

# ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΑ – ΜΕΤΡΟΛΟΓΙΑ ΜΕΘΟΔΩΝ ΕΛΕΓΧΟΥ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ (GMOs)

**ΟΛΓΑ ΚΟΥΤΙΤΑ<sup>1</sup>, ΜΙΧΑΗΛ ΚΟΥΠΠΑΡΗΣ<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗΣ, ΕΛΛΗΝΙΚΗ  
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΖΑΧΑΡΗΣ, ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ,

<sup>2</sup>ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΑΘΗΝΩΝ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥΠΟΛΗ, ΑΘΗΝΑ

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΟΡΙΣΜΟΙ

Η Γενετική Τροποποίηση, που πρωτοεφαρμόστηκε στη δεκαετία 1970, στοχεύει στη μεταφορά πλεονεκτικών χαρακτηριστικών σε μικροοργανισμούς, φυτά και ζώα. Σε αντίθεση με άλλες μεθόδους γενετικής βελτίωσης οργανισμών, η τεχνολογία της γενετικής τροποποίησης υπόκειται σε αυστηρό έλεγχο. Στην ΕU, ένας Γενετικά Τροποποιημένος Οργανισμός (ΓΤΟ) ή τρόφιμο που παράγεται από ΓΤΟ, μπορεί να διατεθεί στην αγορά μόνο εφόσον έχει προηγηθεί συγκεκριμένη διαδικασία έγκρισης. Η διαδικασία αυτή βασίζεται σε επιστημονική αξιολόγηση επικινδυνότητας του ΓΤ προϊόντος για την υγεία και το περιβάλλον.

Οι ΓΤΟ μπορούν να οριστούν ως οργανισμοί, το γενετικό υλικό (DNA) των οποίων έχει τροποποιηθεί με ένα τρόπο που δεν λαμβάνει χώρα στη φύση, είτε με διασταύρωση, είτε με φυσικό ανασυνδυασμό. Η τεχνολογία της γενετικής τροποποίησης επιτρέπει τη μεταφορά επιλεγμένων γονιδίων από ένα οργανισμό σε άλλο, ακόμα και μεταξύ μη συγγενικών / απομακρυσμένων βιολογικών ειδών.

Σήμερα, η τεχνολογία ΓΤ χρησιμοποιείται κυρίως για τη δημιουργία ΓΤ ποικιλιών φυτών, (όπως π.χ. αραβόσιτος, σόγια, ελαιοκράμβη, βαμβάκι κ.α.) για εμπορική χρήση. Κατά κύριο λόγο, η τροποποίηση των καλλιεργήσιμων φυτικών ειδών αφορά στη μεταφορά γονιδίων, που εξασφαλίζουν ανθεκτικότητα σε έντομα και ανοχή σε ζιζανιοκτόνα ευρείας δράσης. Στον παρακάτω Πίνακα παρουσιάζεται κατάλογος καλλιεργούμενων φυτών (21 είδη), για τα οποία γενετικά τροποποιημένες ποικιλίες, σύνολο 122, έχουν εγκριθεί παγκοσμίως (έστω σε μια χώρα).

**Πίνακας 1. Γενετικά Τροποποιημένες Ποικιλίες καλλιεργήσιμων φυτών παγκοσμίως (Πηγή: <http://www.agbios.com/dbase.php>)**

A/A	Είδος φυτού	Αριθμός ΓΤ ποικιλιών
1	Medicago sativa (Alfalfa)	1
2	Brassica napus (Argentine Canola)	15
3	Brassica rapa (Polish Canola)	2
4	Dianthus caryophyllus (Carnation)	3
5	Cichorium intybus (Chicory)	1
6	Gossypium hirsutum L. (Cotton)	18
7	Agrostis stolonifera (Creeping Bentgrass)	1
8	Linum usitatissimum L. (Flax, Linseed)	1
9	Lens culinaris (Lentil)	1
10	Zea mays L. (Maize)	40
11	Cucumis melo (Melon)	1
12	Carica papaya (Papaya)	1
13	Solanum tuberosum L. (Potato)	4

