

Stellungnahme des Arbeitskreises Lebensmittelchemischer Sachverständiger der Länder und des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (ALS)

Auf der Grundlage von § 8 Nr. 6 der Geschäftsordnung veröffentlicht der Arbeitskreis Lebensmittelchemischer Sachverständiger der Länder und des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (ALS) die auf der 113. Sitzung vom 08. - 10. April 2019 in Hamburg beschlossene fachliche Stellungnahme:

Stellungnahme Nr. 2019/08:

Untersuchung auf gentechnisch veränderte Lebensmittel

Vorbemerkung:

Die Verordnungen (EG) Nr. 1829/2003 und Nr. 1830/2003 regeln die Anforderungen an die Zulassung und Kennzeichnung von gentechnisch veränderten Lebensmitteln EU-weit einheitlich. Die Untersuchung auf Bestandteile aus gentechnisch veränderten Organismen (GVO) dient einerseits zur Überprüfung der Einhaltung der Kennzeichnungsregelungen, andererseits zum Nachweis nicht zugelassener GMO.

Grundsätzlich ergeben sich aus den rechtlichen Vorgaben folgende Anforderungen:

- a. Die Überprüfung des Schwellenwerts für die Kennzeichnung zufälliger oder technisch nicht vermeidbarer Anteile zugelassener gentechnisch veränderter Organismen von 0,9 % erfordert eine quantitative Analytik.
- b. Der genannte Schwellenwert bezieht sich bei zusammengesetzten Lebensmitteln auf die jeweilige Zutat. Für möglichst aussagekräftige Resultate sollte daher soweit möglich eine Beprobung der einzelnen Zutaten, entnommen am Ort der Herstellung, erfolgen.

Bei der Untersuchung von Lebensmitteln auf gentechnisch veränderte Bestandteile haben sich molekularbiologische Methoden auf Basis der Polymerasekettenreaktion (PCR, insbesondere quantitative real-time PCR) als besonders geeignet erwiesen.

Die allgemeinen analytischen Qualitätssicherungsmaßnahmen sind in der GMO-Analytik selbstverständlich und werden hier nicht näher ausgeführt. Weiterhin wird hinsichtlich allgemeiner Anforderungen an die Durchführung molekularbiologischer und insbesondere der PCR-Analytik (Organisation, Geräte, Reagenzien etc.) auf die einschlägige Literatur sowie geltende Normen verwiesen [DIN EN ISO 24276].

Die vorliegende Stellungnahme hebt daher nur die wichtigsten zu beachtenden Punkte hervor und verweist auf weiterführende Literatur sowie über das Internet öffentlich zugängliche Informationsquellen.

1. Auswahl der Probenmaterialien

Das Probenmaterial sollte für einen sensitiven Nachweis, möglichst auch von GMO-Anteilen unter dem Kennzeichnungsschwellenwert von 0,9 %, geeignet sein. Hierfür sollten möglichst Probenmatrices verwendet werden, die einen möglichst hohen Gehalt der nachzuweisenden DNA in guter Qualität aufweisen, wie es insbesondere bei gering verarbeiteten Rohstoffen pflanzlicher Herkunft der Fall ist (s. auch POSITIONSPAPIER LEBENSMITTELCHEMISCHE GESELLSCHAFT, 2005).

2. Probenahme

Bei der Beprobung von wenig verarbeiteten Rohstoffen pflanzlicher Herkunft ist davon auszugehen, dass geringe Anteile von gv-Bestandteilen nicht immer gleichmäßig in der beprobten Charge verteilt sind.

Die Empfehlung des ALS zur Probenahme für die GVO-Analytik [PROBENAHMESCHEMA ZUGELASSENE GVO] berücksichtigt die derzeit vorliegenden Standards und Empfehlungen für eine repräsentative Beprobung und fasst diese in einem praktikabel gehaltenen Probenahmeschema zusammen. Insbesondere basiert dieses Probenahmeschema auf der EMPFEHLUNG DER KOMMISSION 2004/787/EG sowie einer europäisch abgestimmten Technischen Spezifikation [DIN CEN/TS 15568].

