

# Geharmoniseerde benaderingen voor validatie van methoden voor GGO detectie in het NRL volgens de nieuwste EU aanbevelingen

*N. Papazova, N. Roosens*

*Platform Biotechnologie en Moleculaire Biologie, Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid, J. Wytsmanstraat 14, 1050 Brussel, België*

*I. Taverniers, M. De Loose*

*Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek (ILVO), Eenheid Technologie & Voeding (T&V), Burg. Van Gansberghelaan 115, 9820 Merelbeke, België*

## Implementatie van EU-RL GMFF gevalideerde methoden in een routine laboratorium werkend onder ISO 17025: de EU context

De EU-wetgeving inzake genetisch gemodificeerde levensmiddelen en diervoeders vereist dat event-specifieke methoden voor de detectie van GGO's gebruikt worden (1). Real-time PCR of qPCR is momenteel de meest toegepaste techniek voor GGO detectie en dit dankzij de hoge gevoeligheid en de mogelijkheid voor kwantificering van de doelsequentie. Real-time PCR methoden voor GG event-specifieke kwantificering zijn ontwikkeld door de biotech-bedrijven die deze methoden indienen bij de aanvraag van een vergunning voor een nieuwe GG-event. De methoden werden eerst geëvalueerd en vervolgens gevalideerd in een interlaboratoriumtest georganiseerd door het Europees referentielaboratorium voor genetisch gemodificeerde levensmiddelen en diervoeders (EURL-GMFF). De methoden worden zo omgevormd tot officiële methoden voor de nationale referentielaboratoria. Deze methoden zijn opgenomen in het Compendium van referentiemethoden voor de analyse van het GGO's (2) en zijn beschikbaar op de EU-RL-website (<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/StatusOfDossiers.aspx>).

De EU-RL methoden zijn methoden voor kwantificering van de GG event. Echter, een GGO analyse bestaat uit verschillende stappen: screening met behulp van element-specifieke methoden (bijvoorbeeld p35S, tNOS, CP4 EPSPS, enz.), identificatie van de aanwezige events met behulp van event-specifieke methoden, en kwantificering ook met behulp van event-specifieke methoden. Bij de identificatie stap wordt de event-specifieke methode toegepast als kwalitatieve methode die als resultaat aan- of afwezigheid van de GG events geeft alsook, in geval events aanwezig zijn, of deze al dan niet kwantificeerbaar zijn.

Momenteel zijn er 51 methoden gepubliceerd voor EU-toegelaten events alsook events die wachten op toelating (<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/StatusOfDossiers.aspx>). De nationale referentielaboratoria van elke lidstaat van de EU moeten de officiële methoden implementeren voor events toegestaan onder Commissie Verordening nr. 1829/2003 (1) en de onlangs goedgekeurde Commissie Verordening nr. 619/2011 ("low-level" aanwezigheid of LLP; 3). Negenentwintig events zijn momenteel toegelaten voor voedingsmiddelen, diervoeders of teelt, 18 events zijn opgenomen in de LLP lijst. Echter, deze aantallen veranderen heel snel en stegen aanzienlijk de afgelopen twee jaar.



In 2011-2012 is het aantal nieuwe, te implementeren methoden snel toegenomen. Tot 2011 was het voldoende voor de laboratoria om 4-5 methoden te implementeren per jaar, terwijl in 2011 en 2012 na de uitvoering van de verordening LLP dit nummer verhoogd is tot 13. De NRL staat voor een enorme uitdaging om het toenemend aantal officiële methoden op een geharmoniseerde wijze op laboratorium niveau te implementeren.

De vragen "Hoe de event-specifieke methode implementeren in het laboratorium voor (kwalitatieve) identificatie en kwantificering?"; "Welke criteria in acht te nemen voor acceptatie van de testen?"; "Welke monsters en hoeveel monsters te testen?" en "Hoe de experimentele opstelling te organiseren teneinde representatieve resultaten te bekomen?" vormen grote uitdagingen voor de analytische controlelaboratoria, zoals de Belgische nationale referentie laboratoria (NRL).

Tot 2011 bestonden er geen specifieke richtsnoeren voor laboratorium verificatie van GGO detectiemethoden. Als gevolg daarvan gebruikte elk ENGL laboratorium zijn eigen benaderingen gebaseerd op bestaande normatieve documenten of interne procedures. Meestal werd het document "Method Performance Requirements" (4) gebruikt als basis voor de laboratorium validatie van de methode. Ook werden verschillende artikelen over dit onderwerp gepubliceerd (5, 6, 7), echter waren er geen geharmoniseerde richtlijnen op EU-niveau beschikbaar.

