

# Modernizacja i aktualizacja metodyk analizy GMO oraz wydawanie opinii w 2008-2013

- **Problem:** Ocena wprowadzania do uprawy roślin GM
- **Symbol tematu:** 3-4-00-0-03
- Zakład Biotechnologii i Cytogenetyki Roślin
- Laboratorium Kontroli GMO

Kierownik obszaru: prof. dr hab. Janusz Zimny

kierownik tematu: dr Sławomir Sowa



# Cel zadania

- umożliwienie realizacji postanowień zawartych w Dyrektywie 2001/18/WE, Rozporządzeniu 1829/2003/WE, Rozporządzeniu 1830/2003/WE oraz **sprawnego funkcjonowania państwowych służb kontroli w tym zakresie.**
- **dostarczenie naukowych danych** dotyczących możliwości analiz nowych modyfikacji ( np. odmian typu „stacked” zawierających więcej niż jeden gen) znajdujących się w procesie autoryzacji w UE, uwzględniając specyfikę potrzeb różnych państwowych służb kontrolnych.
- **zapewnienie zgodności** z wymogami Rozporządzenia 1981/2006/WE oraz z wytycznymi normy PN-EN ISO/IEC 17025 dla laboratoriów badawczych i wzorcujących

# 1. przygotowywanie metodyk służących wykrywaniu GMO

**Zwalidowano 28 metod ilościowych Real Time PCR specyficznych dla GMO autoryzowanych w UE jako żywność i pasza.**

## **kukurydza (16)**

- MON810, TC1507, NK603, MIR604, MON863, T25, GA21, 59122, MON88017, MON89034, 3272; MON863xMON810, Bt11, Bt176, MIR162, 98140

## **soja (6)**

Roundup Ready40-3-2, MON89788, 356043, A5547-127, MON87701, A2704-12

## **rzepak (3) RT73, T45, Ms8xRf3**

## **burak cukrowy H7-1**

## **ziemniak EH92-527-1**

## **ryż LL62**

# Walidacja metod ilościowych

- Obejmowała : zakres roboczy, zakres liniowy, granicę oznaczalności, poprawność, czułość, specyficzność, precyzję i powtarzalność.
- Oszacowano niepewność dla zwalidowanych metod.
- dla zwalidowanych metod ilościowych wyznaczana jest precyzja na poziomie 0,1% modyfikacji genetycznej (zgodnie z rozporządzeniem komisji nr 619/2011 oraz wytycznymi EURL- GMFF) oraz empiryczne granice wykrywalności.
- Metody walidowano sukcesywnie w miarę pojawiania się kolejnych materiałów referencyjnych i walidacji przeprowadzonych przez Laboratorium Referencyjne Unii Europejskiej

# Zwalidowano metody screeningowe

## 5 elementów

- promotor 35S,
- terminator NOS,
- gen bar,
- konstrukt CTP2-CP4EPSPS,
- konstrukt 35S-pat

Metody te pozwalają na wykorzystanie programów komputerowych zbudowanych na zasadzie macierzy do identyfikacji autoryzowanych i nieautoryzowanych GMO (GMO Seek, GMO Finder i inne)

# Udział LKGMO w oficjalnych walidacjach nowych metod analitycznych w UE

**LKGMO pełni rolę Krajowego Laboratorium Referencyjnego zgodnie z Rozporządzeniem (UE) nr 1981/2006 i bierze udział w oficjalnych walidacjach metod analiz GMO jako element autoryzacji GMO w UE. Walidacja prowadzona we współpracy z EURL-GMFF JRC KE**

## **2008-2013 uczestniczono w walidacji 11 metod GMO:**

- soi (A5547-127, MON87769, 356043, 305423, FG72),
- kukurydzy (98140, MIR 162),
- bawełny (T304-40, MON88701),
- wysuszonej biomasy bakteryjnej *E. coli* (PT73 TM, PL73 LM)
- wielo-zadaniowego systemu Real Time PCR do detekcji autoryzowanych i nieautoryzowanych GMO na rynku Unii Europejskiej.
- Wyniki w postaci protokołu walidacyjnego i gotowej do użycia metody będą dostępne na stronach <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/>.