14	Oryza sativa (Rice)	5
15	Glycine max L. (Soybean)	8
16	Cucurbita pepo (Squash)	2
17	Beta vulgaris (Sugar Beet)	3
18	Helianthus annuus (Sunflower)	1
19	Nicotiana tabacum L. (Tobacco)	2
20	Lycopersicon esculentum (Tomato)	6
21	Triticum aestivum (Wheat)	6

## NΟΜΟΘΕΣΙΑ

Με στόχο την προστασία της υγείας και του περιβάλλοντος, καθώς και την ασφαλή χρήση των ΓΤΟ, η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει αναπτύξει νομικό πλαίσιο για ΓΤΟ, που επικεντρώνεται σε διάφορους άξονες, όπως αξιολόγηση κινδύνων, διαδικασία έγκρισης, απελευθέρωσή τους στο περιβάλλον, διάθεση στην αγορά, απαιτήσεις σήμανσης κλπ. Γίνεται μια συνεχής προσπάθεια προσαρμογής του νομοθετικού πλαισίου στις ραγδαίες αλλαγές (αυξανόμενος όγκος γενετικών τροποποιήσεων, επιστημονικά δεδομένα για τις επιπτώσεις στο περιβάλλον και την υγεία κλπ).

Οι σημαντικότεροι Κανονισμοί είναι δύο, σύμφωνα με τους οποίους οι ΓΤΟ και τα προϊόντα που προέρχονται από ΓΤΟ και κυκλοφορούν στην αγορά, πρέπει να καλύπτουν τις απαιτήσεις της σήμανσης και της ιχνηλασιμότητας:

- Κανονισμός (ΕC) 1829/2003 (για τα γενετικώς τροποποιημένα τρόφιμα και ζωοτροφές) και
- Κανονισμός (ΕC) 1830/2003 (σχετικά με την ιχνηλασιμότητα και επισήμανση γενετικώς τροποποιημένων οργανισμών και ιχνηλασιμότητα τροφίμων και ζωοτροφών που παράγονται από γενετικώς τροποποιημένους οργανισμούς, καθώς και για την τροποποίηση της Οδηγίας 201/18 /EC).

Με τους παραπάνω Κανονισμούς ενδυναμώθηκαν και επεκτάθηκαν οι κανόνες αξιολόγησης της ασφάλειας των ΓΤΟ. Έχει θεσπιστεί η υποχρεωτική σήμανση των ζωοτροφών και τροφίμων, που αποτελούνται, προέρχονται ή περιέχουν ΓΤΟ. Έχει οριστεί το χαμηλότερο όριο της τυχαίας παρουσίας εγκεκριμένων ΓΤΟ στο 0,9%. Σε περίπτωση που η πρόσμιξη υπερβαίνει το όριο αυτό, τα προϊόντα χρήζουν επισήμανσης. Επιπλέον, ποσοστό τυχαίας παρουσίας ΓΤΟ όχι μεγαλύτερο από 0,5% έχει θεσπιστεί για ΓΤΟ που έτυχαν ευνοϊκής αξιολόγησης κινδύνου από αρμόδιες Ευρωπαϊκές επιτροπές.

Οι απαιτήσεις της σχετικής νομοθεσίας οδήγησαν στην ανάγκη ανάπτυξης μεθόδων ανάλυσης, που, πέραν από την ποιοτική ανίχνευση των τυχαίων προσμίξεων στα προϊόντα, θα επέτρεπαν τον ακριβή προσδιορισμό συγκεκριμένων γενετικών τροποποιήσεων και τον προσδιορισμό του ποσοστού των ΓΤΟ σε τρόφιμα και συστατικά τους.

## ΕΛΕΓΧΟΣ ΓΤΟ

Οι μέθοδοι, που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο ΓΤ, μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες: α) βασισμένες στην ανίχνευση πρωτεϊνών – protein-based methods (π.χ. ELISA), β) βασισμένες στην ανίχνευση DNA - DNA-based methods (PCR, RealTime PCR). Σημειώνεται ότι η πρώτη κατηγορία μεθόδων είναι

κατάλληλη μόνο για τον έλεγχο μη μεταποιημένων ή ελαφρώς μεταποιημένων προϊόντων. Οι μέθοδοι της δεύτερης κατηγορίας χρησιμοποιούνται ευρέως για τον έλεγχο γενετικής τροποποίησης σε όλες τις ομάδες τροφίμων, περιλαμβανομένων και των επεξεργασμένων προϊόντων.

