



T.C. TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI



GDO ANALİZLERİNDE VERİFİKASYON REHBERİ



T.C. TARIM VE ORMAN BAKANLIğI

GDO ANALİZLERİNDE VERİFİKASYON REHBERİ



Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü

Şubat 2023



T.C. TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI

ÖNSÖZ

Son yıllarda gıda güvenliği ve güvenilirliği konusunda dünyanın en çok ilgilendiği konuların başında biyoteknoloji ve biyoteknolojik yöntemlerle elde edilen genetik olarak değiştirilmiş organizmaların (GDO) kullanımı gelmektedir. Tarım ürünlerinde modern biyoteknolojiyi kullanarak ürün dayanıklılığını, verimini ve kalitesini artırma gibi amaçlarla genetik değişiklik yapılmaktadır. GDO'lara ilişkin dünyadaki gelişmelerin yakından takip edilmesi, ülkemizin bu konudaki politikalarının belirlenmesi açısından oldukça önemlidir.

Dünya üzerinde GDO'lu tarımsal ürün ekimi yapan birçok ülke bulunmaktadır. Ülkemizde gıda amaçlı onay verilmiş bir gen bulunmamaktadır ve GDO'lu ürünlerin birincil üretimi yasaktır. Bu sebeple Bakanlığımız ithalat kontrolleri ve yurt içi kontrollerinde laboratuvarlarımız tarafından yapılacak GDO analizleri ve analiz sonuçlarının güvenilirliğinin sağlanması için metotların verifikasyonu büyük önem arz etmektedir. Bu kapsamda Laboratuvarlarımızda GDO analizleri ile ilgili metot birliğinin sağlanması ve GDO analizlerinde uygulanacak verifikasyon parametrelerinin belirlenmesi amacı ile Bakanlığımıza bağlı Gıda Kontrol Laboratuvarlarından ve Bakanlığımız tarafından yetkilendirilen Özel Gıda Kontrol Laboratuvarlarından konu uzmanlarının katılımıyla yapılan toplantılar ve uzmanlarımızın özveriyle çalışmaları neticesinde oluşturulan ve yayımlanan "GDO Analizlerinde Verifikasyon Rehberi", ulusal/uluslararası dokümanlar doğrultusunda ve konu uzmanlarımızın değerli katkıları ile güncellenmiştir.

"GDO Analizlerinde Verifikasyon Rehberi"nin hazırlanmasında ve güncellenmesinde yoğun çaba sarfeden konu uzmanlarına, Genel Müdürlüğümüz personeline ve bu konuda emeği geçenlere şükranlarımı sunuyorum.

Dr. Durali KOÇAK
Gıda ve Kontrol Genel Müdürü

İlk Yayın Tarihi: 00- Nisan 2018

Güncelleme No & Tarihi: 02- Şubat 2023



T.C. TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI

YÖNETİM KOMİTESİ

Dr. Durali KOÇAK
Selman AYAZ
Erol BULUT
Osman AKYÜZ
Tevfik B. ALTUNKAYNAK

Genel Müdür
Genel Müdür Yardımcısı
Gıda Kontrol ve Laboratuvarlar D. Bşk.
Mühendis (Çalışma Grup Sorumlusu)
Tarım ve Orman Uzmanı

GÖREV ALANLAR VE KATKIDA BULUNANLAR (*)

Nihal AKMAN
Sevgi AKSOY
Ali ALMA
Erdem ARTUVAN
Elif ATMACA
Dr. Gönül GÜVEN AYATA
Şule AYDIN
Beyza BALABAN
Dr. Fatma GÜNGÖR BOYNUYERİ
Dr. Zümrüt ÜRKÜT COPCUOĞLU
Hasan ÇELLİK
Ayfer DEMİREL
Fatma AYDIN ERARSLAN
Dr. Recep GEÇKİNLİ
Aykut GÜLEREN
Alper GÜNGÖR
Dr. Burcu GÜVEN
Sevda YAZICI

Dr. Ayşe GÜMÜŞ KARACA
Dr. Şafak BAŞIAÇIK KARAKOÇ
Dursun KIRIŞIK
Gülhis KOKANGÜL
Dr. Esra Alpözen MENGEN
Dr. Eren NUMANOĞLU
Feryal ÖKSÜZCE
Aybike ÖNER
Çiğdem ÖNER
S. Dilek ÖZCAN
M. Kürşat ÖZTÜRK
Utkucan PARLAKÇI
Dr. Gülsen SÖYLEMEZ
Ferruh TOMBUL
Orhan TURAN
H. Aytül TÜRK MENOĞLU
Metin YILDIRIM
Doç. Dr. Aysun YILMAZ