# European Union Reference Laboratory *for GM Food & Feed*

[Home](#) [Legal basis](#) [Guidance documents](#) [Status of dossiers](#) [Methods database](#) [Contacts](#)

Main Search  for  Select by GMO Unique Identifier:

## GMOMETHODS: EU Database of Reference Methods for GMO Analysis

### Quantitative GMO detection PCR methods

- GMO specific
  - Event specific
    - Maize
    - Soybean
    - Cotton
    - Oilseed rape
    - Potato
    - Rice
    - Sugar beet
  - Construct specific
  - Element specific
- Taxon specific
  - Validated independently
  - Validated in combination with other method(s)

### Qualitative GMO detection PCR methods

- GMO specific
  - Event-specific
  - Construct-specific
  - Element-specific
    - Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter
    - Figwort Mosaic Virus 35S promoter
    - Chloroplast tRNA-Leu intron
    - Neomycin phosphotransferase II gene
    - Nopaline synthase terminator
    - Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter and nopaline synthase terminator (partim T-nos)
    - Phosphinothricin N-acetyltransferase gene
- Taxon specific
  - Validated independently
  - Validated in combination with other method(s)
  - Plant-specific

Released the GMOMethods app for iPad on 20-12-2011.



### Last update

Date	ID	Description
22/12/2011	QT-EVE-ZM-005	Quantitative PCR method for detection of maize event MON87460 (Savini et al., 2011)
22/12/2011	QT-EVE-GM-003	Quantitative PCR method for detection of soybean event MON87705 (Savini et al., 2011)
15/12/2011	QL-EVE-ZM-002	Qualitative PCR method for detection of maize event

## 2. wykonywanie analiz i badań oraz wydawanie opinii w zakresie GMO, w przypadku zaistnienia rozbieżności, kwestionowania lub potrzeby potwierdzenia wyników uzyskanych na podstawie analiz i badań wykonanych przez inne laboratoria

- Analizy na zlecenie PIORIN (**rzepak, gorczyca, kukurydza**)
- na wniosek MRiRW konsultacje dla PIORIN połączone z wykonaniem analiz ilościowych przesłanych próbek rzepaku pod kątem wskazanych modyfikacji (**modyfikacja GT73**).
- wykonano na zlecenie Państwowej Inspekcji Sanitarnej analizy materiału pod kątem soi **Roundup Ready 2 Yield MON-89788-1 i kukurydzy GMO**
- na wniosek Głównego Inspektora PIORIN opracowano wytyczne do przeprowadzania urzędowych kontroli plantacji produkcyjnych kukurydzy
- analiza pozytywnych próbek kukurydzy **MON810** uzyskanych w trakcie kontroli plantacji przez PIORIN w 2013
- Przygotowanie opinii dla PIORIN w sprawie zastosowania materiału siewnego **MON810**
- Analizy na zlecenie inspekcji z Litwy



### 3. przechowywanie i udostępnianie wzorców fragmentów DNA dla techniki PCR, które pozwolą na identyfikację rodzajów wprowadzonej modyfikacji genetycznej,

#### Rejestr wzorców DNA/certyfikowanych materiałów odniesienia LKGMO

- materiały odniesienia dostępne w Instytucie Materiałów Referencyjnych (IRMM) o określonych zawartościach GMO,
- materiały referencyjne z American Oil Chemists Society,
- materiały referencyjne w postaci plazmidów,
- materiały DNA, które mogą służyć jako kontrole przy identyfikacji niektórych nieautoryzowanych modyfikacji genetycznych.
- przechowywano w celu kontroli 28 wzorców plazmidowych dla różnych modyfikacji genetycznych.

