

Codex irányelvek és módszerek a biotechnológiai eredetű élelmiszerek elemzésének validálására és minőségellenőrzésére

Módszer kritériumok

A Codex Élelmiszer Bizottság nagy súlyt fektet olyan analitikai módszerek elfogadására, melyeket nemzetközileg elfogadott protokoll szerint végzett laboratóriumi körvizsgálattal validáltak. Több területen, így a GMO vizsgálatok terén is kevés a teljesen validált analitikai módszer. Ezen a területen körvizsgálati adatok hiányában, időszakosan nagy a nyomás a formális, egyetlen laboratóriumban végzett validálás elfogadására. A GMO kimutatási módszereket is több laboratóriumban végzett laboratóriumi körvizsgálattal kell validálni.

A GMO kimutatásra, azonosításra és mennyiségi mérésre jelenleg sok módszer áll fejlesztés alatt. A két leggyakoribb irányt a DNS alapú módszerek és a fehérjék vagy aktivitásuk kimutatásán alapuló módszerek jelentenek. Az elsőt általában PCR-rel végzik, bár PCR lépést nem tartalmazó módszerek is alkalmazhatók, ha validáltak. Jelen anyag kiterjed mind a DNS, mind a fehérje alapú módszerekre. A DNS alapú PCR módszert általában szélesebb körben alkalmazhatónak találják.

A Codex által elfogadott hagyományos kritériumok egy analitikai módszer értékelésére a következők:

- Alkalmazhatóság (mátrix, koncentrációtartomány stb.).
- Kimutatási határ.
- Mennyiségi mérés határa.
- Pontosság (laboratóriumon belüli), reprodukálhatóság (laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti).
- Visszanyerés.
- Szelektivitás.
- Érzékenység.
- Linearitás.

DNS alapú módszerhez ezeket a következő kritériumokkal tovább kell bővíteni:

- Amplikon hossz.
- Műszer-specifikusság.
- Különbségek a kvalitatív és kvantitatív PCR alapú kimutatási módszerek között.
- Egyetlen vagy többszörös PCR amplifikálás.

A fehérje alapú módszerekhez ezeket a következő kritériumokkal tovább kell bővíteni:

- A reagensek időbeli egyenértékűsége.

A Codex által elfogadott módszervalidálási eljárás magában foglalja a módszerrel szembeni követelmények definícióját, annak a vizsgálatát, hogy a módszert különböző országok különböző laboratóriumaiban alkalmazva megfelel-e ezeknek a követelményeknek, valamint a módszer teljesítményének és a mérési bizonytalanságnak a dokumentálását.

A CAC elfogadta az analitikai módszerek kritérium alapú megközelítését. Ez nem terjed ki az I. típusú empirikus eljárásokra. Biztosítani kell, hogy ez a megközelítés beépüljön a GMO analízis validálásának Codex irányelveibe, ha csak ki nem jelentjük, hogy minden GMO analitikai módszer empirikus mind elméleti, mind gyakorlati alapon.

A laboratórium minősége

A CAC irányelveket fogadott el az élelmiszer exportba és importba bevont laboratóriumokra. Ezek a minőségi jellemzők az ISO/IEC 17025 szabványon, jártasságvizsgálaton és belső minőségellenőrzésen, valamint a Codex követelményeknek megfelelően validált módszerek használatán alapulnak.

Mérési bizonytalanság

A Codex irányelveket alakított ki a mérési bizonytalanságra. Ezek, valamint a fent említett akkreditálási követelmények arra kötelezik a laboratóriumokat, hogy mennyiségi méréseik bizonytalanságát becsüljék meg. Ez különösen fontos és következményekkel jár a GMO szektorban, ahol az analitikai ellenőrzés nem olyan hatékony. Gyakran

nem tudatosul, hogy a mérési bizonytalanság nagyságrendje ebben az analitikai szektorban sokkal nagyobb, mint átlagosan.

Módszerfejlesztés formális validálásnál

A módszer alkalmazhatósága

Ez különösen fontos kritérium a GMO analízisben. Elvben a Codex rendszerben a módszernek alkalmasnak kell lennie a szóban forgó mátrixra. Ha ez egy GMO-ból készített specifikus termék, a jóváhagyatást kérőktől kell információt kérni a specifikus termékről és ideálisan a mátrixra megfelelő analitikai módszerről. Az általános GMO módszereknél minimum egy, általános mátrixra alkalmazható extrakciós módszerre szükség van.