* Soyadına göre alfabetik dizin

İlk Yayın Tarihi: 00- Nisan 2018

Güncelleme No & Tarihi: 02- Şubat 2023



İÇİNDEKİLER

1. AMAÇ VE KAPSAM	1
2. VERİFİKASYON PARAMETRELERİ	1
2.1. DNA Ekstraksiyonu ve Saflaştırılması	2
2.1.1. İnhibisyon Kontrolü	2
2.2. Yanlış Pozitif Oranı (%).....	4
2.3. Yanlış Negatif Oranı (%).....	4
2.4. Tespit Limitinin (LOD) Hesaplanması	5
2.4.1. Rölatif LOD (LOD_{rel})	5
2.4.2. Absolüt LOD (LOD_{abs})	5
2.4.3. Asimetrik LOD (LOD_{asym})	6
2.5. Cross-talk.....	7
2.6. Kesinlik (Precision) (Kantitatif)	8
2.6.1. Tekrarlanabilirlik	9
2.7. Ölçüm Limitinin Hesaplanması (LOQ) (Kantitatif).....	9
2.7.1. Rölatif LOQ (LOQ_{rel}).....	9
2.7.2. Absolüt LOQ (LOQ_{abs})	9
2.8. Doğruluk (Trueness).....	10
2.9. Dinamik Aralık, R^2 Katsayısı ve Amplifikasyon Verimliliği (Kantitatif).....	11
2.10. Sağlamlık (Robustness)	12
3. İÇ KALİTE KONTROLLERİ	13
4. İLAVE ÇALIŞMA YAPILMASI GEREKEN DURUMLAR	13
4.1. Personel Yetkilendirme	13
4.2. Yeni PCR Cihazı	15
4.3. Metot/Kit Değişikliği.....	15
4.4. Alan Değişikliği.....	15
4.5. Gıda Üretimi Amacıyla Yetiştirilen Ürünlerin Yaprak, Gövde, Kök Gibi Bitki Kısımlarının Analizi	15
5. KAYNAKLAR	16



T.C. TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI

1. AMAÇ VE KAPSAM

Bu doküman ile laboratuvarlarımızda GDO analizleri ile ilgili metot birliğinin sağlanması ve GDO analizlerinde uygulanacak verifikasyon parametrelerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Bu doküman ulusal/uluslararası kuruluşlarca onaylanmış, valide edilmiş standart PCR temelli kalitatif ve kantitatif GDO analizlerinde verifikasyon çalışmalarını kapsar. Validasyonu yapılmamış ya da eksik yapılmış metotlar ve çoklu (multiplex) kantitatif metotlar bu dokümanın kapsamı dışındadır.

2. VERİFİKASYON PARAMETRELERİ

GDO analizlerinde **valide edilmiş** metotların laboratuvarlar tarafından uygulanabilmesi için bir takım doğrulama çalışmaları yapılmalıdır. Yapılacak çalışmalar Çizelge 1’de verilmiştir.

Çizelge 1. GDO Analizleri için Yapılması Gereken Çalışmalar

Parametre	Kalitatif metotlar	Kantitatif metotlar
DNA ekstraksiyonu ve saflığı	Evet	Evet
DNA inhibisyon testi	DNA Ekstraksiyon Verifikasyonunda yapılır.	DNA Ekstraksiyon Verifikasyonunda yapılır.
Dinamik aralık, R ² katsayısı ve Amplifikasyon verimliliği	Gerektiğinde yapılır. (DNA ekstraksiyon inhibisyon kontrolünde çalışılmamışsa R ² ve amplifikasyon verimliliği) Dinamik aralık yok	Evet
Doğruluk (Trueness)	-	Evet
Kesinlik (Precision)	-	Evet
Ölçüm limitinin hesaplanması (LOQ)	-	Evet
Tespit limitinin hesaplanması (LOD)	Evet/ Çoklu (Multiplex) metotlarda* opsiyonel	-
Asimetrik LOD (LOD _{asym})	Çoklu (Multiplex) metotlarda*	-
Cross-Talk	Çoklu (Multiplex) metotlarda*	-
Yanlış Pozitif Oranı %	Evet	-
Yanlış Negatif Oranı %	Evet	-
Sağlamlık (Robustness)	Gerektiğinde Evet**	Gerektiğinde Evet**

*Çoklu (Multiplex) Metot; iki veya daha fazla hedefin bir reaksiyonda eş zamanlı olarak tespit edildiği metottur.

**Detaylar 2.10’da tanımlanmıştır.

İlk Yayın Tarihi: 00- Nisan 2018

Güncelleme No & Tarihi: 02- Şubat 2023



T.C. TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI

2.1. DNA Ekstraksiyonu ve Saflaştırılması

Prosedür: Bu parametre kalitatif ve kantitatif tüm analizler için kullanılır. Metot daha önceden valide edilmişse her DNA ekstraksiyonu en az 2 paralel ve her seferinde ayrı test porsiyonu olacak şekilde ayrı günlerde ve farklı analistlerle yapılmalıdır.

DNA ekstraksiyon verifikasyon çalışması için matriks grubu olarak işlenmemiş gıda, işlenmiş gıda, yem, tohum ve bitki kısımları (yaprak, kök, gövde gibi) belirlenmiştir. Seçilen matrikslerin GDO içermesi zorunlu değildir. Bu matriks gruplarından hangisi/hangileri laboratuvarın onaylı faaliyet listesinde yer alıyorsa/alacaksa o grubu temsilen belirtilen matriksle ayrı günlerde (en az 3 farklı günde) 6 tekrarlı ekstraksiyon yapılarak sonuçların ortalama değeri, standart sapma ve RSD hesaplanır. Örneğin 3 gün x 6 tekrar x 1 matriks = 18 ekstraksiyon analist sayısına bölünerek yapılabilir.

$$STSapma = s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$RSD\% = \frac{s}{x} \times 100$$

2.1.1. İnhibisyon Kontrolü

Prosedür: Herhangi bir matriksten elde edilen DNA'lardan inhibisyon riski en fazla olan örnek (bebek maması, lesitin, DDGS, melas, çikolata ve diğer kakaolu ürünler gibi aşırı işlem görmüş ürünler) tercih edilerek, **en az bir** tanesi inhibisyon testine tabi tutulmalıdır. Bu amaçla DNA ekstraktı çalışma konsantrasyonuna ayarlanır (örneğin **40 ng/μL**). Bu çalışma dilüsyonunda **en az 4 noktalı** dilüsyon serisi (1:4, 1:16, 1:64, 1:256) oluşturulur. Çalışma konsantrasyonundan ve her bir dilüsyondan **en az 2 PCR** tekrarı çalışılır. Bu dört dilüsyondan kalibrasyon eğrisi oluşturulur (Çizelge 2 ve Şekil 1).