## **ΔΙΑΘΕΣΙΜΑ ΠΙΣΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΓΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ**

Για να είναι δυνατή η ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδων ποιοτικού και ποσοτικού (κυρίως) ελέγχου ΓΤ είναι απαραίτητη η ύπαρξη προτύπων (πιστοποιημένων υλικών αναφοράς).

Το Ευρωπαϊκό Ινστιτούτο Υλικών Αναφοράς (Institute for Reference Materials and Measurements – IRMM) έχει αναπτύξει Πιστοποιημένα Υλικά αναφοράς (Certified Reference Material, CRM) για την ανάλυση ΓΤ. Τα υλικά αυτά ανήκουν στην κατηγορία ERM και είναι σε μορφή ομογενοποιημένου δείγματος (σκόνη/άλευρο) με περιεκτικότητα συγκεκριμένης ΓΤ σε επίπεδα 0%, 0,1%, 0,5%, 1%, 2% και 5%.

Παρόλο που το 2003 υπήρχαν υλικά αναφοράς μόνο για τρεις ΓΤ (1 ποικιλία σόγιας/ 2 ποικιλίες καλαμποκιού), σήμερα ο κατάλογος των υλικών αυτών περιλαμβάνει υλικά αναφοράς για ΓΤ σόγιας (1 ποικιλία), αραβόσιτου (10 ποικιλίες), βαμβακιού (1 ποικιλία), πατάτας (1 ποικιλία), ζαχαρότευτλων (1 ποικιλία). Ο κατάλογος αυτός συμπληρώνεται συνεχώς και μπορεί κανείς να ενημερωθεί από την αντίστοιχη ιστοσελίδα (<http://www.irmm.jrc.be>).

Επίσης ο AOCS (<http://www.aocs.org/tech/crm>) προσφέρει υλικά αναφοράς σε μορφή DNA, που έχει απομονωθεί από ιστό (φύλλα) γενετικά τροποποιημένων και μη φυτών. Στην περίπτωση αυτή, χρειάζεται να γίνει ανάμιξη, σε συγκεκριμένες αναλογίες, του DNA από δυο πηγές, για τη δημιουργία ποσοτικών προτύπων. Ο κατάλογος των υλικών αναφοράς από τον παραπάνω φορέα περιλαμβάνει 1 ποικιλία πατάτας, 2 ποικιλίες καλαμποκιού, 2 ποικιλίες ελαιοκράμβης, 2 ποικιλίες βαμβακιού, 1 ποικιλία ρυζιού, 1 ποικιλία ζαχαρότευτλων.

## **ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ**

Η διαδικασία δειγματοληψίας είναι πολύ κρίσιμη για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Ακριβής αναλυτική εργασία και επεξεργασία αποτελεσμάτων είναι άχρηστα εάν τα δείγματα δεν είναι επακριβώς αντιπροσωπευτικά της παρτίδας από τα οποία πάρθηκαν. Εάν ληφθούν δείγματα χωρίς την εφαρμογή στρατηγικής δειγματοληψίας και χωρίς να ληφθούν υπόψη οι ειδικές ιδιότητες της παρτίδας, το αναλυτικό αποτέλεσμα έχει μόνο ισχύ για το δείγμα που αναλύθηκε. Δεν είναι δυνατόν να επεκταθεί το αποτέλεσμα στο υπόλοιπο της παρτίδας. Εφαρμόζοντας διαδικασία δειγματοληψίας για την αξιολόγηση της συμμόρφωσης δεδομένης παρτίδας, ένας ορισμένος αριθμός δειγμάτων πρέπει να ληφθεί, και το αποτέλεσμα της ανάλυσης μπορεί να επεκταθεί σε ολόκληρη την παρτίδα. Η χρήση σχεδίου δειγματοληψίας είναι ο μόνος αποτελεσματικός τρόπος για να γίνει ορθή δήλωση για τη φύση, στην περίπτωση των GMOs, του προϊόντος που ελέγχεται. Η καθιέρωση γενικής διαδικασίας είναι δύσκολη και σε ιδιαίτερες περιπτώσεις επιβάλλονται κάποιες τροποποιήσεις.