Például egy extrakciós módszertől, mátrixtól függetlenül, elvárjuk, hogy megfelelő mennyiségű, szerkezeti integritású és tisztaságú DNS-t eredményezzen, ami lehetővé teszi a következő módszertani lépések (pl. a DNS amplifikálása a PCR lépésben) hatékonyságának megfelelő értékelését. Ez úgy vizsgálható például, ha a templát DNS-ből hígítási sort készítünk és meghatározzuk, hogy a real-time PCR elemzés során a hígítások közötti DCT megfelel-e a hígítási tényezőnek. Ha például a DNS-t tízszeresre hígítjuk, a DCT-nek kb. 3,32-nek kell lennie, ha a DNS-t négyszeresre hígítjuk, a DCT-nek 2-nek kell lennie stb. Statisztikailag szignifikáns eltérések ettől az összefüggéstől azt jelezhetik, hogy az extrahált DNS PCR inhibitort tartalmaz, vagy a DNS oldat nem homogén, illetve a DNS mennyisége olyan alacsony, hogy a kópiaszámok sztochasztikus változása megbízhatatlanná teszi a mennyiségi mérést.

A módszervalidálás moduláris megközelítése

A „módszer” minden kísérleti eljárást magában foglal, ami ahhoz szükséges, hogy a mérendő anyagot egy bizonyos mátrixban megmérjük. Egy adott anyagnál ez lehet a DNS extrakciós módszer és a végső mennyiségi mérés PCR rendszerben. Ilyen esetben az egész láncolat az extrakciótól a PCR módszerig (vagy azzal ekvivalens lépésig) egy módszert képez, de a különböző módszer-részek külön-külön vizsgálhatók (moduláris validálás). A moduláris validálás előnye, hogy az egyes szakaszok külön-külön validálhatók és ha ez már megtörtént, rugalmasan kombinálhatók. A módszervalidálás moduláris megközelítése feltételezi, hogy a modulok teljes függetlenségét már

igazolták és dokumentálták. Ezt a függetlenséget annál nehezebb megállapítani, minél több a változó a modulokban.

A módszer elfogadásának elvi feltételei és kritériumai

Jelenleg a DNS alapú kimutatási módszer tipikusan PCR-es és a következőket foglalja magában:

- egy, az adott mátrixra alkalmazható extrakciós módszert leíró protokollt;
- az oligonukleotid primer szekvencia leírását, amely a GM eseményt specifikusan azonosítja a GM termékben;
- a PCR végzési körülményeket rögzítő jegyzőkönyvet, beleértve a használt készüléket is;
- megfelelő kontroll mintákat, ha azok rendelkezésre állnak; egy ismeretlen GMO kimutatása azonban nem teszi lehetővé kontroll minták használatát, mivel azok általában nem léteznek.

A módszer benyújtójának igazolnia kell, hogy a módszer teljesíti a vele szemben támasztott elvi követelményeket:

1. **GMO szűrő módszer.** A többszörös esemény jelenlétének szűrésére használt módszer esetében a módszernek specifikusnak kell lennie és DNS alapú módszer esetén lehetővé kell tennie a specifikus DNS szekvencia egyértelmű kimutatását/azonosítását/mennyiségi mérését. Fehérje alapú módszernél a módszernek specifikusnak kell lennie és egyértelműen kell kimutatni/azonosítani/mérni a specifikus antigént vagy epitópot.
2. **A DNS alapú GM-specifikus módszereknek lehetővé kell tenniük egy ismert célzott nukleotid-szekvencia egyértelmű kimutatását/azonosítását/mennyiségi mérését.** Napjainkban egy módszer GM specifitását illetően a legjobb választás, a PCR esetén az eseményre jellemző genom régió megcélzása egy oligonukleotid (primer) szekvenciával, amely kiváltja egy ilyen régió amplifikálását. Az eseményre jellemző genom régiók közül valószínűleg a transzgen betét és a gazda genom DNS közti kapcsolat helyét kell választani. Ha azonban a transzgen betétben belül található egy speciális DNS szekvencia, az ilyen szekvencia (amit általában konstrukció-specifikusnak neveznek) megfelelő oligonukleotid primerekkel szintén célbavehető és PCR-rel amplifikálható. Az amplifikált

fragmens azonosítását próba hibridizációval vagy azzal ekvivalens módszerrel ajánlatos ellenőrizni.

