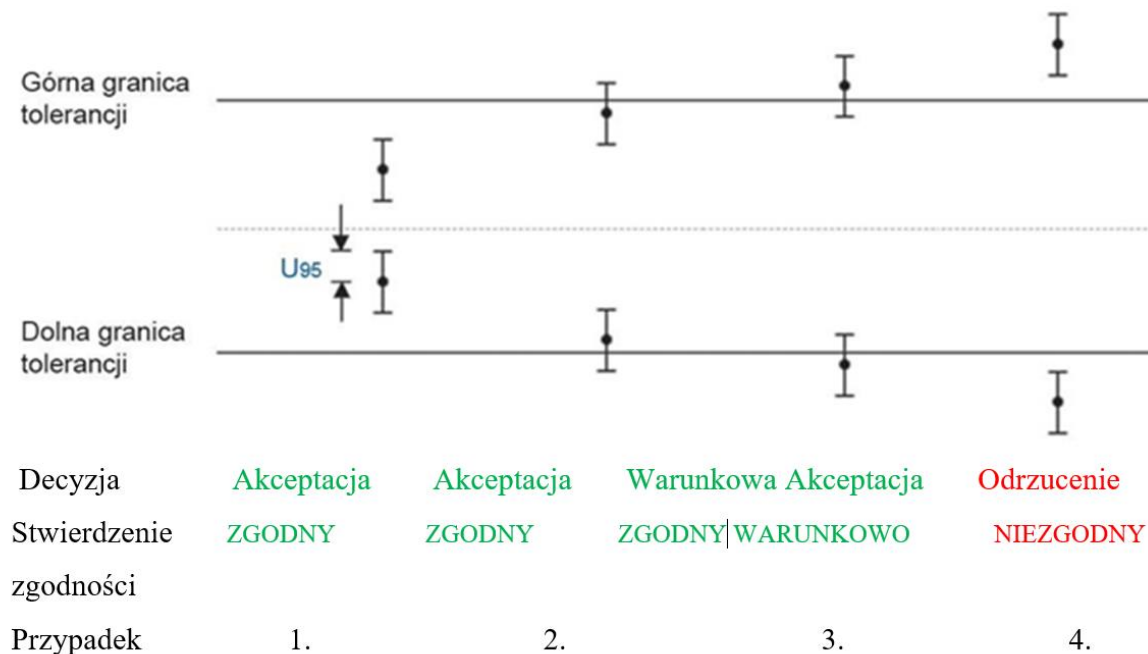
Zasada przyjmuje założenia przewodnika "Guidance document for complement authorities for the control of compliance with EU legislation on aflatoxins" wyd. Nov. 2010

Zgodność:

- wynik wraz z przedziałem niepewności rozszerzonej pomiaru zawiera się w granicach tolerancji. Ryzyko błędnej akceptacji wynosi do 2,5 %,
- wynik nominalny zawiera się w granicach tolerancji a przedział niepewności rozszerzonej pomiaru przechodzi przez granicę tolerancji. Ryzyko błędnej akceptacji wynosi do 50% w przypadku wyników zbliżonych do granicy tolerancji.

Warunkowa zgodność:

- wynik nominalny jest poza granicami tolerancji, a przedział niepewności rozszerzonej zawiera się częściowo w granicach tolerancji. Ryzyko błędnej akceptacji wynosi do 95%.
- Odrzucenie - wynik wraz z przedziałem niepewności rozszerzonej pomiaru znajduje się w całości poza granicami tolerancji. Ryzyko błędnego odrzucenia wynosi do 2,5%.



Przedstawianie opinii i interpretacji wg normy PN-EN ISO/IEC17025:2018-02

- Opinie i interpretacje mogą być wydawane przez upoważniony do tego personel.
- Laboratorium powinno udokumentować podstawy wydawania opinii i interpretacji.
- Opinie i interpretacje powinny opierać się o uzyskane wyniki badań.

Dziękuję za uwagę

Sławomir Sowa
e-mail: s.sowa@ihar.edu.pl

Radzików
05-870 Błonie
tel. +48 22 733 45 00
NIP: 5290007029
REGON: 000079480
e-mail: postbox@ihar.edu.pl
www.ihar.edu.pl