

Verwendung von zertifiziertem Referenzmaterial für die Quantifizierung von GVO in Lebens- und Futtermitteln

September 2006

Letzte Überarbeitung: August 2019

Dieser Anwendungshinweis enthält Informationen und Leitlinien über die korrekte Verwendung der Referenzmaterialien der GFS, die für den genetisch veränderten Massenanteil eines spezifischen GV-Ereignisses zertifiziert sind. Er erläutert, wie das Messsystem für die Quantifizierung von GVO im EU-Kontext aufgebaut ist.

Verfasser: Stefanie Trapmann

Europäische Kommission – Gemeinsame Forschungsstelle

Retieseweg 111, 2440 Geel, Belgien

E-Mail: stefanie.trapmann@ec.europa.eu

EINLEITUNG

Gentechnisch veränderte Organismen (GVO) müssen vor der Einführung auf dem EU-Markt zugelassen werden. Verordnung (EG) Nr. 1830/2003 sieht vor, dass Lebens- und Futtermittel mit einem GVO-Gehalt von mehr als 0,9 % gekennzeichnet werden müssen. Nach Verordnung (EU) Nr. 619/2011 dürfen Futtermittel einen Massenanteil von 0,1 % eines GVO enthalten, dessen Zulassungsverfahren noch läuft oder dessen EU-Zulassung abgelaufen ist. Für die Umsetzung der EU-Rechtsvorschriften muss die Quantifizierung der in Lebens- bzw. Futtermitteln enthaltenen GVO auf zuverlässige Weise erfolgen. Aus diesem Grund werden in der von der EG veröffentlichten Zulassungsentscheidung jedes einzelnen GVO die Methode zur Erkennung und das zertifizierte Referenzmaterial (ZRM) genannt, die für den Aufbau des für die Quantifizierung verwendeten Messsystems benutzt wurden. Das offizielle ZRM wird verwendet, um die vom Europäischen Referenzlabor für GVO in Lebens- und Futtermitteln (EU-RL GMFF) validierte ereignisspezifische PCR-Referenzmethode zu kalibrieren.

MERKMALE VON GVO-ZRM

Die zertifizierten Werte aller GVO-ZRM der GFS basieren auf der Masse des getrockneten genetisch veränderten Pflanzenmaterials (in den meisten Fällen Samenpulver) und/oder des getrockneten nicht genetisch veränderten Pflanzenmaterials. Für ZRM, bei denen Materialien mit und ohne GVO miteinander gemischt werden müssen, werden die Massen bei der Zertifizierung entsprechend ihres Wassergehalts und der geschätzten Reinheit korrigiert. Der GVO-Massenanteil wird wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{GVO Masse, korrigiert}}{\text{GVO Masse, korrigiert} + \text{Nicht GVO Masse, korrigiert}}$$

GVO-ZRM werden stets für den Massenanteil eines spezifischen GV-Ereignisses zertifiziert (auf dem Zertifikat angegeben). Das ZRM kann nur zur

Quantifizierung dieses Ereignisses verwendet werden. Das entsprechende Nicht-GVO-Material kann nur für den Nachweis verwendet werden, dass der Anteil des Ereignisses unterhalb der auf dem Zertifikat angegebenen Nachweisgrenze liegt.

Für jedes GVO-ZRM werden auf dem Zertifikat die empfohlenen Lagerungsbedingungen angegeben. Der Hersteller des Referenzmaterials haftet nicht für Veränderungen, die sich während der Lagerung des Materials beim Kunden ergeben, insbesondere nicht bei geöffneten Proben. Wenn ein GVO-ZRM mehrmals verwendet wird, sollte die Wasseraufnahme von hygroskopischen Stoffen minimiert werden, indem der Behälter unverzüglich nach der Entnahme einer Probe wieder verschlossen wird.

METHODE ZUR QUANTIFIZIERUNG VON GVO

Für die Quantifizierung des Gehalts an GVO in Lebens- und Futtermittelproben wird häufig die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) verwendet. Bei dieser DNA-basierten Quantifizierungsmethode wird das Verhältnis zwischen transgener, d. h. aus genetischer Veränderung stammender Desoxyribonukleinsäure (DNA) und für die biologische Spezies spezifischer endogener DNA gemessen.