3. Minden módszernek alkalmasnak kell lennie a megjelölt alkalmazási területre, valamint a megfelelő minőségellenőrzésre és kontroll anyagra.

Megjegyezzük, hogy jelenleg csak relatív mennyiségi meghatározás lehetséges, ami azt jelenti, hogy a transzgén anyagot a megfelelő komponenshez/fajtához viszonyítva mérjük.

A körvizsgálattal szembeni követelmények

Általános információ

A körvizsgálat célja egy elővalidálásból vagy egyetlen laborból származó adatok teljes validálása és a módszertani pontosság meghatározása (ismételhetőség és reprodukálhatóság).

A validálási vizsgálatból származó teljesítményjellemzők értékeit gondosan értelmezzük és hasonlítsuk össze. A pontos értékek és értelmezésük a módszer teljesítményén kívül függ attól, mire terjed ki a módszer, (pl. csak real-time kvantitatív PCR vagy az extrakciótól a real-time PCR-ig terjedő láncolat), a kísérleti elrendezéstől, pl. kalibrációs vagy DCT meghatározó módszerek, a paraméterek meghatározására használt pontos számítási képletek, valamint a kieső értékek kimutatására és elemzésére használt módszerek. Hogy a „minimális teljesítménykövetelmények” jelentsenek valamit, a fenti tényezőket megfelelően, szabványosított módon kell kezelni.

A teljesítménnyel szembeni minimális követelmények

Egy körvizsgálatban a módszer teljesítménye feleljen meg az elfogadási kritériumoknak. A körvizsgálatnak igazolnia kell a megelőző módszer-értékelési fázisok eredményeit és további információkat kell nyújtania a módszer teljesítményéről több labor részvételével. Legfőképpen az érzékenységi és ismételhetőségi/reprodukálhatósági szórás kritériumának kell megfelelni.

A jóváhagyott módszereket és azok validálási adatait időnként felülvizsgálják, ahogy az egyetlen laboratóriumban végzett validálási és a körvizsgálatokban szerzett tapasztalatok gyűlnek. Ezeket az

irányelveket a validálási folyamat lépéseire vonatkozó gyakorlati információval egészítik majd ki.

Körvizsgálati tesztanyagok

Elvben a módszer legyen alkalmas az adott mátrixra és vizsgálni is azon kell. Az általános célú GMO eljárások esetében (szemben a speciális GM termék vizsgálatával) a detektálási modul validálását a genom vagy plazmid DNS mint elemzendő anyag felhasználásával végzik (PCR alapú módszer esetén) kontroll minták alkalmazásával kalibrálva. Ez lehetővé teszi, hogy a kimutatási lépést a különböző mátrixokra alkalmas különböző extrakciós módszerekkel kombinálják. Előnyben kell részesíteni azonban egy mátrix-típusra jellemző valódi anyagot/mátrixot, hacsak a moduláris megközelítést megelőzően nem vizsgálták már az extrakciós lépésben az anyagok/mátrix hatását a DNS minőségére.

Mértékegységek

Az egyes országok küszöbértékeket állapítottak meg a modern biotechnológiai eredetű élelmiszerek és takarmányok jelölésére. Ezeket szem súlyszázalékban adják meg. A jelenleg használatos módszerek egyike (sem a fehérje- sem a DNS-alapú) sem képes ennek a közvetlen mérésére. Bár vannak összefüggések a szem/súly% és a DNS vagy fehérje mennyisége között, ennek az összefüggésnek a lényegét több biológiai tényező befolyásolja és ezért igen változékony marad. Ez jelentős félreértésekhez vezethet és technikai iránymutatást igényel.

A GMO azonosításra és mennyiségi mérésre használt PCR technikával genom ekvivalenseket mérünk. Ezért nem triviális annak megfontolása, hogyan számítsuk a genetikailag módosított anyagot. Ha például egy olyan kukoricamag tételt használunk lisztminta készítésére, mely 2% genetikailag módosított szemet tartalmaz és az új „vonal” hemizigóta állapotban van (a pollenből ered), akkor elméletben az izolált genom DNS kópiáknak csak 0,29%-a fogja képviselni a genetikailag módosított állapotot. Ezt a különböző szövettípusok, a forrás, ahonnan ezeknek a szöveteknek a genomja ered (apai vagy anyai), és a szövettípusok hozzájárulása a maghoz egyaránt befolyásolják. Következésképpen a genetikailag módosított anyag mennyiségét mag alapon alulbecsüljük, vagy több gén egyszerre történő

átvitele (stacking) esetén túlbecsüljük, a DNS vagy fehérjealapú megközelítéssel.