Die o. g. Probenahmeverfahren erfassen GVO-Anteile bei homogener Verteilung bis 0,1 % i. d. R. mit einer hinreichenden Sicherheit. Liegen besondere Verdachtsmomente vor, z. B. auf Kontamination durch nicht zugelassene GVO im sehr geringen Spurenbereich ($\leq 0,1$ %), ist ggf. die Größe der Laborprobe (= Menge an Probenmaterial, die ins Labor geschickt wird) unter Berücksichtigung der Handhabbarkeit im Labor zu erhöhen, siehe auch DURCHFÜHRUNGSBESCHLUSS DER KOMMISSION 2011/884/EU. Auch dazu wurde vom ALS eine Empfehlung zur Probenahme für die GVO-Analytik erstellt [PROBENAHMESCHEMA NICHT ZUGELASSENE GVO].

3. Probenvorbereitung

Bei der Untersuchung auf zugelassene GVO ist die Laborprobe soweit zu homogenisieren, dass die entnommene Analysenprobe die gesamte Laborprobe bezüglich ihres GVO-Anteils repräsentiert.

Bei der Untersuchung auf nicht zugelassene GVO sollten Laborproben, die aus einzelnen Körnern, Bohnen oder sonstigen Samen bestehen, nach gründlichem Mischen in getrennten Portionen (Analysenproben) vermahlen und analysiert werden, wie dies z. B. die ENTSCHEIDUNG DER KOMMISSION NR. 2006/754/EG empfiehlt. Dabei sollte eine Analysenprobe nur so groß sein, dass *ein* gentechnisch verändertes Samenkorn noch sicher nachgewiesen werden kann. So empfiehlt z. B. die o. g. Kommissions-Entscheidung für die Untersuchung auf nicht zugelassenen gentechnisch veränderten Reis LLRice601 eine Laborprobengröße von 2,5 kg, von der 4 einzelne Analysenproben à 240 g getrennt vermahlen und analysiert werden. Falls bei Proben, die durch Vermahlen homogenisiert werden, ein ausreichender Vermahlungsgrad nicht erreicht werden kann, ist ggf. die Probeneinwaage für die Extraktion entsprechend zu erhöhen.

Hinweise zur Probenvorbereitung finden sich insbesondere in DIN EN ISO 21571.

4. DNA-Extraktion

Verfahren zur Extraktion von DNA aus Lebensmitteln sind in DIN EN ISO 21571 beschrieben, so etwa die CTAB- bzw. Wizard-Methode, welche für viele Lebensmittelmatrixen geeignet sind. Die jeweilige Eignung eines DNA-Extraktionsverfahrens kann am besten über die Bestimmung der Menge an amplifizierbarer DNA (z. B. einer Spezies-spezifischen DNA-Sequenz) mittels real-time PCR erfolgen (s. auch LEITFADEN EXTRAKTION).

Auf das Vorhandensein mitextrahierter Inhibitoren kann über Verdünnungsreihen oder Spikekontrollen mittels real-time PCR geprüft werden.

Untersuchungsbefunde sollten auf mindestens zwei unabhängigen DNA-Extraktionen einer Analyseprobe beruhen.

5. Qualitative und quantitative Analytik

Nachweis und Quantifizierung von GVO können mittels real-time PCR oder auch digitaler PCR erfolgen.

Bei der Quantifizierung des Anteils gentechnisch veränderter Bestandteile in der Proben-DNA wird jeweils die Menge einer Transgen-spezifischen Sequenz sowie die Menge einer Spezies-(Zieltaxon-)spezifischen Sequenz bestimmt und diese zueinander ins Verhältnis gesetzt. Als Standard für die Kalibrierung werden bei real-time PCR entweder genomische DNA oder DNA-Fragmente (z. B. Plasmide, Hybrid-Amplicons) verwendet.