Η δειγματοληψία αποτελείται από τα ακόλουθα 4 στάδια:

1) Συλλογή ενός ικανοποιητικού αριθμού μονάδων (increment, ποσότητα υλικού που λαμβάνεται κάθε φορά από ένα μεγαλύτερο σώμα υλικού) για τη δημιουργία του «χονδρικού (χύμα) δείγματος» (bulk sample).

2) Μείωση του χύμα δείγματος σε «εργαστηριακό δείγμα» (laboratory sample).

3) Ομογενοποίηση και μείωση του μεγέθους σωματιδίων με κατάλληλους τρόπους για τη δημιουργία του «αναλυτικού δείγματος» (analytical sample).

4) Προσδιορισμός του σφάλματος δειγματοληψίας (sampling error), εάν απαιτείται.

Τα δείγματα πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικά των παρτίδων από τις οποίες λαμβάνονται. Επειδή η σύσταση μιας παρτίδας σπάνια είναι ομοιόμορφη, πρέπει να λαμβάνεται προσεκτικά ένας ικανός αριθμός μονάδων (increments) και να αναμιγνύεται προσεκτικά, για τη δημιουργία ενός «χύμα δείγματος» (bulk sample), από το οποίο λαμβάνεται το αναλυτικό δείγμα με διαδοχικές υποδιαίρεσεις ή άλλο τρόπο. Εάν απαιτείται ο προσδιορισμός του σφάλματος δειγματοληψίας, πρέπει να κρατούνται δείγματα μονάδων αρχείου για περαιτέρω ανάλυση. Όλες οι διαδικασίες δειγματοληψίας πρέπει να διεξάγονται σε ικανοποιητικά βραχύ χρόνο για την αποφυγή κάθε αλλοίωσης της σύστασης των δειγμάτων.

Για τη δειγματοληψία είναι διαθέσιμοι διάφοροι τύποι οργάνων και συσκευών. Πρέπει να λαμβάνεται ειδική φροντίδα όλες οι συσκευές και τα δοχεία δειγματοληψίας να είναι καθαρά έτσι, ώστε να αποφεύγεται επιμόλυνση του εξεταζόμενου υλικού. Η συσκευή δειγματοληψίας πρέπει να καθαρίζεται προσεκτικά, π.χ. χρησιμοποιώντας παράγοντες καταστροφής DNA. Υλικό που προσκολλάται στην εξωτερική επιφάνεια της συσκευής δειγματοληψίας πρέπει να απομακρύνεται πριν την απόθεση του περιεχομένου.

Οι ιδιότητες κατανομής της παρτίδας επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα των διαδικασιών δειγματοληψίας. Στην περίπτωση που η παράμετρος που ενδιαφέρει κατανέμεται τυχαία στην υπό διερεύνηση παρτίδα, το σφάλμα δειγματοληψίας μπορεί να υπολογισθεί σύμφωνα με τη διωνυμική κατανομή. Όμως στην πραγματικότητα, οι παρτίδες των προϊόντων τροφίμων μπορεί να χαρακτηρίζονται από μη τυχαίες κατανομές, και η ετερογένεια της παρτίδας χρειάζεται να ληφθεί υπόψη όταν καθορίζονται στατιστικά οι διαδικασίες δειγματοληψίας. Αυτό το πρωτόκολλο δειγματοληψίας βασίζεται σε μια διαδικασία δύο σταδίων: α) υπολογισμό της περιεκτικότητας GMO της παρτίδας βασισμένη σε ένα χύμα δείγμα (bulk sample) και β) υπολογισμό του σφάλματος δειγματοληψίας, εάν απαιτείται. Στον πίνακα που ακολουθεί φαίνονται οι απαιτήσεις δειγματοληψίας, ανάλογα με το μέγεθος της παρτίδας.

**Πίνακας 2. Αριθμός σημείων δειγματοληψίας σύμφωνα με μέγεθος παρτίδας**

Μέγεθος Δείγματος (t)	Μέγεθος χύμα (bulk) δείγματος (kg)	Σημεία δειγματοληψίας
≤50	5	10
50 - 500	0,01% του μεγέθους	2 x kg bulk sample
≥ 500	50	100

Το σφάλμα δειγματοληψίας υπολογίζεται ως η τυπική απόκλιση από τις αναλύσεις 20 ξεχωριστών μονάδων της παρτίδας.