## Geharmoniseerde ENGL leidraden voor methode verificatie

In 2009 werd binnen het Europees netwerk van GGO laboratoria (ENGL) een werkgroep opgestart rond methode verificatie, dewelke als output van haar werkzaamheden een document publiceerde inzake de laboratorium implementatie / methode verificatie van event-specifieke methoden gevalideerd in een interlaboratorium ring-onderzoek. Het document "Verificatie van analytische methoden voor het GGO testen bij implementatie van interlaboratorium gevalideerde methoden" (8) harmoniseert enkele termen en definities en, wat het meest relevant is, verschaft leidraden voor het verifiëren van de gevalideerde methoden in het routine laboratorium.

Het ENGL methode verificatie document (8) harmoniseert verschillende items:

- Terminologie: Geharmoniseerde definities worden aangerijkt voor laboratoriummonster, analysemonster, testportie, DNA replicaten en PCR replicaten. Deze staan weergegeven in de woordenlijst. Definities van de analytische parameters zijn tevens beschikbaar. Een volledige lijst van definities kan worden gevonden in het document verificatie methode (8).
- Procedure voor de beoordeling van de parameters: Het document beschrijft algemene procedures voor de beoordeling van verschillende parameters, inclusief het minimum aantal analyses dat moet worden uitgevoerd (bijvoorbeeld minimum aantal punten in calibratiecurves ter bepaling van  $R^2$ , PCR efficiëntie, dynamisch bereik; minimum aantal PCR resultaten om juistheid en precisie te bepalen). Belangrijke informatie in dit verband is de procedure om de absolute LOD (detectielimiet) en LOQ (kwantificatielimiet) te bepalen, aangezien deze vaak als "cut-off" waarden gebruikt worden in de identificatie stap van routinematige GGO analyses. Vóór de publicatie van het verificatie document was er geen uniforme wijze voor het bepalen van deze parameters. Gedetailleerde informatie over de beoordeling van DNA kwaliteit en zuiverheid wordt eveneens verstrekt. Voor elke parameter worden de aanvaardbaarheidscriteria, die in overeenstemming zijn met de methode verificatie richtsnoeren in het document, ook opgegeven.
- Voorbeelden worden gegeven van experimentele opstellingen voor de evaluatie van de parameters. De voorbeelden bieden verschillende alternatieve instellingen voor het gebruik van een aantal verschillende calibratiecurves, punten in elke ijkcurve, PCR replicaten, test stalen, GM % niveaus, enz. Op deze manier kan het laboratorium haar eigen set-up definiëren die past binnen de minimale vereisten gedefinieerd in de

procedure voor het bepalen van de specifieke parameter. Een voorbeeld van experimentele instelling voor de verificatie van een kwantitatieve methode wordt gegeven in figuur 1.