Strategien der Analytik und Spezifität der Nachweismethoden

Es wird eine Untersuchungsstrategie angewandt, die aus einer Reihenfolge von PCR-Nachweisen mit zunehmender Spezifität besteht, die letztlich die eindeutige Identifizierung und ggf. Quantifizierung einer gentechnischen Veränderung und somit eines GVOs erlaubt [DIN CEN/TS 16707]. Die Untersuchungsstrategie gliedert sich daher in folgende Abschnitte:

a) Screening

Screening-Verfahren bieten sich für einen orientierenden Nachweis an. Die Auswahl der Screening-Methoden richtet sich nach der jeweiligen Spezies.

b) Spezifizierung

Positive Screening-Befunde sind durch Identifizierung des GVO zu spezifizieren.

Die Spezifität des Nachweises nimmt in absteigender Reihenfolge von Event- (= Integration-sort-spezifischen) über Konstrukt-spezifischen zu Element-(Gen-)spezifischen Nachweisen ab (s. auch DIN EN ISO 24276).

Für die eindeutige Spezifizierung und Quantifizierung sollten möglichst Event-spezifische Verfahren eingesetzt werden. Validierte Verfahren sind über die Internetseite des Europäischen Referenzlabors für gentechnisch veränderte Lebens- und Futtermittel (EU-RL GMFF METHOD DATABASE) zugänglich.

Je nach Spezies können hierzu auch Konstrukt-spezifische Verfahren, ggf. auch in Kombination mit weiteren Element-spezifischen Nachweisen für eine Charakterisierung und Quantifizierung ausreichen. Im Ringversuch validierte Verfahren sind in der EURL-GMFF Method Database, der AMTLICHEN SAMMLUNG VON UNTERSUCHUNGSVERFAHREN sowie der Methodensammlung der Bund/Länderarbeitsgemeinschaft Gentechnik (LAG) <http://www.lag-gentechnik.de/> beschrieben.

6. Kontrollen und Standards

a) Generell sind die **Kontrollen** gemäß DIN EN ISO 24276 mitzuführen. Insbesondere ist zu beachten:

- positive PCR-Kontrolle (DNA mit der nachzuweisenden Sequenz)

1) *qualitative Analytik*

Die Kontrolle sollte eine möglichst geringe Konzentration der nachzuweisenden Sequenz enthalten (im Bereich der Nachweisgrenze; z. B. 10 Kopien/Ansatz).

2) *quantitative Analytik*

Als Positivkontrolle dient die Standardreihe aus genomischer oder Plasmid-DNA, ggf. auch Hybrid-Amplicons. Zusätzlich wird das Mitführen einer Qualitätskontrollprobe mit bekanntem GVO-Gehalt empfohlen (ggf. in der kompletten Analyse einschließlich Extraktion mitführen).

- **Amplifikationskontrolle**
Zur Überprüfung, ob aus der Probe amplifizierbare DNA extrahiert werden kann, wird in einer weiteren PCR eine Spezies-spezifische Sequenz nachgewiesen. Bei unbekanntem und/oder stark verarbeiteten Proben-Matrices sollte eine Abschätzung der Menge dieser Sequenz mittels real-time PCR erfolgen. Die Abschätzung der Menge an amplifizierbarer DNA ist insbesondere auch beim Spuren-Nachweis nicht zugelassener GVO zur Bewertung der Proben-bezogenen Sensitivität zu empfehlen (s. auch Punkt 8).
- **Inhibitionskontrolle**
Die Proben-DNA sollte in unterschiedlichen (mindestens 2) verschiedenen Konzentrationen auf mögliche Inhibitionen überprüft werden. Alternativ oder zusätzlich kann die Proben-DNA mit DNA der nachzuweisenden Sequenz oder einer internen Positiv-Kontrolle „gespikt“ werden.

b) **Standards** für die Quantifizierung

Die zur Kalibrierung verwendeten DNA-Standardlösungen sollten entweder aus zertifiziertem Referenzmaterial mit bekanntem GVO-Gehalt gewonnen werden oder darauf zurückgeführt werden können.

Eine Liste der verfügbaren Materialien ist in der EUGINIUS Datenbank verfügbar [EUGINIUS].