# Wdrażanie nowych metod służących wykrywaniu GMO

- metody oparte na analizie ELISA, służące analizie materiału roślinnego i gleby pod kątem obecności białka Cry1Ab.
- metoda analiz półilościową SeedCalc, która jest stosowana do analiz materiału siewnego pod kątem zawartości GMO.
- metoda izolacji białka z gleby i oznaczania ilościowego metodą ELISA .
- metoda izolacji DNA z miodu i oznaczania GMO w miodzie
- porównano parametry dwóch metod izolacji DNA- wysokoprzepustowej metody izolacji DNA na wielopłytkach przy wykorzystaniu zrobotyzowanego systemu Techne oraz metody izolacji w oparciu o zestaw Nucleo Spin Food Macherey Nagel



## 5. zorganizowanie szkolenia pracowników laboratoriów służb kontrolnych w zakresie nowych metod analiz i badań

1. Genetycznie zmodyfikowane rośliny w środowisku rolniczym w świetle obowiązującego prawa (17.12.2008).
2. Mikroukłady DNA DualChip® firmy Eppendorf w analizach GMO - ćwiczenia praktyczne (1.12. 2009).
3. Problematyka oceny niepewności pomiaru w analizach GMO (2.12. 2009).
4. Podstawy analiz genetycznie zmodyfikowanych organizmów, które składało się z części wykładowej i praktycznego szkolenia laboratoryjnego z wykrywania kukurydzy MON810 metodą PCR w czasie rzeczywistym (19.10.2010).
5. Wymagania metodyczne w odniesieniu do niskich zawartości nieautoryzowanych GMO w paszach zgodnie z Rozporządzeniem Komisji (UE) nr 619/2011 z dnia 24 czerwca 2011 r. (5.12.2011).
6. Interpretacja wyników badań międzylaboratoryjnych. (6.12.2011).
7. Quality Management - ISO 17025 accreditation wspólnie z European Commission Directorate General Joint Research Centre Institute for Health and Consumer Protection I03 – Molecular Biology and Genomics Unit 1/4 (4-6.06 2012).
8. Efektywne strategie wykrywania i identyfikacji genetycznie zmodyfikowanych organizmów-szkolenie dla pracowników Inspekcji i laboratoriów (27.11.2012).
9. Wspólnie z Głównym Inspektorem Ochrony Roślin i Nasiennictwa oraz Ministerstwem Rolnictwa i Rozwoju Wsi „Nadzór i kontrola stosowania materiału siewnego - zakaz uprawy kukurydzy odmian GM” (17.04.2013).
10. Metody próbkobrania i izolacja DNA (3.10.2013)



## 6. współpraca z laboratoriami referencyjnymi innych państw członkowskich (konsultacje, wizyty, organizowanie wykładów)

- utrzymywano kontakt z laboratoriami referencyjnymi innych państw członkowskich wpisanych do Rozporządzenia (WE) 1981/2006 poprzez Europejską Sieć Laboratoriów GMO.
- Prowadzono dyskusje i konsultacje podczas spotkania komitetu sterującego i plenarnych spotkań członków ENGL w JRC Ispra Włochy.
- Zapraszano pracowników laboratoriów innych krajów na wykłady
- Wizyty w innych laboratoriach referencyjnych
- Współpraca międzynarodowa z Laboratorium Referencyjnym w Czechach





# ENGL

## EUROPEAN NETWORK OF GMO LABORATORIES

*ihcp*  
Institute for Health  
and Consumer Protection



### HOME

designated  
members

inauguration  
ceremony

International  
Conference  
Tunisia

plenary  
sessions

documents &  
presentations

upcoming  
events

contact us

The European Network of GMO Laboratories (ENGL) is a unique platform of EU experts that play an eminent role in the development, harmonisation and standardisation of means and methods for sampling, detection, identification and quantification of Genetically Modified Organisms (GMOs) or derived products in a wide variety of matrices, covering seeds, grains, food, feed and environmental samples.



The network was inaugurated in Brussels on December 4th 2002 and it currently consists of more than 100 national enforcement laboratories, representing all 27 EU Member States plus Norway and Switzerland. Its plenary meetings are open to particular observers, such as to representatives from Acceding and Candidate Countries.

Members are appointed by their National Competent Authorities. The chairmanship of the network is under the responsibility of the Unit "[Biotechnology and GMOs](#)" of the European Commission's Joint Research Centre's [Institute for Health and Consumer Protection](#). A Steering Committee, composed of one representative per Member State, assists the chair in the management of ENGL.