A GMO-ban újonnan expresszáladott fehérjén alapuló mennyiségi mérés is jelentősen hozzájárul az elemzési bizonytalansághoz. Az a környezet például, ahol az anyagot termesztették, befolyásolhatja az expresszált fehérje mennyiségét. Emellett gyakran előfordul, hogy a fehérjék a növény különböző szövettípusaiban, illetve azonos transzformációs esemény esetén a különböző fajtákban különböző szinten expresszáladnak. Következésképpen a genetikailag módosított növény különböző részeiből illetve a különböző fajtákból készített élelmiszer az újonnan expresszáladott fehérjéből különböző mennyiséget tartalmaz.

Ezekre a módszerekre tehát konverziós faktorokat vagy megfelelő átlagot, pl. megegyezés szerinti GMO egységeket, teljesítményt és adatközlési kritériumokat kell megállapítani.

Iránymutatás laboratóriumi berendezésekhez és munkához

A modern biotechnológiával előállított élelmiszerek elemzésének DNS alapú módszerei olyan technikákat alkalmaznak, amelyek nem általánosak, mivel a legtöbb kémiai analitikai módszertől eltérő specifikus berendezést és kezelési technikákat igényelnek. A DNS alapú módszerek azonban egyre jobban terjednek más kimutatási területen is, pl. élelmiszer patogének mikrobiológiájában. Mivel jelenleg nincs más detektálási területről visszajelzés, szükséges a laboratóriumi berendezésről és kezelési technikákról bővebb ismereteket és utasításokat adni.

Referenciaanyagok

Több mátrix létezik, amely alkalmas referenciaanyagok vagy munkastandardok kifejlesztésére GM termék kimutatási módszerekhez. Mindegyiknek megvan a maga előnye és hátránya. Egy nem engedélyezett/ismeretlen GMO kimutatása esetén azonban referenciaanyag eleve nem áll rendelkezésre.

A Codex mérlegelheti a módszer jóváhagyási eljárás részeként, hogy álljon rendelkezésre megfelelő standard anyag. Fel kell ismerni

azonban, hogy a referenciaanyagok kifejlesztésével lehetnek specifikus problémák, pl. a kukoricák esetén szóba jöhet az esemény-specifikus vagy a konstrukció-specifikus módszer is.

Egy módszer validálásához általában megfelelő referenciaanyag szükséges. Sok, kereskedelemben kapható GMO esetén lehet már megfelelő referenciaanyagot kapni. Ahol ilyen nincs, a jártasságvizsgálati sémák vagy a plazmid, illetve amplikon DNS vizsgálat minőségellenőrző anyagainak alkalmazását kell mérlegelni. Ezen a munkaterületen további fejlesztésre van szükség.

Mintavétel

A GMO analitikában a mintavételi hiba jelentősen vagy dominánsan járul hozzá az analitikai eredmény teljes bizonytalanságához, különösen nyers áruk esetén. Ez más analitikai területeken is jellemző, pl. az ömlesztett áruk mikotoxin koncentrációjának becslésénél, illetve üvegházi áruk nitráttartalmának mérésekor. A mintavételi és analitikai bizonytalanság kombinációját számos nemzetközi szervezet tanulmányozza, elsősorban a EURACHEM, mely a mintavételi bizonytalansággal foglalkozó új munkacsoportot alakított.

Koncentrációeloszlások

Hagyományosan a GMO területen normál eloszlást feltételeznek. Két GMO jártasságvizsgálati séma adatait vizsgálták azonban meg. Ez három év alatt 29 alkalommal 43 vizsgálati anyag adatait jelentette. A két jártasságvizsgálat eredményei hasonlóak, megerősítik egymást. A kvantitatív PCR meghatározás során használt amplifikálási eljárásból következően a normál, binomiális és lognormál eloszlás keveréke várható, az utóbbi kettő dominanciájával. Az előrejelzésnek megfelelően a vizsgálati eredmények következetesen pozitív irányba torzult eloszlást mutatnak. A z-pontszámok számítása előtt a log transzformációval közel szimmetrikus eloszlásokat kaphatunk, amelyek eléggé megközelítik a normál eloszlást, így a normál eloszlás alapján jogosan értelmezhetőek. Azt kell tehát megfontolni, hogy minden mennyiségi meghatározási adatot alá kell-e vetni logaritmikus transzformációnak elemzés előtt.