Στο πρότυπο ISO 21568:2005 αναφέρεται το ελάχιστο μέγεθος εργαστηριακού δείγματος ανάλογα με το είδος του προϊόντος (π.χ. 400 g για σιτάρι, 2000 g για σόγια). Επίσης αναφέρεται η κατανομή των σωματιδίων σε δείγματα 100 mg μετά από υπερφυγοκεντρική άλεση.

## **ΤΕΧΝΙΚΗ ΑΛΥΣΙΑΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (POLYMERASE CHAIN REACTION, PCR)**

Με τη βοήθεια της PCR ενισχύονται χαρακτηριστικές περιοχές εντός του γονιδιώματος ενός οργανισμού σε ποσότητες επαρκείς για την ανάλυσή τους με διάφορες αναλυτικές τεχνικές. Η αντίδραση PCR πραγματοποιείται εντός μικροσωλήνων, όπου περιέχεται το μίγμα της αντίδρασης [DNA που περιέχει την αλληλουχία που θα ενισχυθεί, περίσσεια των 4 δεοξυ-τριφωσφορικών-ριβονουκλεοτιδίων (dNTPs), το θερμοανθεκτικό ένζυμο DNA-πολυμεράση που καταλύει την αντίδραση και ζεύγη μονόκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων μικρού μήκους, που καλούνται εκκινητές (primers)]. Οι εκκινητές, μήκους συνήθως μερικών δεκάδων νουκλεοτιδίων, οριοθετούν την αλληλουχία του DNA που θα ενισχυθεί. Κάθε κύκλος αντίδρασης περιλαμβάνει τρία επαναλαμβανόμενα στάδια: 1) Θέρμανση, με σκοπό την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, 2) Ψύξη, σε θερμοκρασία πλησίον της θερμοκρασίας τήξεως  $T_m$  (θερμοκρασία στην οποία χάνεται η μισή ελικοειδής δομή του DNA) των δύο εκκινητών, οπότε αυτοί υβριδοποιούνται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες, και 3) Θέρμανση στη βέλτιστη θερμοκρασία για την ενεργότητα της DNA-πολυμεράσης, οπότε και καταλύεται η αντίδραση προσθήκης των δεοξυ-ριβονουκλεοτιδίων. Ο κύκλος αυτός επαναλαμβάνεται (τυπικά 30 με 40 φορές) με τα προϊόντα του προηγούμενου κύκλου να λειτουργούν ως εκμαγεία για τη σύνθεση νέων κλώνων. Το βασικό μειονέκτημα της κλασικής PCR είναι η αδυναμία της να δώσει ακριβή ποσοτική πληροφορία λόγω της μη σταθερότητας της απόδοσης της ενίσχυσης (amplification efficiency). Για το σκοπό αυτό αναπτύχθηκαν η ποσοτική συναγωνιστική PCR και η PCR πραγματικού χρόνου.