Sofern derartiges Material nicht verfügbar ist, können andere, gut charakterisierte Quantifizierungsstandards verwendet werden, z. B. Material mit bekanntem Gehalt aus Ringversuchen oder Laborvergleichsuntersuchungen (z. B. Proficiency Tests des EURL-GMFF, GeMMA oder USDA-GIPSA).

7. **Auswertung und Beurteilung der Messergebnisse**

Die erhaltenen Ergebnisse einschließlich der Kontrollen müssen eindeutig sein und die Kontrollen zu den erwarteten Ergebnissen führen, sonst ist die Untersuchung zu wiederholen (DIN EN ISO 21569; DIN EN ISO 21570; DIN EN ISO 24276).

Nachweis unbekannter bzw. nicht zugelassener GVO

Im Falle positiver Screening-Ergebnisse beim Nachweis von genetischen Elementen, die auch natürlicherweise vorkommen können (z. B. des CaMV 35S oder FMV-Promotors oder der *nos* Terminatorsequenz) sind natürliche Kontaminationen (z. B. durch *CaMV*, *FMV* bzw. *Agrobacterium tumefaciens* (*Rhizobium radiobacter*)) zu berücksichtigen. Können solche Kontaminationen ausgeschlossen werden (z. B. durch Prüfung auf weitere DNA-Sequenzen dieser Organismen) und können die Screening-Ergebnisse mangels Sequenzinformationen und Referenzmaterial nicht genau spezifiziert werden, sollten diese vor der Befund-Mitteilung so weit wie möglich durch zusätzliche Untersuchungen auf weitere bekannte Screening-Sequenzen (z. B. *epsps*-, *pat*-, *bar*-Gen) ergänzt werden, s. z. B. EUGINIUS DATENBANK.

Im Untersuchungsbericht ist darauf hinzuweisen, dass der eigentliche GVO-Nachweis nicht erbracht wurde.

Auf die Empfehlungen der Lebensmittelchemischen Gesellschaft (POSITIONSPAPIER LEBENSMITTELCHEMISCHE GESELLSCHAFT, 2005) wird hingewiesen.

Quantifizierung von GVO

Die üblichen Anforderungen an die quantitative Analytik (Mehrfachmessungen, Ermittlung der Messunsicherheit) sind zu beachten.

Bei negativen Befunden ist zumindest für DNA-arme oder unbekannte Matrices die *praktische Nachweisgrenze* zu ermitteln. Sie kann über das Verhältnis der theoretisch erreichbaren Nachweisgrenze des Transgen-Nachweises (z. B. 5 - 10 Kopien pro Ansatz) zur Probenbezogenen Menge an amplifizierbarer Spezies-DNA ermittelt werden (POSITIONSPAPIER LEBENSMITTELCHEMISCHE GESELLSCHAFT, 2005). Die Abschätzung der praktischen Nachweisgrenze ist auch beim Nachweis nicht zugelassener GVO im Spurenbereich zu empfehlen.

Bei reproduzierbaren Spurenbefunden transgener Sequenzen kann die Ermittlung der *praktischen Bestimmungsgrenze* über das Verhältnis der theoretisch erreichbaren Bestimmungsgrenze des Transgen-Nachweises (z. B. 50 Kopien pro Ansatz) zur Probenbezogenen Menge an amplifizierbarer Spezies-DNA erfolgen (POSITIONSPAPIER LEBENSMITTELCHEMISCHE GESELLSCHAFT, 2005; DIN EN ISO 24276).

8. Prüfbericht

Die allgemeinen Anforderungen der Norm DIN EN ISO 24276 sind zu beachten. Es wird insbesondere auf folgende Punkte hingewiesen:

Im Prüfbericht werden die jeweilige Prüfmethode (z. B. real-time PCR) sowie die nachgewiesenen transgenen DNA-Sequenzen angegeben, bei amtlichen Methoden bzw. internationalen Normen genügt ein Hinweis auf diese Verfahren.