Hesaplamanın yapılabilmesi için sırasıyla her bir dilüsyon faktörü için ölçülen Ct değerleri yazılır. Bu değerlerin her bir çifti için ortalaması alınır. ΔCt, ardışık dilüsyonların Ct ortalamalarının farkı ile bulunur. Dilüsyon faktörünün logaritmaları alınır ve Ct ortalamaları ile logaritmik değerlerin eğrisi çizilir. Eğrinin eğimi ve R² katsayısı hesaplanır. Bu çalışma takson spesifik, kloroplast/aktin geni taraması gibi PCR yöntemlerinden herhangi biri ile yapılabilir.

Reaksiyonun verimi aşağıdaki şekilde hesaplanır;

$$\text{Verim: } 10^{(-1/\text{eğim})-1}$$

İlk Yayın Tarihi: 00- Nisan 2018

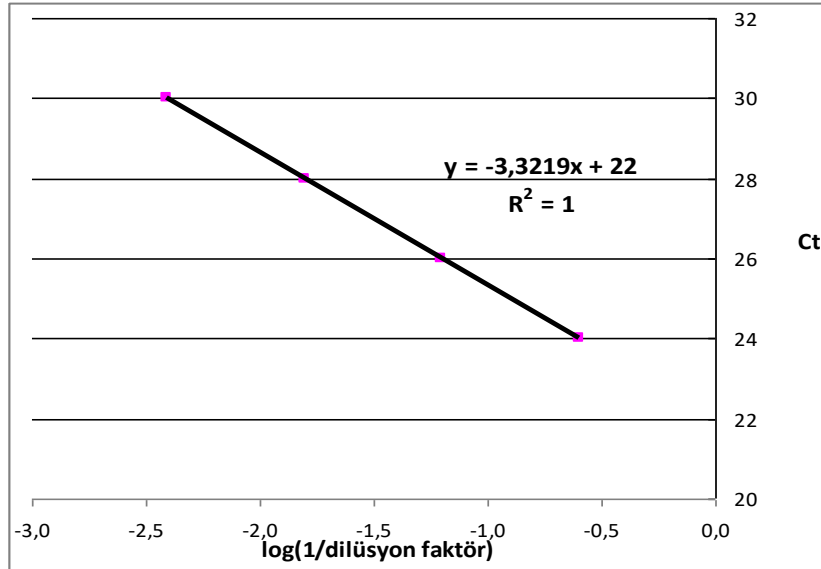
Güncelleme No & Tarihi: 02- Şubat 2023



T.C. TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI

Çizelge 2. Kabul Edilebilir DNA Kalitesi

Örnek Kodu: 1					
Dilüsyon Faktörü	Ölçülen Ct	Ortalama Ct	ΔCt	Beklenen ΔCt	Logaritma
1:4	24	24,00	2,00	2,00	-0,6021
	24				
1:16	26	26,00	2,00	2,00	-1,2041
	26				
1:64	28	28,00	2,00	2,00	-1,8062
	28				
1:256	30	30,00	2,00	2,00	-2,4082
	30				
	Ölçülen Ct	Ortalama Ct	Tahmini Ct	Tahmini - Ortalama Ct	Değerlendirme
Çalışma Dilüsyonu	22	22,00	22,00	0,000	GEÇERLİ
	22				



Şekil 1. Kabul Edilebilir DNA Kalitesi Kalibrasyon Eğrisi

Kabul kriteri: İnhibisyon testi yapılan DNA ekstraktları aşağıda belirtilen 3 kriteri de sağlamalıdır.

İlk Yayın Tarihi: 00- Nisan 2018

Güncelleme No & Tarihi: 02- Şubat 2023



T.C. TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI

1. Ortalama fark (ΔCt), ölçülen Ct değeri ile tahmini (ekstrapole) Ct değeri arasındaki fark $< 0,5$ olmalıdır.
2. Kalibrasyon eğrisinin eğimi $-3,6$ ile $-3,1$ arasında olmalıdır. (Rafine yağlar, lesitin, ileri işlenmiş gıda ve yemler gibi ürünlerde bu değer $-4,1$ ile $-3,1$ arasında olabilir)
3. R^2 değeri $\geq 0,98$ olmalıdır.

Eğer ekstrakte edilen DNA inhibitör içeriyorsa DNA saflaştırılmalı veya inhibisyonun ortadan kaldırıldığı noktaya kadar dilüsyon yapılmalıdır.

2.2. Yanlış Pozitif Oranı (%)

Bu oran, bilinen negatif bir numunenin kullanılan metotla pozitif olarak tanımlanması olasılığıdır ve yüzde (%) olarak ifade edilmektedir. Bu parametre her ne kadar validasyon parametresi olsa da laboratuvarlardaki personelin konu hakkındaki yetkinliğinin artırılması için tüm kalitatif analizlerin verifikasyonunda istenmektedir.

Prosedür: İstenilen güvenilirlik seviyesi, çalışmada kullanılan örneklerin sayısına bağlıdır. Onaylı faaliyet listesinde yer alan/yer alacak yem, tohum ve gıdalarda (işlenmiş ve işlenmemiş) her bir matriks için 2 ekstraktta 5 tekrarlı çalışma yapılmalıdır (2 ekstraksiyon x 4 matriks x 5 tekrar). Bu aşamada **40 çalışma tüm personele dağıtılarak** farklı PCR çalışmalarında (farklı run'larda) toplamı 40 tekrar olacak şekilde tamamlanır.