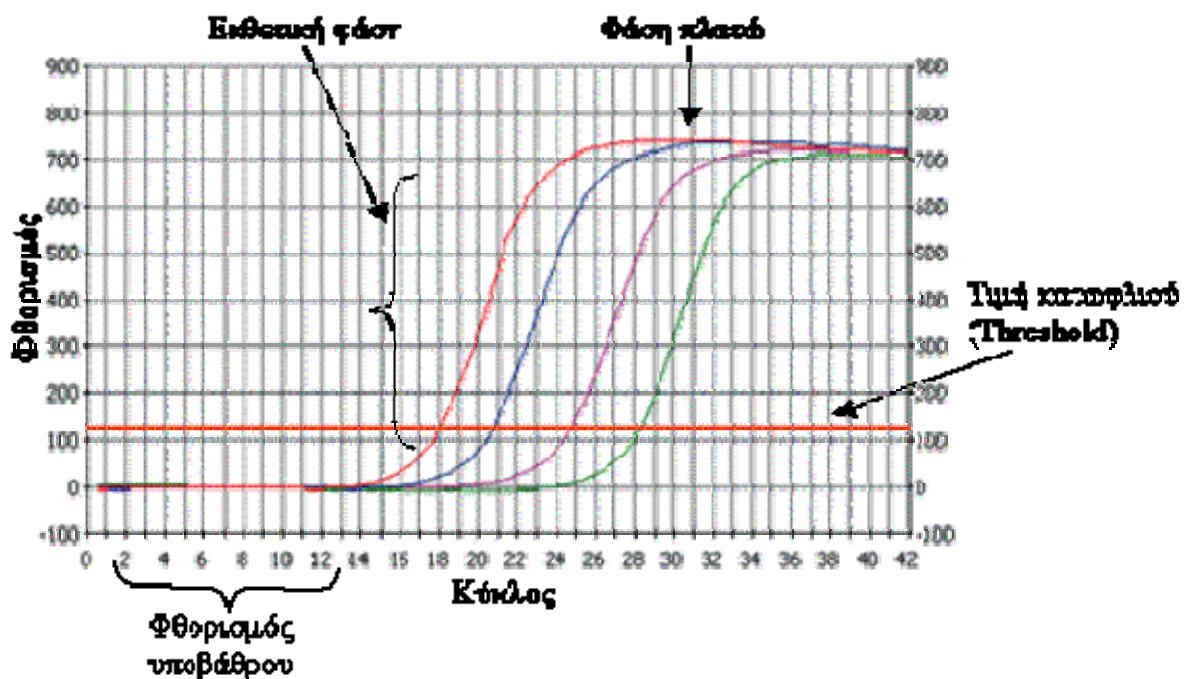
## **ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ / ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ**

Για την ανίχνευση / ποσοτικοποίηση των GMOs χρησιμοποιούνται οι παρακάτω τεχνικές:

A) Ηλεκτροφόρηση πηκτής: παρέχει τη δυνατότητα διαχωρισμού μεγάλου αριθμού κλασμάτων νουκλεϊκών οξέων – προϊόντων PCR. Η αρχή της τεχνικής βασίζεται στο γεγονός ότι τα νουκλεϊκά οξέα είναι αρνητικά φορτισμένα, λόγω των φωσφορικών ομάδων του σκελετού του μορίου. Ένα δείγμα υποβάλλεται σε PCR για την ενίσχυση ειδικών για κάθε γενετικά τροποποιημένη ποικιλία αλληλουχιών με αντίστοιχο αριθμό ζευγών εκκινητών. Οι ζώνες που δημιουργούνται μετά από το διαχωρισμό εμφανίζονται με τη βοήθεια διαφόρων χρωστικών, τα μόρια των οποίων παρεμβάλλονται μεταξύ των κλώνων του DNA (π.χ. βρωμιούχο αιθίδιο, SYBR green, κλπ) με αποτέλεσμα την εμφάνιση ισχυρού φθορισμού. Η αντιστοιχία των ζωνών με την αλληλουχία στόχο που ενισχύεται γίνεται με σύγκριση του μεγέθους τους με αυτό μορίων DNA γνωστού μεγέθους και μάζας, τα οποία ηλεκτροφορούνται παράλληλα. Εξέλιξη και αυτοματοποίηση της ηλεκτροφόρησης πηκτής αποτελεί η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση.

B) Φασματομετρία μαζών χρόνου πτήσεως (Time-of-flight mass spectrometry, TOF MS): Τα ιόντα DNA επιταχύνονται υπό την επίδραση μαγνητικού πεδίου, αποκτώντας καθορισμένη κινητική ενέργεια. Από το χρόνο πτήσης που απαιτείται για κάθε ιόν να φθάσει στον ανιχνευτή υπολογίζεται ο λόγος  $m/z$ .