Die von der GFS freigegebenen GVO-ZRM sind für die Verwendung in Kombination mit einer vom EU-RL GMFF validierten ereignisspezifischen quantitativen PCR-Referenzmethode vorgesehen. Gemäß den Vorschriften der Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 eingereichte und validierte quantitative PCR-Erkennungsmethoden stehen der Öffentlichkeit über die Homepage des EU-RL GMFF zur Verfügung (<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/StatusOfDossiers.aspx>). Wenn die ZRM in Screenings verwendet werden, muss der Anwender berücksichtigen, dass die Nicht-GVO-ZRM auch bei positiven Screeningergebnissen bei der ereignisspezifischen Methode zu richtig negativen Ergebnissen führen können. Entsprechend

müssen positive Screeningergebnisse mit Sorgfalt interpretiert werden.

Bei der Herstellung von GVO-ZRM wird besondere Sorgfalt darauf verwendet, sicherzustellen, dass beide Fraktionen (GVO und Nicht-GVO) eine vergleichbare Partikelgrößenverteilung aufweisen. Dies ist insbesondere deshalb wichtig, da die Menge an extrahierbarer DNA mit der Partikelgröße korreliert. Unterschiede bei der Effizienz der DNA-Extraktion bei GVO- und Nicht-GVO-Pulver würden den mit der qPCR-Methode gemessenen GVO-Gehalt beeinflussen. Darüber hinaus sollten nur DNA-Extraktionsverfahren verwendet werden, für die die Einhaltung der an die GVO-Quantifizierung gestellten Anforderungen validiert wurde und für die der Nachweis der Wirksamkeit bei verschiedenen Sorten derselben Art erbracht ist. Im Laufe der Zertifizierung wird der GVO-Massenanteil des ZRM mithilfe einer ereignisspezifischen qPCR-Methode überprüft. Wenn Unterschiede bei der DNA-Extraktion beobachtet wurden, wird dies angegeben. Die genetische Zusammensetzung ist bei den einzelnen Teilen der Samen von einkeimblättrigen Pflanzen (zum Beispiel Endosperm, Samenschale und Embryo beim Mais) unterschiedlich, und das DNA-Verhältnis ist bei Vollkornmehl aus ganzem Korn anders als bei Weißmehl, das lediglich aus dem Endosperm hergestellt wird. Die GFS verwendet für ihre GVO-ZRM Vollkornmehl.

Alle GVO-ZRM der GFS werden gravimetrisch aus reinem GVO- und Nicht-GVO-Pflanzenmaterial hergestellt. Die ZRM werden für den für die Einhaltung der in den entsprechenden EU-Vorschriften für Lebens- und Futtermittel festgelegten Grenzwerte erforderlichen GVO-Massenanteil zertifiziert. Die meisten GVO-ZRM sind für die Verwendung als Kalibriernormale für qPCR-Messungen vorgesehen.

Das Messsystem für die Quantifizierung von GVO im Rahmen der EU-Rechtsvorschriften wird durch das offizielle, in der Zulassungsentscheidung angegebene ZRM und die vom EU-RL validierte Messmethode beschrieben, eine Korrektur ist daher nicht notwendig. Die bei Anwendung unterschiedlicher Messmethoden unverzichtbare Austauschbarkeit braucht hier ebenfalls nicht berücksichtigt zu werden.

KENNZEICHNUNG VON GVO-ZRM

Jedes GVO-ZRM hat einen individuellen Code aus Buchstaben und Ziffern. Das allgemeine Format ist ERM-BF123xy. Die Angabe „ERM“ stellt das Markenzeichen dar (die geschützte Marke für Europäische Referenzmaterialien), die Angabe „BF“ bedeutet,

dass es sich um ein für die Bestimmung des GVO-Gehalts von Pflanzen zertifiziertes Referenzmaterial handelt. Die folgenden drei Ziffern kennzeichnen das spezifische Ereignis. Das „x“ ist ein Platzhalter für einen Kleinbuchstaben von a bis g, der an den Ereigniscode angehängt wird und die Größenordnung des Massenanteils angibt (ERM-BF412a = nominal 0 g/kg, ERM-BF412b = nominal 1000 g/kg, ERM-BF412c = nominal 1 g/kg, ERM-BF412d = 10 g/kg, ERM-BF412e = nominal 100 g/kg). Das „y“ ist ein Platzhalter für einen Buchstaben von k bis z, der für die Nummer des Produktionsloses steht, wobei „k“ dem zweiten Los entspricht (beim ersten Los entfällt dieser zusätzliche Buchstabe).