Kabul kriteri: Çalışma güven aralığı % 95 olmalıdır.

% Yanlış Pozitif Sonuç = $(\text{Pozitif tespit edilen negatif örnek sayısı} / \text{Bilinen tüm negatif örneklerin sayısı}) \times 100$

2.3. Yanlış Negatif Oranı (%)

Bu oran, bilinen pozitif bir numunenin kullanılan metotla negatif olarak tanımlanması olasılığıdır ve yüzde (%) olarak ifade edilmektedir. Bu parametre her ne kadar validasyon parametresi olsa da laboratuvarlardaki personelin konu hakkındaki yetkinliğinin artırılması için tüm kalitatif analizlerin verifikasyonunda istenmektedir.

İlk Yayın Tarihi: 00- Nisan 2018

Güncelleme No & Tarihi: 02- Şubat 2023



T.C. TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI

Prosedür: İstenilen güvenilirlik seviyesi çalışmada kullanılan örneklerin sayısına bağlıdır. Onaylı faaliyet listesinde yer alan/yer alacak ürün grubuna göre yem, tohum ve gıdalarda (işlenmiş ve işlenmemiş) her bir matriks için 2 ekstrakta 5 tekrarlı çalışma yapılmalıdır. Verifikasyonu yapılan gen bölgelerini içerecek şekilde en fazla eşik değeri (% 0,9) seviyesinde (örneğin LOD düzeyinde; % 0,05, % 0,1 gibi) CRM / CRM'lerle spike yapılarak elde edilen pozitif numune çalışılır (2 ekstraksiyon x 4 matriks x 5 tekrar). Bu aşamada toplam **40 çalışma tüm personele dağıtılarak** farklı PCR çalışmalarında (farklı run'larda) yapılır.

Kabul Kriteri: Çalışma güven aralığı % 95 olmalıdır.

% Yanlış Negatif Sonuç= (Negatif tespit edilen pozitif örnek sayısı / Bilinen tüm pozitif örneklerin sayısı) x 100

2.4. Tespit Limitinin (LOD) Hesaplanması

Çoklu metotlar için opsiyoneldir.

Prosedür: LOD rölatif (%) veya absöüt (kopya sayısı) olarak hesaplanabilir.

2.4.1. Rölatif LOD (LOD_{röl})

Düşük GM seviyesindeki pozitif kontrol materyalinin en az **10 PCR** tekrarı ile ölçülmesi ve aynı yüzdeye sahip tüm tekrarların (aynı çalışmada) pozitif olduğu en düşük seviyenin bulunmasıdır.

Kabul Kriteri: Çalışma % 95 güven aralığında validasyon verileri ile uyumlu (< % 0,045 m/m) olmalıdır.

2.4.2. Absöüt LOD (LOD_{abs})

% 95 güven aralığında LOD_{abs}'un belirlenebilmesi için 60 PCR paraleli gereklidir. Ancak pratikte **1 kopya zorunlu** olmak üzere **en az 3 farklı** seviyede (**Beklenen LOD**, üstü ve altı) **en az 10 PCR** tekrarı şeklinde çalışılır (**örneğin 20, 10, 5 ve 1 kopya**). Yanlış negatif oranı % 5'ten az olmalıdır. Bu durumda tüm PCR sonuçlarının da pozitif olması gerekir.

İlk Yayın Tarihi: 00- Nisan 2018

Güncelleme No & Tarihi: 02- Şubat 2023



T.C. TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI

Kabul kriterleri:

1. LOD tüm 10 değerin de pozitif bulunduğu en düşük seviye olarak kabul edilir.
2. LOD_{abs} 3 kopyadan küçük olamaz.
3. Çalışma % 95 güven aralığında validasyon verileri ile uyumlu (< 25 kopya) olmalıdır.
4. Bir (1) kopya çalışması sonuçlarının yaklaşık % 36'sının negatif olması beklenmektedir. % 36'dan az negatif sonuç bulunması, seyreltme hatasını göstermektedir. Örneğin, 10 tekrarlı 1 kopya çalışması sonuçlarından en az 4 paralelin negatif olması gerekmektedir.

Yanlış negatif sonuç, analit miktarının LOD seviyesine yaklaştığı miktarlarda görülür. Dilüsyon serileri seçilirken daha önceki bilgiler ışığında beklenen LOD_{abs} seviyesinin üzerinde ve altında konsantrasyonlar kullanılmalıdır.

2.4.3. Asimetrik LOD (LOD_{asym})

Çoklu (Multipleks) Real Time PCR çalışmalarında yüksek miktarda başka hedef(ler)in mevcudiyetinde güvenilir bir şekilde saptanabilen ancak miktarsal olarak ölçülemeyen bir hedefin numunedeki en düşük (yaklaşık LOD_{abs} düzeyinde, < 25 kopya /reaksiyon) miktarıdır.

Prosedür: Verifikasyonu yapılacak çoklu metodun validasyon çalışmalarında LOD_{asym} yer almalıdır. Her bir hedef bölge için seviye validasyon verilerine göre belirlenerek LOD_{asym} çalışılmalıdır. Yüksek miktardaki diğer hedeflerin varlığında hedef sekans 25 kopya/reaksiyonu; diğer hedef(ler)in toplam miktarı 20000 kopya / reaksiyonu geçmemelidir (Çizelge 3).