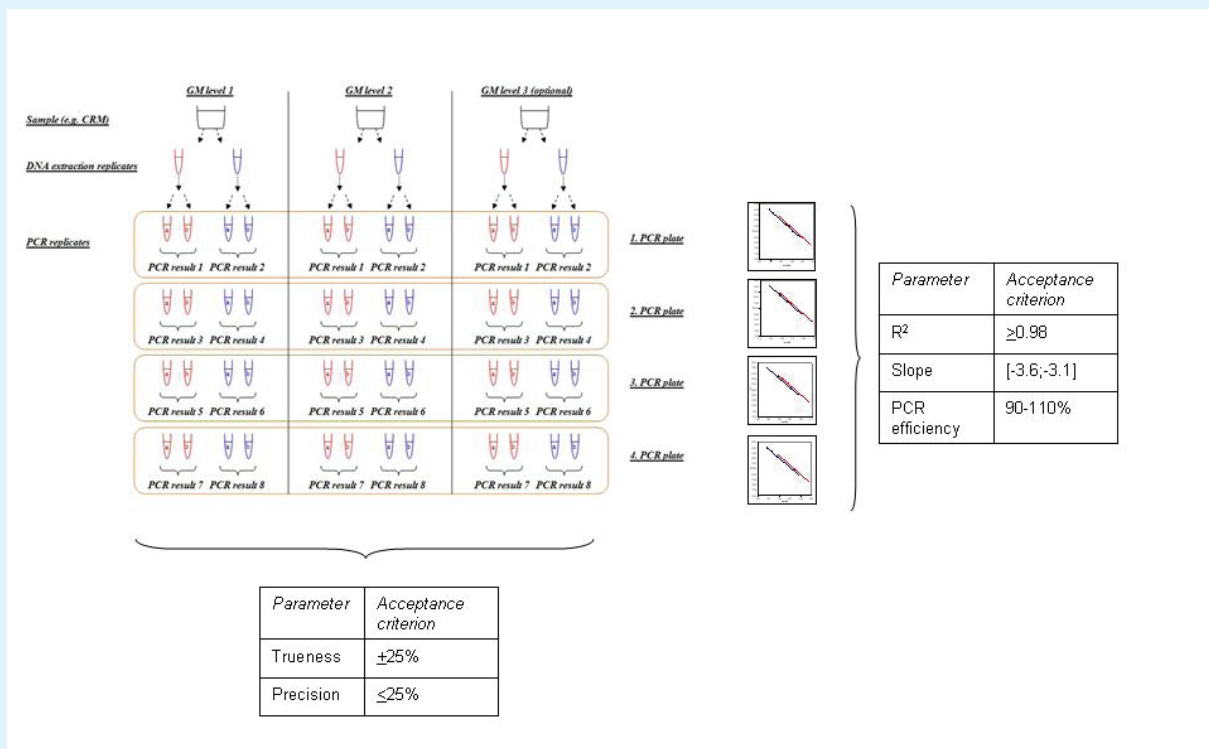


Fig. 1. Voorbeeld van een workflow voor verificatie van GGO kwantitatieve methoden. Tenminste twee verschillende GGO % niveaus worden geanalyseerd: één op 0,1% en één rond de drempelwaarde van 0,9%. Een derde GGO % rond de bovengrens van het dynamisch bereik kan optioneel worden meegenomen. Voor elk GGO % worden 2 DNA-extracten bereid. Op elk DNA extract worden twee PCR replicaten gepipetteerd. Voor de bepaling van R<sup>2</sup>, PCR efficiëntie, dynamisch bereik, worden vier kalibratiecurves bereid. Elk van hen bevat ten minste 5 kalibratiepunten. Elk kalibratiepunt wordt daarbij in duplo uitgevoerd in de PCR. Ter bepaling van de juistheid en precisie worden 4 onafhankelijke PCR replicaten geanalyseerd. Dit resulteert in 32 PCR-resultaten in totaal. De aanvaardingscriteria voor de methode verificatie zoals beschreven in het methode verificatie document (8) komen overeen met deze in het "Methode Performantie Vereisten" document (4).

## Implementatie van ENGL leidraden binnen het Belgische NRL-GGO

De implementatie van de methode verificatie richtsnoeren in de uitvoerende laboratoria is een complex gegeven aangezien de labs hun validatieprocedures dienen aan te passen. Bovendien zijn de vereisten verschillend voor in de EU-toegelaten GG events versus events die onder de verordening LLP richtlijn vallen. Voor de eerste groep geldt een drempel van 0,9% voor verplichte etikettering, terwijl voor het tweede een MRPL ("Minimum Required Performance Limit") van 0,1% is ingesteld. Dit vereist dat het laboratorium dergelijke events moet kunnen kwantificeren tot op 0,1%. Daarom moeten geschikte experimentele instellingen worden toegepast om via eenzelfde experimentele setup alle methoden te kunnen valideren.

Op 4 oktober 2012 organiseerde het Belgische NRL-GGO in samenwerking met het FAVV een workshop "Methode validatie en MO (meetonzekerheid) bepaling voor kwantificering van GGO's". Deze workshop was gericht op een discussie rond de praktische implementatie van de nieuwe ENGL richtsnoeren in de laboratoria en de problemen die de labs daarbij ondervinden.

De conclusies van de workshop waren dat het NRL zeer geavanceerd is in de implementatie van de ENGL richtsnoeren voor verificatie van methoden. Alle verplichte parameters worden getest, zoals aanbevolen in het "Verificatie" document en de criteria voor elk van de parameters worden aangenomen. De bepaling van de  $LOD_{abs}$  en de  $LOQ_{abs}$  wordt uitgevoerd op een vergelijkbare manier.

De verificatie van methoden voor kwantificering volgt verschillende set ups, maar gebeurt in lijn met de aanbevolen richtsnoeren. De gebruikte instellingen laten toe om een voldoende aantal PCR resultaten te genereren voor zowel de kalibratiecurves als de analysemonsters, om zodus de verplichte parameters -  $R^2$ , PCR efficiëntie, juistheid en precisie - te kunnen berekenen.