In den meisten Fällen werden für jeden Satz fünf verschiedene Konzentrationsniveaus hergestellt, nämlich nominal 0 und 100 % sowie Gemische mit einem Massenanteil von 0,1 %, 1 % und 10 %. Um die Identifizierung der verschiedenen Massenanteile zu erleichtern, werden farbige Verschlusskappen verwendet: silber = nominal 0 g/kg, schwarz = nominal 1000 g/kg, gold = nominal 1 g/kg, rot = nominal 10 g/kg und braun = nominal 100 g/kg.

Jedes Produktionslos wird mit jeweils anderem Pflanzenmaterial (zum Beispiel Samen verschiedener Lose) hergestellt. Ferner kann die Verteilung der Partikelgrößen trotz aller Anstrengungen, diese konstant zu halten, zwischen den einzelnen Losen variieren. Aus diesem Grunde können die mit jedem neuen ZRM-Los hergestellten Kalibrierosen von denen älterer Lose abweichen, sodass bei erstmaliger Verwendung eines ZRM eines neuen Loses eine neue Qualitätssicherungstabelle begonnen werden sollte. Ebenso wird empfohlen, den Wechsel zu einem neuen Los für alle Anwendungen einschließlich der Kalibrierung und Qualitätssicherung gleichzeitig vorzunehmen. Aus Gründen der Rückverfolgbarkeit sollte das spezifische für die Kalibrierung verwendete ZRM stets angegeben werden.

darauf zu achten, die jeweils zertifizierten Werte zu verwenden (siehe Beispiel).

Bei einigen GVO-ZRM ist ihre Identität zertifiziert (z. B. ERM-BF421b). Solche ZRM sind als positive Kontrollproben vorgesehen, zum Beispiel bei Screeningversuchen. Mit ihnen kann das Vorhandensein (oder die Abwesenheit) eines spezifischen GVO-Ereignisses nachgewiesen werden, sie eignen sich jedoch nicht zur Quantifizierung von GVO.

Einige GVO-ZRM wurden mit einem asymmetrischen Unsicherheitsbereich zertifiziert. Wenn ein solches ZRM für die Überprüfung auf systematische Abweichungen verwendet wird (siehe ZRM-Anwendungshinweis 1), so ist das „positive Unsicherheitsintervall“ zu verwenden, wenn das durchschnittliche Messergebnis über dem zertifizierten Wert liegt, und das „negative Unsicherheitsintervall“, wenn es darunter liegt.

Einige wenige GVO-ZRM eines spezifischen Konzentrationsniveaus wurden nicht nur für den GVO-Massenanteil, sondern auch für den DNA-Kopienanteil zertifiziert (ERM-BF413e, ERM-BF415e, ERM-BF425c, ERM-BF427c). Auch entsprechende plasmidbasierte Kalibriernormale sind verfügbar (ERM-AD413, EpaRM-AD415, ERM-AD425, ERM-AD427). Für EU-Konformitätsprüfungen müssen die Messergebnisse vom Anteil der DNA-Kopien auf den Massenanteil umgerechnet werden. Hinweis: Das EU-RL GMFF stellt zu diesem Zweck etablierte Umrechnungsfaktoren bereit.



Abb. 1: Ein Satz GVO-ZRM

BESONDERE ASPEKTE DER ZERTIFIZIERUNG

Für die Mehrzahl der GVO-ZRM ist auch jeweils ein reines GVO- und ein reines Nicht-GVO-Pulver erhältlich. Das Nicht-GVO-Pulver ist dahingehend zertifiziert, dass sein GVO-Massenanteil unterhalb der Nachweisgrenze (engl.: limit of detection, LOD) der für die Charakterisierung verwendeten Methode liegt. Das reine GVO-Pulver ist dahingehend zertifiziert, dass der GVO-Massenanteil oberhalb eines gewissen Werts liegt, der auf der Anzahl der getesteten Samen und einer statistischen Bewertung basiert. Bei der Verwendung für die Kalibrierung ist im Labor

BEISPIEL FÜR DIE VERWENDUNG REINER GVO-ZRM UND IHRER UNSICHERHEITEN

Den Analysezertifikaten für ERM-BF412ak and ERM-BF412bk (<https://crm.jrc.ec.europa.eu/>) können die folgenden Angaben entnommen werden:

	Massenanteil Bt11-Mais ¹⁾	
	zertifizierter Wert (in g/kg)	Unsicherheit (in g/kg) ⁴⁾
ERM-BF412ak	< 0,12 ²⁾	-
ERM-BF412bk	> 970 ³⁾	-

1) Gentechnisch veränderter Mais mit dem eindeutigen Code SYN-BTØ11-1.