T.C. TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI

Çizelge 3. Üçlü (Triplex) PCR için LOD_{asym} Çalışma Örneği (Her seviye için 10 tekrar)

Çoklu PCR koşulları	Hedef Sekans A (kopya /reaksiyon)	Hedef Sekans B (kopya /reaksiyon)	Hedef Sekans C (kopya /reaksiyon)
LOD _{asym} Hedef A	10	2500	2500
LOD _{asym} Hedef B	2500	10	2500
LOD _{asym} Hedef C	2500	2500	10

Not: Bir veya daha fazla PCR tekrarı negatif ise PCR için kullanılan DNA konsantrasyonu verifikasyona göre kontrol edilmelidir. Örneğin; yüksek miktardaki hedeflerin kopya sayıları tüm tekrarlar pozitif sonuç verene kadar (6 dilusyon seviyesinde 6 tekrar olacak şekilde) çalışılacaktır.

Kabul kriteri: Verifikasyon verileri, yayımlanmış validasyon verileri ile uyumlu olmalıdır. Her hedef bölge için 10 tekrar çalışılmalı, hedef sekans tüm paralel çalışmalarda pozitif sonuç vermelidir.

2.5. Cross-talk

Farklı hedeflerin amplifikasyonu sırasında üretilen floresan sinyalleri, diğer tespit kanallarına sızabilir ve sinyaller birbiri ile çakışabilir. Bu etki cross-talk olarak bilinmekte, hedef dizi amplifikasyonunu taklit ederek, yanlış amplifikasyona ve yanlış pozitif sonuca neden olabilmektedir.

Not: Cross-talk etkisi genellikle, yöntem için seçilen boyalara ve cihaz ayarlarına bağlı olup, kalitatif ve kantitatif çoklu PCR (mpPCR) yöntemlerinin doğrulanması sırasında değerlendirilmelidir. Genel olarak, cihaz yazılımının uygun boya kalibrasyon ayarları ile ve birbirlerinden uzakta spektral emisyonu veren raportör boya seçimi ile bu problem önlenmektedir.

İlk Yayın Tarihi: 00- Nisan 2018

Güncelleme No & Tarihi: 02- Şubat 2023



T.C. TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI

Prosedür: Cross-talk'un olmadığı gösterilmesi amacıyla PCR modülü ve ilgili kanal için hedef DNA içermeyen ancak diğer hedef(ler) ve ilgili kanal(lar) için yüksek hedef kopya sayıları içeren örneklerle her modül için 3 tekrarlı olarak çalışılır. Hedef dizilerin miktarı, LOD_{asym}'nin belirlenmesinde kullanılan kopya sayıları ile uyumlu olmalıdır (örneğin; kanal başına 20.000 kopya, bkz. Çizelge 4).

Çizelge 4. Dörtlü (tetraplex)-PCR için Cross-talk Çalışma Örneği (Her koşul için 3 tekrar)

Koşul	Hedef A (kopya/ reaksiyon)	Hedef B (kopya/ reaksiyon)	Hedef C (kopya/ reaksiyon)	Hedef D (kopya/ reaksiyon)
Cross-talk A	0	20000	20000	20000
Cross-talk B	20000	0	20000	20000
Cross-talk C	20000	20000	0	20000
Cross-talk D	20000	20000	20000	0

Not 1: Cross-talk PCR çalışmasının yapıldığı hedef içermeyen kanalda, boya tarafından emilen floresan sızıntısı (filtre sızıntısı) olarak değerlendirilmektedir. Kanalda tespit edilen floresan sinyali, farklı bir PCR'da probun moleküler cross-hibridizasyonundan da kaynaklanabilir. Her Real-Time PCR cihazı, kanallardaki cross-talk sinyalleri açısından kontrol edilmelidir. Cross-talk tespit edilirse kullanılan referans materyalden kaynaklanabilecek kontaminasyon olup olmadığını göstermek için tekli (single-plex) çalışma yapılmalıdır.

Not 2: Hedef dizilerin bir kanalda aynı raportör boya ile aynı anda tespit edildiği çoklu PCR (Single-colour multiplex PCR) yöntemleri için cross-talk çalışması gerekli değildir.

Kabul kriteri: Cross-talk tespit edilmemelidir. Olası cross-talk sinyali tespit kanalının floresan eşik değerinin (threshold) altında olmalıdır.

2.6. Kesinlik (Precision) (Kantitatif)

Kesinlik çalışması tekrarlanabilirlik ile hesaplanır.

İlk Yayın Tarihi: 00- Nisan 2018

Güncelleme No & Tarihi: 02- Şubat 2023



T.C. TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI

2.6.1. Tekrarlanabilirlik

Prosedür: Doğruluk (Trueness) ile aynı koşullarda yapılan çalışmalardır. Tekrarlanabilirlik koşulları altında PCR tekrarları ile hesaplanmaktadır. Tekrarlanabilirlik test edilen tüm GM seviyeleri için yapılmalıdır. Test koşulları rutin analiz şartları ile aynı olmalıdır. En az 16 PCR sonucu elde edilmelidir.

Kabul kriteri: Dinamik aralık içerisinde rölatif tekrarlanabilirlik standart sapması \leq % 25 olmalıdır.

2.7. Ölçüm Limitinin Hesaplanması (LOQ) (Kantitatif)

Prosedür: Kopya sayısının RSD'sinin \leq % 25'i sağladığı en düşük konsantrasyondur. LOQ rölatif (%) veya absöüt (kopya sayısı) olarak hesaplanabilir. Metot kalitatif amaçla kullanılacaksa LOQ gerekli değildir.

2.7.1. Rölatif LOQ (LOQ_{rel})

Pozitif kontrol materyali örneğin % 0,1 konsantrasyonunda 10 PCR tekrarı olacak şekilde analiz edilir. 10 tekrar hedef GM ve 10 tekrar da referans gen analiz edilir. Gerçek LOQ_{rel} belirlenebilmesi için düşük GM yüzdesinde dilüsyonlar yapılmalıdır.