Irodalom

1. ISO/AOAC/IUPAC harmonized protocol (Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies, Ed. Horwitz, Pure & Appl. Chem. 331-343, 67, 1995)
2. Guidelines on Measurement Uncertainty (CAC/GL 54-2004)
3. Codex Draft Guidance Document on “The Use of Analytical Results: Sampling Plans, Relationship between the Analytical Results, the Measurement Uncertainty, Recovery Factors and Provisions in Codex Standard”
4. Draft ISO-standard (ISO/DIS 24276) or the corresponding French standard (AFNOR XP V03-020-2, tabled as room document CRD 5 in its previous version AFNOR XP V03-020-1 by the French Delegation at the 24th Session of CCMAS)
5. Codex General Guidelines on Sampling (CAC/GL 50-2004)
6. FP5 KeSTE project.
7. prEN ISO 21568
8. Scoring in Genetically Modified Organism Proficiency Tests Based on Log-Transformed Results, Michael Thompson, Stephen I. R. Ellison, Linda Owen, Kenneth Mathieson, Joanne Powell, Roger Wood and Andrew P Damant, Journal of AOAC International, 2006, 89(1), 232- 239

Laboratóriumi körvizsgálattal validált GMO analitikai módszerek

A következő táblázatos összeállítás 32 validált módszert tartalmaz melyek közül 31 PCR alapú, csak 1 fehérjealapú ELISA módszer.

Tárgy (GMO)	Minőségi/ mennyiségi	Koordinátor*	Év	Eredmény	Megjegyzés
GTS 40-3-2 (Roundup® Ready szója) 1	minőségi	BfR	1998	Nem volt hamis pozitív és hamis negatív	konstrukciós specifikus PCR módszer a minta csak szójabab.
Génmódosított para-dicsom (Zeneca) 1	minőségi	BfR	1999	Nem volt hamis pozitív és hamis negatív	konstrukciós specifikus PCR módszer, a minta csak paradicsom-darabok.
Bt 11 kukorica 1	minőségi	BfR	2000	hamis pozitív (%): 5, hamis negatív (%): 10	Konstrukciós specifikus PCR módszer, a minta csak kukoricaszem
176-os kukorica 1	minőségi	BfR	2000	Nem volt hamis pozitív és hamis negatív	Konstrukciós specifikus PCR módszer, a minta csak kukoricaszem
T25 kukorica (LibertyLink) 1	minőségi	BfR	2001	hamis pozitív (%): 0, hamis negatív (%): 12	Konstrukciós specifikus PCR módszer, a minta őrölt kukoricaszem, amely 0,1 és 1 súly% T 25-öt tartalmaz.