Γ) PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR, RT-PCR): αποτελεί εξέλιξη της κλασικής PCR. Έχει καθιερωθεί ως η κατεξοχήν τεχνική ανίχνευσης / ποσοτικοποίησης νουκλεϊκών οξέων. Η ανίχνευση των προϊόντων της PCR πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και όχι μετά το τέλος της, ανιχνεύοντας το φθορισμό που εκπέμπεται, είτε από μόρια που αλληλεπιδρούν με τη διπλή έλικα DNA, είτε από μόρια – ιχνηθέτες ειδικών ολιγονουκλεοτιδίων – ανιχνευτών. Η καταγραφή της αύξησης του φθορισμού οδηγεί στην κατασκευή της καμπύλης ενίσχυσης (Σχήμα 1). Η καμπύλη αυτή περιλαμβάνει τρεις φάσεις: αρχική φάση, όπου παρατηρείται ο φθορισμός υποβάθρου, η εκθετική φάση, στην οποία παράγεται έντονος φθορισμός και η φάση πλατώ, κατά την οποία ο φθορισμός σταθεροποιείται. Ο χρόνος που απαιτείται για την εμφάνιση της εκθετικής φάσης, όπως εκφράζεται από τον αριθμό κύκλου όπου εμφανίζεται φθορισμός ίσος με την τιμή κατωφλίου (threshold cycle Ct), σχετίζεται γραμμικά με το λογάριθμο του αριθμού αρχικών – μορίων στόχων και επομένως της συγκέντρωσης της ΓΤ στο δείγμα. Η διαδικασία γίνεται σε ειδικές συσκευές (θερμικοί κυκλοποιητές, PCR cyclers).



Σχήμα 1. Απεικόνιση των τυπικών φάσεων της τεχνικής Real-time PCR (PCR πραγματικού χρόνου).

## ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ GMOs

Κατά την επικύρωση μιας ποιοτικής μεθόδου ανίχνευσης GMOs ελέγχονται οι παρακάτω παράμετροι:

- Ειδικότητα (Specificity) της μεθόδου: Εάν είναι μέθοδος PCR θα πρέπει να είναι >95%.
- Ευαισθησία: (Sensitivity)
- Όριο ανίχνευσης (Detection limit): Δεν μπορεί να είναι μεγαλύτερο από 0,1%.
- Επιδράσεις μήτρας (matrix effect): Απαιτείται επικύρωση στο συγκεκριμένο φυτικό προϊόν.
- Πιστότητα (Precision) [επαναληψιμότητα (repeatability) και αναπαραγωγιμότητα (reproducibility)].
- Ανθεκτικότητα (ευστάθεια) (robustness): εξετάζεται η επίδραση μικρών σκοπούμενων αλλαγών των πειραματικών συνθηκών (χρόνος επώασης, θερμοκρασία επώασης κατά την εκχύλιση, ποσότητα δείγματος).

Κατά την επικύρωση ποσοτικής μεθόδου προσδιορισμού GMOs απαιτούνται όλα τα ανωτέρω και επιπλέον:

- Ακρίβεια (Accuracy): Υπολογίζεται η ανάκτηση της μεθόδου με χρήση πιστοποιημένων υλικών αναφοράς (CRM). Εάν δεν υπάρχει διαθέσιμο CRM μπορεί να χρησιμοποιηθεί υλικό που έχει αναλυθεί διεργαστηριακά.
- Όριο ποσοτικοποίησης (Quantitation limit): Είναι το τριπλάσιο του ορίου ανίχνευσης και ισούται με το 10-πλάσιο της τυπικής απόκλισης του προσδιορισμού του πλέον αραιότερου προτύπου ή δείγματος.
- Γραμμικότητα (Linearity): Εξετάζεται η γραμμικότητα της καμπύλης βαθμονόμησης Ct ως προς log περιεκτικότητας προτύπων και εκφράζεται από το συντελεστή συσχέτισης (correlation coefficient).
- Γραμμική περιοχή καμπύλης βαθμονόμησης

## ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗΣ ΥΠΟΔΟΜΗΣ

Ένα εργαστήριο ελέγχου GMOs πρέπει να έχει ειδικά διαφοροποιημένους χώρους ελεγχόμενης στειρότητας DNA για τις διάφορες διαδικασίες (κατεργασία δείγματος, απομόνωση DNA, αντίδραση PCR, ηλεκτροφόρηση). Ο απαιτούμενος εξοπλισμός (πιπέττες κλπ) και οι εργαστηριακοί επενδύτες (μπλούτζες) πρέπει να παραμένουν στους αντίστοιχους χώρους και να μην μεταφέρονται μέσα στο εργαστήριο. Απαιτείται επίσης ειδική διαδικασία αποστείρωσης χώρου και απόρριψης θετικών δειγμάτων.