Since 2004, ENGL provides assistance to the [Community Reference Laboratory for GM Food and Feed](#), particularly with respect to the validation of analytical methods for the event-specific quantification of GMOs that are under marketing approval. Details of the tasks can be found in Regulation 1829/03 on GM Food and Feed.

## 7. ujednolicanie metod analiz i badań w zakresie organizmów genetycznie zmodyfikowanych w laboratoriach służb kontrolnych podlegających Ministrowi Rolnictwa i Rozwoju Wsi

**Zorganizowano międzylaboratoryjne badania porównawcze (dla inspekcji) opracowano statystycznie i przedyskutowano wyniki**

1. „Wykrywanie i ilościowe oznaczanie soi 40-3-2 RRS (2010).
2. Wykrywanie jakościowe 5 linii GM kukurydzy MON810, NK603, TC1507, MIR604 i MON863 (2011).
3. Oznaczanie ilościowe GMO pod kątem zawartości modyfikacji MON810 i NK603 (2012).
4. Testy przesiewowe (screening) w kierunku zawartości różnych nieznanych modyfikacji GMO (2013).

Badanie może być wykorzystane zgodnie z dokumentem PCA DA-05 pkt. 5.5 jako element systemu zarządzania jakością w laboratorium.

8. utrzymanie i doskonalenie systemu zarządzania i akredytacji  
(walidacja sprzętu laboratoryjnego, wewnętrzna walidacja metod,  
audyty wewnętrzne i zewnętrzne, udział w międzynarodowych testach  
porównawczych)

Utrzymano i rozszerzono akredytację PCA.

- System zarządzania jakością w LKGMO oparty jest na normie PN/EN ISO 17025:2005. Akredytacja Polskiego Centrum Akredytacji
- **horyzontalny zakres akredytacji** (Nr AB748) dotyczy analiz jakościowych i ilościowych GMO przy użyciu metody PCR
- **rozszerzono akredytację o wydawanie opinii**
- Laboratorium posiada Księgę Jakości i politykę jakości,
- Opracowano metody badawcze, standardowe procedury operacyjne oraz instrukcje robocze.
- Przeprowadzano audyty wewnętrzne i utrzymywano sprawny sprzęt



# 8. utrzymanie i doskonalenie systemu zarządzania i akredytacji

## ZAKRES AKREDYTACJI LABORATORIUM BADAWCZEGO Nr AB 748

wydany przez  
**POLSKIE CENTRUM AKREDYTACJI**  
01-382 Warszawa, ul. Szczotkarska 42

Wydanie nr 9, Data wydania: 25 kwietnia 2014 r.


**Elastyczny zakres  
akredytacji !**

Wydawanie **opinii i interpretacji**  
w zakresie akredytacji !

### GMO

- analizy jakościowe i ilościowe
- Metoda PCR i Real Time PCR

- Produkty żywnościowe
- Pasze i komponenty do pasz
- Rośliny uprawne
- Nasiona

 AB 748	Nazwa i adres organizacji macierzystej  <b>INSTYTUT HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN- PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY</b>  <b>LABORATORIUM KONTROLI GENETYCZNIE MODYFIKOWANYCH ORGANIZMÓW</b> Radzików 05-870 Błonie
Kod identyfikacji dziedzina/obiekt (obiekty) badań	Dziedziny/obiekt (obiekty) badań:
B/1	Badania biologiczne i biochemiczne produktów rolnych – w tym pasz dla zwierząt
B/3	Badania biologiczne i biochemiczne obiektów i materiałów biologicznych ludzkich, zwierzęcych, roślinnych i innych naturalnych
B/22	Badania biologiczne i biochemiczne wyrobów konsumpcyjnych przeznaczonych dla ludzi – w tym żywności

Wersja strony: A





8. utrzymanie i doskonalenie systemu zarządzania i akredytacji (walidacja sprzętu laboratoryjnego, wewnętrzna walidacja metod, audyty wewnętrzne i zewnętrzne, udział w międzynarodowych testach porównawczych)

Laboratorium uczestniczyło w międzynarodowych testach porównawczych

- **International Seed Testing Association (ISTA)** dotyczącej genetycznie zmodyfikowanego rzepaku T45 i rzepaku RF3, oznaczania ilościowego kukurydzy GA21, 18–stym międzynarodowym teście porównawczym dla kukurydzy GM.
- **USDA – GIPSA** (United States Department of Agriculture, Grain Inspection Packers and Stockyards Administration)
- **EURL-GMFF i JRC IRMM** (Instytut Materiałów Odniesienia i Pomiarów) testów porównawczych które dotyczą analiz genetycznie zmodyfikowanej soi i kukurydzy.