2.7.2. Absöüt LOQ (LOQ_{abs})

Bilinen pozitif kontrolden (ör: % 1) dilüsyon serileri oluşturulur ve 10 PCR tekrarı yapılır (örneğin; 80, 60, 40, 20, 10, 5 ve 1 kopya). LOQ_{abs} RSD'nin \leq % 25 olduğu son dilüsyon serisidir.

LOQ ayrıca "Guidance Document on Measurement Uncertainty for GMO Testing Laboratories" dokümanı üzerinden hesaplanabilir.

İlk Yayın Tarihi: 00- Nisan 2018

Güncelleme No & Tarihi: 02- Şubat 2023



T.C. TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI

2.8. Doğruluk (Trueness)

Prosedür: Doğruluk, belirlenen eşik değerinde ya da metotta belirtilen veya LOQ değerine yakın bir seviyede çalışılmalıdır. Eğer bu mevcut değilse miktarı bilinen bir sertifikalı referans materyal ile spike yapılarak referans materyal oluşturulabilir.

Eğer doğruluk, CRM ile belirlenememişse yeterlilik testlerine katılımı da hesaplanabilir. En az 2 konsantrasyonda referans materyal ile çalışılmalıdır. Bu konsantrasyonlardan biri LOQ seviyesine yakın olmalı (örneğin; % 0,1), diğeri etiketleme seviyesinde olmalıdır. Üçüncü olarak farklı bir konsantrasyon seviyesinde çalışma önerilir ve bu seviye yüksek konsantrasyonda olmalıdır (örneğin; % 5). Alternatif olarak yüksek seviyede CRM'den spike yapılarak referans örnek oluşturulabilir. Bunun için GM pozitif ve negatif örneklerdeki referans gen miktarı aynı kalibrasyon eğrisinde okunarak belirlenir ve aşağıdaki formülle dilüsyon faktörü hesaplanır.

$$X = \left(\frac{A}{B}\right)(Y - 1) + 1$$

X= Dilüsyon faktörü

A= GM pozitif DNA ekstraktındaki referans gen kopya sayısı

B= GM negatif DNA ekstraktındaki referans gen kopya sayısı

Y= Teorik dilüsyon faktörü (ör: % 10 GM'den % 0,1 GM hazırlanırsa Y=100x)

Test koşulları rutin analiz şartları ile aynı olmalıdır. En az 16 PCR tekrarı ile elde edilmelidir.

Aşağıda belirtilen farklı deney desenleri kullanılabilir.

Deney Deseni 1: 2 DNA ekstraksiyonu her bir GM seviyesinde, 2 PCR paraleli her bir ekstraksiyondan 4 plate çalışıldığında en az 16 test sonucu ve 8 GM değerlendirmesi yapılır.

1 GM seviyesi x 2 DNA ekstraksiyonu x 2 PCR paraleli x 4 Plate = 16 test sonucu

Deney Deseni 2: 2 DNA ekstraksiyonu her bir GM seviyesinde, 4 PCR paraleli her bir ekstraksiyondan 2 plate çalışıldığında en az 16 test sonucu ve 4 GM değerlendirmesi yapılır.

İlk Yayın Tarihi: 00- Nisan 2018

Güncelleme No & Tarihi: 02- Şubat 2023



T.C. TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI

1 GM seviyesi x 2 DNA ekstraksiyonu x 4 PCR paraleli x 2 Plate = 16 test sonucu

Kabul kriteri: Gerçek referans değerden $\pm\%25$ sapma olabilir veya eğer yeterlilik testi katılımı varsa z skoru 2 ile -2 aralığında olmalıdır.

$$E\left[\frac{X}{Y}\right] \approx \frac{\bar{x}}{y} + \frac{\bar{x}}{y^3} \text{Var}(y)$$

$$\text{Var}\left[\frac{X}{Y}\right] \approx \left(\frac{\bar{x}}{y}\right)^2 \left(\frac{\text{Var}(x)}{x^2} + \frac{\text{Var}(y)}{y^2}\right)$$

$$sd[X/Y] = \sqrt{\text{Var}[X/Y]}$$

$$\overline{GM} = \frac{\sum_{i=1}^j GM_i}{j}$$

$$sd_{GM} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^j (n_i - 1) sd_i^2 / \sum_{i=1}^j n_i - k}{j - 1}}$$

$$RSD_r = \frac{sd_{GM}}{GM_{ort}} 100$$

E: tahmini GM

j: Kullanılan GM sayısı

n: Her bir ekstraksiyondaki tekrar sayısı

k: Birleştirilecek standart sapma sayısı

2.9. Dinamik Aralık, R² Katsayısı ve Amplifikasyon Verimliliği (Kantitatif)

Prosedür: Dinamik aralık, R² katsayısı ve amplifikasyon verimliliği standart eğri üzerinden değerlendirilen doğruluk (trueness) ve kesinlik parametreleri doğrulanmış bir parametredir. En az iki standart eğrinin değerlerinin ortalaması alınmalıdır.

Deney Deseni 1: 4 veya 5 kalibrasyon noktasında her bir noktada en az 2 paralel 2 kalibrasyon eğrisi oluşturulur. (Tavsiye Edilen)

İlk Yayın Tarihi: 00- Nisan 2018

Güncelleme No & Tarihi: 02- Şubat 2023



T.C. TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI

Deney Deseni 2: 4 veya 5 kalibrasyon noktasında her bir noktada 2 paralel 4 kalibrasyon eğrisi oluşturulur.