2) Das zertifizierte Referenzmaterial wurde aus konventionellen, nicht genetisch veränderten Maissamen hergestellt. Im Material wurde bei einer Untersuchung mit einer für Bt11-Mais ereignisspezifischen quantitativen Polymerase-Kettenreaktion keine Kontamination festgestellt. Die Nachweisgrenze lag bei 0,12 g/kg. Der tatsächliche Massenanteil an Bt11-Mais im Material liegt unterhalb von 0,12 g/kg. Das Konfidenzintervall beträgt 95 %. Der zertifizierte Wert ist auf das Internationale Einheitensystem (SI) rückverfolgbar.

3) Dieses zertifizierte Referenzmaterial wurde aus genetisch veränderten Bt11-Maissamen hergestellt. Der zertifizierte Wert basiert auf der genetischen Reinheit des Maispulvers im Hinblick auf Bt11-Mais. Insgesamt wurden 209 Samen individuell auf das Vorhandensein des Bt11-Mais-Ereignisses getestet, davon 207 positiv. Der tatsächliche Massenanteil an Bt11-Mais im Material liegt über 970 g/kg. Das Konfidenzintervall beträgt 95 %. Der zertifizierte Wert ist auf das Internationale Einheitensystem (SI) rückverfolgbar.

4) Die Unsicherheit ist entsprechend einem Konfidenzintervall von 95 % mit einem Sicherheitsfaktor $k = 2$ multipliziert (in Übereinstimmung mit ISO/IEC Guide 98: Messunsicherheit – Teil 3: Leitfaden zur Angabe der Unsicherheit beim Messen, ISO 2008).

Auf Grundlage der obigen Informationen kann geschlossen werden, dass das ZRM ERM-BF412ak weniger als 0,12 g Bt11/kg enthält und keine Kontamination im Pulver festgestellt wurde. Der tatsächliche Massenanteil an Bt11-Mais im Material liegt unterhalb von 0,12 g/kg. Das Konfidenzintervall beträgt 95 %. Daher sollte für weitere Berechnungen einschließlich der Erstellung von Kalibrierkurven der Wert 0 g/kg verwendet werden.

Das ZRM ERM-BF412bk enthält laut Zertifizierung mehr als 970 g/kg. Bei 207 der 209 getesteten Samen wurde das Bt11-Mais-Ereignis nachgewiesen. Der tatsächliche Massenanteil an Bt11-Mais im Material liegt über 970 g/kg. Das Konfidenzintervall beträgt 95 %. Für weitere Berechnungen bei der Erstellung einer Kalibrierkurve für diesen GVO sollte die geschätzte genetische Reinheit von 990 g/kg verwendet werden. Hinweis: Für ZRM mit reinem GVO-Pulver, in denen keine Kontaminationen gefunden wurden, sollte der Wert 1000 g/kg verwendet werden.

In allen Fällen ist die Unsicherheit das Intervall zwischen dem numerischen Wert und dem angegebenen Grenzwert, geteilt durch $\sqrt{3}$. Beispiel:

ERM-BF412ak: Der verwendete Wert ist 0,0 g/kg, die Unsicherheit beträgt $(0,12 \text{ g/kg} - 0 \text{ g/kg}) / \sqrt{3} = 0,07 \text{ g/kg}$.

ERM-BF412bk: Der verwendete Wert auf Basis der genetischen Reinheit beträgt $(207 / 209) \times 1000 = 990 \text{ g/kg}$. Das „negative Unsicherheitsintervall“ beträgt $(990-970) / \sqrt{3} = 11,5 \text{ g/kg}$. Das „positive Unsicherheitsintervall“ beträgt 10 g/kg, da der GVO-Gehalt einen Wert von 1000 g/kg nicht überschreiten kann.