## Vooruitzichten

Harmonisatie in methode verificatie, noodzakelijk in functie van de uitvoering van de EU-RL GMFF officiële, event-specifieke real-time PCR methodes voor alle EU-toegelaten en LLP events op een routinematige basis in de uitvoerende laboratoria, zorgt ervoor dat uniforme criteria op EU-niveau in de laboratoria worden gebruikt. Echter, tijdens deze verificatie kunnen de laboratoria specifieke problemen ondervinden of vragen hebben, bvb. over de te gebruiken analysemonsters, hoe om te gaan met methoden die niet voldoen aan de criteria voor acceptatie, criteria voor absolute LOD, LOQ, wanneer en hoe robuustheid te testen (bijvoorbeeld wijzigingen in het volume van de reactie, gebruik van verschillende PCR instrumenten, ...), enzomeer. Bovendien wordt het document "Methode Performantie Vereisten" momenteel herzien en wordt publicatie van een nieuwe, meer uitgewerkte versie binnenkort verwacht. De ENGL richtsnoeren zullen verder worden verbeterd om specifieke vragen van de labo's te kunnen beantwoorden.

De goedkeuring van de geharmoniseerde richtsnoeren door het NRL-GGO zorgt voor het toepassen van betrouwbare methoden en op die manier tevens voor hoge kwaliteit van de analytische resultaten. De NRL-GGO verbetert voortdurend de methode verificatie procedures op laboratorium niveau en zal actief deelnemen aan de verdere verbetering van de ENGL richtsnoeren. Echter, de uitdaging blijft het implementeren van alle officiële methoden op een tijds-, kosten- en arbeid-efficiënte wijze.

## Referenties:

1. Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. Official Journal of the European Union, L 268, pp.1-23.
2. European Union reference laboratory for GM food and feed (EURL-GMFF), European Network of GMO Laboratories (ENGL), Compendium of Reference Methods for GMO analysis, JRC reference reports, EUR-Scientific and Technical Research series, EUR 24596 EN, 2010, Available at [http://ec.europa.eu/dgs/jrc/downloads/jrc\\_reference\\_report\\_2010\\_11\\_gmo\\_analysis\\_compendium.pdf](http://ec.europa.eu/dgs/jrc/downloads/jrc_reference_report_2010_11_gmo_analysis_compendium.pdf)
3. Commission Regulation (EU) No 619/2011 of 24 June 2011 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed as regards presence of genetically modified material for which an authorisation procedure is pending or the authorisation of which has expired
4. European Network of GMO Laboratories (ENGL), Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical methods of GMO Testing, 2008, <http://gmocrl.jrc.ec.europa.eu/guidancedocs.htm>.
5. Žel J., Mazzara M., Savini C., Cordeil S., Camloh M., Štebih D., Cankar K., Gruden K., Morisset D. and Van den Eede G.. Method Validation and Quality Management in the Flexible Scope of Accreditation: An Example of Laboratories Testing for Genetically Modified Organisms, Food Anal. Methods, 1 (2): 61-72, 2008.
6. Scholtens I.M.J., Kok E.J., Hougs L., Molenaar B., Thissen J.T.N.M., van der Voet H. Increased Efficacy for In-house Validation of Real-time PCR GMO Detection Methods. Analytical and Bioanalytical Chemistry 396 (6): 2213-27, 2010.
7. Ciabatti I., Froio A., Gatto F., Amaddeo D., Marchesi U. In-house validation and quality control of real-time PCR methods for GMO detection: a practical approach. Dev. Biol. 126: 79-86; discussion 324, 2006.
8. Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods. EUR 24790 EN. 2011.

## Vocabulary:

### **Method verification**

Verification is the confirmation, by the provision of objective evidence, that certain requirements are fulfilled [ISO 9000:2000 paragraph 3.8.4]. The verification that a laboratory adequately performs a standard method can be carried out, requires that the laboratory provides objective evidence that the performance parameters, specified in the test method, are fulfilled for the matrices to which the method is applied. The critical requirements are over the general accuracy (usually expressed in terms of "bias") and the precision (considered as repeatability and reproducibility) which are reflected in the measurement uncertainty. The objective evidence is the accuracy and precision obtained on the basis of actual laboratory results.

### **DNA-extraction replicates**

DNA extracted from different test portions of the same sample.

### **PCR replicates**

PCR reactions performed on the same DNA extract but analysed in different reaction tubes.

### **Test result**

A test result is a Ct value or the number of copies derived from a PCR replicate.

### **Minimum Required Performance Limit (MRPL)**

The lowest amount or concentration of the analyte in a sample that can be reliably detected and confirmed by official laboratories.

*nina.papazova@wiv-isp.be*