Kabul Kriteri: Amplifikasyon verimliliği için; kantitatif metotlarda eğrinin eğimi $-3,1 \geq \text{Eğim} \geq -3,6$ aralığında olmalıdır. Bu aralık % 90-110 amplifikasyon verimliliğine karşılık gelir.

Verimlilik = $(10^{(-1/\text{eğim})} - 1) \times 100$ formülü ile uygulamanın verimi ispatlanmalıdır.

R^2 katsayısı için; Ortalama değer R^2 için $\geq 0,98$ olmalıdır.

2.10. Sağlamlık (Robustness)

Orjinal metottaki konsantrasyonlar (Primer prob, master miks, DNA konsantrasyonu vb.) ve/veya termal profil değiştirildiğinde sağlamlık çalışması yapılmalıdır. Ekipman, sarf malzeme (primer prob ve master miks markası) değişikliğinde sağlamlığın yapılmasına gerek yoktur. Sağlamlık çalışması orjinal metotla ve değiştirilen metotla her bitki taksonunu (soya, kanola, mısır ve pamuk vb.) temsilen birer tipte 2 seviyede (örneğin; % 0,1 ve en fazla % 1) ikiye çalışma 3 paralel şekilde yapılır. Verifikasyonda sağlamlık çalışmaları Çizelge 5'deki gibi yapılır.

Çizelge 5. Verifikasyonda Sağlamlık Çalışma Deseni

Faktör	Koşul 1	Koşul 2
Master miks konsantrasyonu	Sabit	-% 10
Primer konsantrasyonu	Sabit	-% 30
Prob konsantrasyonu	Sabit	-% 30
Bağlanma Sıcaklığı	+1°C	-1°C

İlk Yayın Tarihi: 00- Nisan 2018

Güncelleme No & Tarihi: 02- Şubat 2023



T.C. TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI

3. İÇ KALİTE KONTROLLERİ

İç kalite kontrolleri Çizelge 6'daki ISO 24276'ya göre her çalışmada yapılmalıdır. Bu parametrelerin varlığı kalite kontrol kartı parametrelerini kapsamaktadır.

Çizelge 6. ISO 24276 GDO Analizlerinde Kullanılan Kontroller

Kontrol adımları	Çevre kontrol ^b	Ekstraksiyon kör kontrol ^c	Pozitif ekstraksiyon kontrol ^ç	Pozitif DNA hedef kontrol ^d	Negatif DNA hedef kontrol ^e	Amplifikasyon reaktif kontrol ^f	PCR inhibisyon kontrol ^g
Homojenizasyon	Zorunlu						
Nükleik asit ekstraksiyonu	a ↓	Her seride bir	Belirli aralıklarda zorunlu				
Nükleik asit kalitesinin değerlendirilmesi	↓	↓	↓				
Nükleik asit amplifikasyonu	↓	↓	↓	Zorunlu	Tavsiye edilir	Zorunlu	Tavsiye edilir, bazı durumlarda zorunlu ^ğ
Nükleik asit amplifikasyonunun sonuçlarının değerlendirilmesi	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Değerlendirme	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
İzlenebilirlik (Analiz Detay Formu veya Cihaz kaydı)	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
a	Kontrolün uygulanacağı analiz basamaklarını gösterir.						
b	Çevre kontrolü çalışma ortamının kontaminasyonu hakkında bilgi vermesi açısından önemlidir. İlk aşamadan başlar. Numunenin öğütülmesi gerekiyorsa bu aşamada başlanır.						
c	En az bir ekstraksiyon kör kontrol her bir seride kullanılmalıdır.						
ç	Pozitif ekstraksiyon kontrol yeni lot numaralı kimyasallar kullanıldığında yapılmalıdır.						
d	Pozitif DNA hedef kontrol GDO veya hedef takson kontrolüdür. Bu uygun bir pozitif ekstraksiyon kontrol ile de sağlanır.						
e	Negatif DNA hedef kontrol yanlış pozitif hakkında bilgi verir.						
f	Amplifikasyon reaktif kontrol ekstraksiyon kör kontrol kullanıldığında uygulanmayabilir						
g	PCR inhibisyon kontrolü çözünebilir inhibitörlerin bulunmadığını göstermek için de kullanılabilir. Bu kalıp Nükleik Asidin seri sulandırması ile gösterilebilir. Bununla birlikte çözünebilir inhibitörlerin örnek sonuçlarına etkisinin değerlendirileceği değişik yöntemler uygulanabilir.						
ğ	PCR inhibisyon kontrolü örnekte tüm PCR-testlerinin negatif olduğu ve amplifiye edilebilir DNA miktarının bilinmediği durumlarda zorunludur.						

4. İLAVE ÇALIŞMA YAPILMASI GEREKEN DURUMLAR

4.1. Personel Yetkilendirme

Kalitatif analizlerde verifikasyona katılmamış yeni personel için LOD/LOD_{asym} çalışması yaptırılır. Çalışmalar ekstraksiyon verifikasyonundan başlamalıdır. Yeni personele GDO Tarama Analizi, bir Bitki Spesifik Gen ve bir gen bölgesi için Tip Belirleme Analizinde

İlk Yayın Tarihi: 00- Nisan 2018

Güncelleme No & Tarihi: 02- Şubat 2023



T.C. TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI

LOD/LOD_{asym} seviyesinde 10 tekrarlı çalışma yaptırılır. Laboratuvar kapsamında aynı analiz için farklı metotlar olması durumunda, her bir metot için de LOD/LOD_{asym} seviyesinde 10 tekrarlı çalışma yaptırılır. Kalitatif analizlerde verifikasyona katılan personelden birinin işten ayrılması durumunda kalan verifikasyon verileri asgari koşulları sağlamıyorsa eksik çalışmalar diğer personel tarafından tamamlanır. Tüm personelin işten ayrılması durumunda ise tüm çalışmalar yenilenir.