Tárgy (GMO)	Minőségi/ mennyiségi	Koordinátor*	Év	Eredmény	Megjegyzés
MON 810 kukorica 1	minőségi	BfR	2001	Nem volt hamis pozitív és hamis negatív	Konstruktíóspezifikus PCR módszer, a minta örölt kukoricaszem, amely 0,1 és 1 súly% MON 810-et tartalmaz
35S promoter karfiol mozaikvírusból (CaMV) 1	minőségi	BfR	1999	Nem volt hamis pozitív és hamis negatív	csak szójamagok (RRS és nem-GM szójabab) a minta
35S promoter CaMV-ből 1	minőségi	EC-JRC	1999	hamis pozitív (%): 3,9, hamis negatív (%): 1,9	Szűrőmódszer: a minták különböző élelmiszermatrixok 0, 2, 100% (súly%) RRS és Event 176 kukorica tartalommal
Nopalin szintáz (NOS) terminátor Agrobacterium tumefaciens-ből 1	minőségi	EC-JRC	1999	hamis pozitív (%): 1,8, hamis negatív (%): 2,1	Szűrőmódszer: a minták különböző élelmiszermatrixok 0, 2, 100% (súly%) RRS és Event 176 kukorica tartalommal
Neomicin foszfortranszferáz gén (nptII) 1	minőségi	BfR	1998	Nem volt hamis pozitív és hamis negatív	Szűrőmódszer: a minták kizárólag paradicsom-darabkák
Génmódosított papaya	minőségi	BfR	2005	hamis pozitív (%): 3,3, hamis negatív (%):3,3	Konstruktíóspezifikus PCR módszer: 0, 10 és 100 súly% GM papayát tartalmazó nyers minták
35S promoter CaMV-ből 2	mennyiségi	KLB	1999	A reprodukálhatóság relatív szórása (RSDR) a 17-34% tartományban	Real time PCR szűrőmódszer, 0,7-3 súly% közötti RRS port tartalmazó minták. Ugyanaz az anyag a kalibráláshoz és az ismeretlenekhez.
Roundup® Ready szója2	mennyiségi	KLB	1999	RSDR a 16-28% tartományban	Real time PCR konstrukcióspezifikus módszer, 0,7-3 súly% közötti RRS port tartalmazó minták. Ugyanaz az anyag a kalibráláshoz és az ismeretlenekhez.
Roundup® Ready szója 2	mennyiségi	BfR	2000	RSDR a 27-44% tartományban	Real time PCR konstrukcióspezifikus módszer, 0,1-5 súly% közötti RRS port tartalmazó minták. Ugyanaz az anyag a kalibráláshoz és az ismeretlenekhez
176 kukorica 2	mennyiségi	BfR	2000	RSDR a 33-42% tartományban	Real time PCR konstrukcióspezifikus módszer, 0,1-5 súly% közötti 176-os kukorica port tartalmazó minták. Ugyanaz az anyag a kalibráláshoz és az ismeretlenekhez

Tárgy (GMO)	Minőségi/ mennyiségi	Koordinátor*	Év	Eredmény	Megjegyzés
Roundup® Ready szója 2	mennyiségi	NFRI	2001 - 2002	RSDR a 11-16% tartományban	Real time PCR konstrukciós specifikus módszer, 0,1-10 súly% közötti RRS port tartalmazó minták. Kalibrálásra a cél DNS-t tartalmazó plazmid standardokat használtak.
MON 810 kukorica 2	mennyiségi	NFRI	2001 - 2002	RSDR a 12-32% tartományban	Real time PCR konstrukciós specifikus módszer, 0,1-10 súly% közötti MON 810 kukoricaport tartalmazó minták. Kalibrálásra a cél DNS-t tartalmazó plazmid standardokat használtak.
176-os kukorica 2	mennyiségi	NFRI	2001 - 2002	RSDR a 9-21% tartományban	Real time PCR konstrukciós specifikus módszer, 0,1-10 súly% közötti 176-os kukoricaport tartalmazó minták. Kalibrálásra a cél DNS-t tartalmazó plazmid standardokat használtak.
Bt 11 kukorica 2	mennyiségi	NFRI	2001 - 2002	RSDR a 11-24% tartományban	Real time PCR konstrukciós specifikus módszer, 0,1-10 súly% közötti Bt 11 kukoricaport tartalmazó minták. Kalibrálásra a cél DNS-t tartalmazó plazmid standardokat használtak.
Ga 21 kukorica 2	mennyiségi	NFRI	2001 - 2002	RSDR a 14-22% tartományban	Real time PCR konstrukciós specifikus módszer, 0,1-10 súly% közötti Ga 21 kukoricaport tartalmazó minták. Kalibrálásra a cél DNS-t tartalmazó plazmid standardokat használtak.
T 25 kukorica 2	mennyiségi	NFRI	2001 - 2002	RSDR a 11-28% tartományban	Real time PCR konstrukciós specifikus módszer, 0,1-10 súly% közötti T 25 kukoricaport tartalmazó minták. Kalibrálásra a cél DNS-t tartalmazó plazmid standardokat használtak.
Bt 11 kukorica 2	mennyiségi	EC-JRC	2003	RSDR a 13-33% tartományban	Real time PCR esemény specifikus módszer, Bt 11 DNS keveréket tartalmazó minták melyek 0,1-2 súly% közötti. Bt 11 kukoricának felelnek meg. Kalibrálásra és ismeretlennek ugyanaz a DNS forrás.