8. utrzymanie i doskonalenie systemu zarządzania i akredytacji  
(walidacja sprzętu laboratoryjnego, wewnętrzna walidacja metod,  
audyty wewnętrzne i zewnętrzne, udział w międzynarodowych testach  
porównawczych)

- **EURL-GMFF i JRC IRMM** (Instytut Materiałów Odniesienia i Pomiarów) testów porównawczych które dotyczą analiz genetycznie zmodyfikowanej soi i kukurydzy.
- Testy porównawcze dla ILC-EURL-GMFF-CT-01/10 ILC dotyczącej **kukurydzy NK603** oraz testu ILC-EURL-GMFF-CT-02/10 ILC dla **kukurydzy MON810**, ILC-EURL-GMFF-CT-01/11, dla oznaczania zawartości **soi GM RoundUp Ready™** (linii 40-3-2) ILC-EURL-GMFF-CT-02/11, test porównawczy dla oznaczenia zawartości **kukurydzy GM – 3272, Bt11, Bt176, DAS 59122, GA21, MIR604, MON810, MON863, NK603, TC1507**. ILC-EURL-GMFF-CT-01/2012, dla oznaczania zawartości **kukurydzy 59122 i rzepaku RT73**.

# Szkolenia i konferencje

## **Pracownicy podnosili swoje kompetencje poprzez**

udział w konferencjach i szkoleniach z zakresu:

- systemów zarządzania jakością pracy laboratorium akredytowanego zgodnie z ISO 17025
- metod analiz molekularnych

## **Udział w szkoleniach i konferencjach naukowych.**

- Wygłaszali referaty na naukowych konferencjach krajowych i międzynarodowych
- Prezentowali postery na naukowych konferencjach krajowych i międzynarodowych
- Uczestniczyli w pracach grup roboczych ENGL i SCAR

## **Tematyka związana z problematyką analiz GMO w aspekcie:**

- znakowania genetycznie zmodyfikowanej żywności i paszy
- wykrywania i oznaczania autoryzowanych i nieautoryzowanych GMO
- koegzystencji upraw
- bezpieczeństwa i oceny ryzyka stosowania GMO
- nowych metod hodowlanych
- problemów prawnych stosowania GMO
- problemów ekonomicznych stosowania GMO

## Rola partnerów w realizacji zadań (ze szczególnym uwzględnieniem organów administracji publicznej)

Działania realizowane w ramach przedstawianego tematu służyły jednostkom administracji publicznej, które zgodnie z Ustawą o GMO z 2001 roku są odpowiedzialne za kontrolę GMO

- a. Państwowa Inspekcja Ochrony Roślin i Nasiennictwa,**
- b. Inspekcja Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych.**
- c. Inspekcja Weterynaryjna,**
- d. Inspekcja Ochrony Środowiska,
- e. Państwowa Inspekcja Sanitarna,
- f. Państwowa Inspekcja Handlowa,
- g. Państwowa Inspekcja Pracy,
- h. Inspekcja Celną

## Realizacja zadania jest związana z wymaganiami zawartymi w

- Rozporządzeniu Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) 1829/2003
- Rozporządzeniu Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) Nr 1830/2003
- Rozporządzeniu Komisji (WE) nr 1981/2006
- Rozporządzeniu Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) Nr 1946/2003
- Dyrektywie Parlamentu Europejskiego i Rady Nr 2001/18/WE

# Wykonawcy

dr Anna Linkiewicz

dr Sławomir Sowa

mgr Magdalena Żurawska-Zajfert

mgr Katarzyna Grelewska-Nowotko

mgr Ewelina Żmijewska

mgr Jarosław Nowosielski

prof. Janusz Zimny