Kantitatif analizlerde personelin yetkilendirilmesi yapılırken mevcut yetkilendirilmiş bir personel ile kopya sayısı ve ΔCt gibi farklı prensip ile çalışılan metotlar için birer miktar analizi karşılıklı çalışılır. Her gen bölgesinin verifikasyonunun en az bir personel tarafından yapılmış olması gerekir.

Kantitatif analizlerde, verifikasyona katılan personelden birinin işten ayrılması durumunda, kalan verifikasyon verilerinin asgari şartları (en az 16 test sonucu) sağlaması durumunda ilave çalışmaya gerek yoktur. Kalan verifikasyon verilerinin asgari şartları sağlamaması durumunda; laboratuvar miktar analizlerinde en az 4 yıl süreyle Bakanlık tarafından yetkili ise ayrılan personelin yaptığı verifikasyon çalışmalarından en az 1 tanesinin yenilenmesi (Eğer kopya sayısı ve ΔCt gibi farklı prensip ile çalışılan metotlar varsa, her birinden en az 1 gen bölgesi için verifikasyon yenilenir) yeterli olacaktır. Ancak, miktar analizlerinde verifikasyona katılan personelden birinin/birkaçının işten ayrılması durumunda, ayrılan personelin çalıştığı gen sayısının laboratuvarda çalışılan toplam gen sayısının %50'sini geçmesi durumunda bu oran % 50'ye ulaşacak şekilde eksik verifikasyonlar yenilenir.

Laboratuvarın gen ya da plate paylaşabilmesi için en az 1 gen bölgesinde personel arasında karşılaştırma çalışması yapması ve istatistiki olarak fark olmadığını göstermiş olması gerekmektedir. Analistler arasında karşılaştırma yapmak amacıyla laboratuvarda çalışılacak tiplerden herhangi biri için analistlerin tümü aynı çalışmaları yapar. Her bir analistin verileri kabul kriterlerini karşılıyorsa diğer genlerin verifikasyonu tek bir analist tarafından yapılabilir.

İlk Yayın Tarihi: 00- Nisan 2018

Güncelleme No & Tarihi: 02- Şubat 2023



T.C. TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI

4.2. Yeni PCR Cihazı

Yeni cihaz kullanıma alınmadan önce her analiz grubu (tarama, tip belirleme ve miktar vb.) için kalitatif analizlerde LOD seviyesinde 10 tekrarlı (tip belirleme analizleri için 1 tip seçilerek), kantitatif analizlerde 1 gen bölgesinde LOQ seviyesinde miktar analizi (kopya sayısı ve ΔCt) çalışması yapılır.

4.3. Metot/Kit Değişikliği

Yeni metot/kit kullanıma alınmadan önce verifikasyon yapılır.

4.4. Alan Değişikliği

İç kontrol parametreleri kontrol edilir. Parametrelerde bir değişiklik olursa düzeltici faaliyet başlatılır. Faaliyetin değerlendirilmesine göre verifikasyon veya parametre yenilenir. Taşınmadan dolayı performansı etkilenebilecek cihazların kalibrasyonları ve performans kontrolleri yaptırılır/yapılır.

4.5. Gıda Üretimi Amacıyla Yetiştirilen Ürünlerin Yaprak, Gövde, Kök gibi Bitki

Kısımlarının Analizi

Laboratuvarlar; organik tarım, iyi tarım uygulamaları ve benzeri gıda üretimi amacıyla yetiştirilen ürünlerin yaprak, gövde, kök gibi bitki kısımlarının (*bitkilerin çoğaltımı amacıyla kullanılacak tohumluklar hariç*) analizlerini yapabilmek için kapsam genişletme başvurusunda bulunmalıdır.

Kapsam genişletme çalışmalarında bu ürünler tek bir matriks olarak kabul edilerek DNA izolasyonu verifikasyonu yapılması ve elde edilen DNA'nın ileri analizlerde kullanılabilir olduğunun gösterilmesi için matriks/matrikslere laboratuvarın kapsamındaki GDO Tarama analizi metodunun LOD seviyesinde spike yapılarak 10 tekrarlı bir çalışma yapılması ve sonuçların GDO Tarama analizi verifikasyon dokümanına ilave edilmesi gereklidir.

Not: GDO Analizlerinde Verifikasyon Rehberi'ne yeni eklenen "Asimetrik LOD" ve "Cross-talk" parametreleri, bu dokümanın yayım tarihinden sonra yapılacak verifikasyon çalışmalarında aranacaktır.

İlk Yayın Tarihi: 00- Nisan 2018

Güncelleme No & Tarihi: 02- Şubat 2023



T.C. TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI

5. KAYNAKLAR

JRC Technical Report, Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods, Version 2, EUR 29015 EN, 2017.

JRC Technical Report, Guidance document on multiplex real-time PCR methods, EUR 30708EN, 2021.

JRC Technical Report, Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing, 2015.

CAC/GL 74-2010.Guidelines on performance criteria and validation of methods for detection, identification, and quantification of specific DNA sequences and specific proteins in foods.

ISO 24276 Foodstuffs -Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – General requirements and definitions.

JRC Technical Report, Guidance Document on Measurement Uncertainty for GMO Testing Laboratories, EUR 22756 EN/ 2.

İlk Yayın Tarihi: 00- Nisan 2018

Güncelleme No & Tarihi: 02- Şubat 2023