Tárgy (GMO)	Minőségi/mennyiségi	Koordinátor*	Év	Eredmény	Megjegyzés
MON 810 kukorica 2	mennyiségi	EC-JRC	2003 - 2004	RSDR a 32-45% tartományban	Real time PCR eseményspecifikus módszer, 0,1-5 súly% közötti MON 810 kukorica port tartalmazó minták. Ugyanaz az anyag a kalibráláshoz és az ismeretlenekhez
NK 603 kukorica 3	mennyiségi	EC-JRC	2004	RSDR a 25-37% tartományban	Real time PCR eseményspecifikus módszer, 0,1-5 súly% közötti NK 603 kukorica port tartalmazó minták. Ugyanaz az anyag a kalibráláshoz és az ismeretlenekhez
GA 21 kukorica 3	mennyiségi	EC-JRC	2004	RSDR a 29-44% tartományban	Real time PCR eseményspecifikus módszer, 0,1-4,26 súly% közötti GA 21 kukorica port tartalmazó minták. Ugyanaz az anyag a kalibráláshoz és az ismeretlenekhez
MON 863 kukorica 3	mennyiségi	EC-JRC	2004	RSDR a 18-35% tartományban	Real time PCR eseményspecifikus módszer, 0,1-10 súly% közötti MON 863 kukorica port tartalmazó minták. Ugyanaz az anyag a kalibráláshoz és az ismeretlenekhez
TC 1057 kukorica (Herculex TM I) 3	mennyiségi	EC-JRC	2004	RSDR a 18-35% tartományban	Real time PCR eseményspecifikus módszer, TC 1507 DNS keveréket tartalmazó minták melyek 0,1-5 súly% közötti. TC 1507 kukoricának felelnek meg. Kalibrálásra és ismeretlenek ugyanaz a DNS forrás.
T 25 kukorica3	mennyiségi	EC-JRC	2005	RSDR a 18-26% tartományban	Real time PCR eseményspecifikus módszer, T 25 DNS keveréket tartalmazó minták melyek 0,13-3,3 súly% közötti. T 25 kukoricának felelnek meg. Kalibrálásra és ismeretlenek ugyanaz a DNS forrás.
DAS-59122-7 kukorica3	mennyiségi	EC-JRC	2005	RSDR a 13-25% tartományban	Real time PCR eseményspecifikus módszer, DAS-59122-7 DNS keveréket tartalmazó minták melyek 0,1-4,5 súly% közötti. DAS-59122-7 kukoricának felelnek meg. Kalibrálásra és ismeretlenek ugyanaz a DNS forrás.

Tárgy (GMO)	Minőségi/ mennyiségi	Koordinátor*	Év	Eredmény	Megjegyzés
H7-1 cukorrépa vonal3	mennyiségi	EC-JRC	2005	RSDR a 13-20% tartományban	Real time PCR eseményspecifikus módszer, H7-1 DNS keveréket tartalmazó minták melyek 0,1-5 súly% közötti. H7-1 cukorrépa vonalnak felelnek meg. Kalibrálásra és ismeretlenek ugyanaz a DNS forrás.
Roundup® Ready szója 4	mennyiségi	CSL	2002	RSDR a 20-34% tartományban	Real time PCR konstrukcióspecifikus módszer, 0,5-3,9 súly% közötti RRS port tartalmazó minták. Ugyanaz az anyag a kalibráláshoz és az ismeretlenekhez
Roundup® Ready szója 5	mennyiségi	EC-JRC	1999	RSDR a 9-17% tartományban	ELISA módszer: 0,5 súly% és 2súly% közötti RRS port tartalmazó minták

* BfR - Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, Németország

EC-JRC - Az Európai Bizottság Közös Kutatóintézete, Ispra, Olaszország

KLB - Kantonales Laboratorium Basel, Svájc

CSL - Central Science Laboratory, York, Anglia

NFRI - National Food Research Institute, Tsukuba, Japan

- Részletes leírás: ISO/FDIS 21569 "Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Qualitative nucleic acid based methods".
- Részletes leírás ISO/FDIS 21570 "Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Quantitative nucleic acid based methods".
- A validálási tanulmány részletes leírása az EU Közösség referencialaboratóriumától, Community Reference Laboratory (CRL), Ispra, Italy (<http://gmo-crl.jrc.it/statusofdoss.htm>).
- Hird H, Powell J, Johnson ML, Oehlschlager S. Determination of percentage of RoundUp Ready soya in soya flour using real-time polymerase chain reaction: interlaboratory study. J AOAC Int. (2003); 86 (1):66-71.
- Részletes leírás: ISO/FDIS 21572 "Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Protein based methods".