## ΔΙΑΚΡΙΒΩΣΗ / ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΔΟΣΗΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΥ

Για την επίτευξη αξιόπιστων αποτελεσμάτων ο εξοπλισμός του Εργαστηρίου πρέπει να διακριβώνεται / ελέγχεται. Έτσι διακριβώνεται ο αναλυτικός ζυγός που χρησιμοποιείται για τη ζύγιση του δείγματος / προτύπων και ελέγχεται καθημερινά με τη χρήση σταθμών ελέγχου. Διακριβώνονται ετησίως και ελέγχονται συχνά οι πιπέττες που χρησιμοποιούνται για τη λήψη διαλυμάτων στα μίγματα της PCR. Διακριβώνονται τα θερμόμετρα των υδρολούτρων που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση του DNA και ελέγχεται η θερμική σταθερότητα / επαναληψιμότητα των υδρολούτρων. Η συσκευή PCR πραγματικού χρόνου απαιτεί ειδικό έλεγχο επίδοσης, που συνήθως γίνεται από τους κατασκευαστές των συσκευών και περιλαμβάνει

έλεγχου των προγραμμάτων θερμοκρασίας και χρόνου. Διακρίβωνονται επίσης τα θερμόμετρα ψυγείων και καταψυκτών, συνήθως χρησιμοποιώντας διακριβωμένα θερμόμετρα αναφοράς. Από τις διακριβώσεις / ελέγχους υπολογίζεται η αβεβαιότητα των μετρήσεων του εξοπλισμού και ελέγχεται εάν πληρούν τις προδιαγραφές των μεθόδων και επίσης χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της ολικής αβεβαιότητας της μεθόδου.

## **ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑΣ ΠΟΣΟΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ**

Η αβεβαιότητα μιας ποσοτικής μεθόδου ελέγχου GMOs υπολογίζεται λαμβάνοντας υπόψη όλες τις συνιστώσες που επηρεάζουν το αποτέλεσμα. Η αβεβαιότητα τύπου A υπολογίζεται στατιστικά από δεδομένα πολλαπλών αναλύσεων ενός δείγματος σε συνθήκες αναπαραγωγιμότητας. Οι συνιστώσες αβεβαιότητας τύπου B που λαμβάνονται υπόψη είναι:

- Ζυγού (από το πιστοποιητικό διακρίβωσης)
- Πιπεττών (από τα πιστοποιητικά διακρίβωσης)
- Προτύπων για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης (από τα αντίστοιχα πιστοποιητικά)
- Της συσκευής PCR (από το πιστοποιητικό ελέγχου)
- Του σφάλματος από την καμπύλη βαθμονόμησης

## **ΔΙΑΣΦΑΛΙΣΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

Επιτυγχάνεται με την εφαρμογή εσωτερικού και εξωτερικού ελέγχου ποιότητας. Στον εσωτερικό έλεγχο ποιότητας χρησιμοποιούνται λευκά δείγματα (αρνητικοί μάρτυρες) αντιδραστηρίων και θετικά δείγματα (δείγματα ελέγχου). Κατασκευάζονται διαγράμματα ελέγχου για τη διαχρονική παρακολούθηση της μεθόδου. Στον εξωτερικό έλεγχο ποιότητας το Εργαστήριο συμμετέχει σε διεργαστηριακό σχήμα ελέγχου ικανότητας από διαπιστευμένο φορέα (Central Scientific Lab, Gema, FAPAS) και πρέπει να έχει επιτυχία στις ποιοτικές δοκιμές και z-score μικρότερο του 2 στις ποσοτικές δοκιμές.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. ISO 24276:2006, “Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products- General requirements and definitions”.
2. ISO 21571:2005, Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products- Nucleic acid extraction”.
3. ISO 21569: 2005, Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products- “Qualitative nucleic acid based methods”.
4. ISO 21570:2005, “Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products- Quantitative nucleic acid based methods”.
5. Draft ISO/DIS 21568.2:2005, “Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products- Sampling”.
6. Σύσταση της Επιτροπής Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων (2004/787/EK).
7. Εθνικό Σύστημα Διαπίστευσης, «Κατευθυντήρια Οδηγία για την Επικύρωση Μεθόδων Ανίχνευσης Γενετικώς Τροποποιημένων Οργανισμών (GMOs)».