Qualitative oder quantitative Untersuchungen mittels real-time PCR bzw. digitaler PCR:

a) Positive Befunde oberhalb der Bestimmungsgrenze:

Das Messergebnis wird bei quantifizierbaren positiven Befunden in der Regel in Verbindung mit der Messunsicherheit angegeben. Die Angabe der Messunsicherheit ist zu spezifizieren [z. B. Standardabweichung oder Vertrauensbereich (p= 95 %)].

b) Positive Befunde unterhalb der Bestimmungsgrenze (im Spurenbereich):

Im Falle reproduzierbarer Spurenbefunde wird zusätzlich die praktische Bestimmungsgrenze angegeben. Bei der gezielten Überprüfung auf nicht zugelassene GVO sollte angegeben werden, mit welchem Material die Abschätzung erfolgte.

c) Negative Befunde:

Im Falle negativer Befunde wird zusätzlich die jeweils probenbezogene abgeschätzte praktische Nachweisgrenze angegeben. Alternativ kann die Nachweisgrenze der Transgen-spezifischen Nachweismethode (z. B. in Kopien) in Verbindung mit der ungefähren Menge an extrahierter, amplifizierbarer Spezies-DNA angegeben werden.

Liegt die praktische Nachweisgrenze über dem Schwellenwert von 0,9 %, ist ein Hinweis erforderlich, dass in der Probe eine analytische Überprüfung, ob das Produkt kennzeichnungspflichtig ist, nicht möglich ist.

Bei der gezielten Überprüfung auf nicht zugelassene GVO sollte angegeben werden, mit welchem Material die Abschätzung der Sensitivität erfolgte.

Literatur:

Positionspapier Lebensmittelchemische Gesellschaft, 2005. AG Biochemische und Molekularbiologische Analytik. https://www.gdch.de/fileadmin/downloads/Netzwerk_und_Strukturen/Fachgruppen/Lebensmittelchemiker/Arbeitsgruppen/analytik/analytik_gvo.pdf

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren
Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (Hrsg.): Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, § 38 TabakErzG sowie § 28 a GenTG, Beuth-Verlag. <https://www.methodensammlung-bvl.de/de>

Empfehlung der Kommission 2004/787/EG vom 04.10.2004 für eine technische Anleitung für Probenahme und Nachweis von gentechnisch veränderten Organismen und von aus gentechnisch veränderten Organismen hergestelltem Material als Produkte oder in Produkten im Kontext der Verordnung (EG) Nr. 1830/2003. Amtsblatt der Europäischen Union L 348/18 vom 24.11.2004.

Durchführungsbeschluss der Kommission 2011/884/EU vom 22.12.2011 über Sofortmaßnahmen hinsichtlich nicht zugelassenem genetisch verändertem Reis in Reiserzeugnissen mit Ursprung in China und zur Aufhebung der Entscheidung 2008/289/EG. Amtsblatt der Europäischen Union L 343/140 vom 23.12.2011.

DIN EN ISO 21569
Lebensmittel - Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten - Qualitative auf Nukleinsäuren basierende Verfahren (in der zuletzt erschienenen Ausgabe)

DIN EN ISO 21570
Lebensmittel - Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten - Quantitative auf Nukleinsäuren basierende Verfahren (in der zuletzt erschienenen Ausgabe)

DIN EN ISO 21571
Lebensmittel - Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten - Nukleinsäureextraktion (in der zuletzt erschienenen Ausgabe)

DIN EN ISO 24276
Lebensmittel - Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten - Allgemeine Anforderungen und Definitionen (in der zuletzt erschienenen Ausgabe)

Leitfaden Extraktion. Leitfaden zur Einzellabor- und Ringversuchsvalidierung von Verfahren sowie der Qualitätskontrolle von extrahierter DNA.

Veröffentlicht im Journal of Consumer Protection and Food Safety
J Consum Prot Food Saf (2019). <https://doi.org/10.1007/s00003-019-01252-2>
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00003-019-01252-2>

https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/09_Untersuchungen/AG_GVO_DNA_Extraktion_Validierung.pdf?__blob=publicationFile&v=2

DIN CEN/TS 16707; DIN SPEC 10707

Lebensmittel - Verfahren zum Nachweis von gentechnisch veränderten Organismen und ihren Produkten - Strategien für das Screening mit Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (in der zuletzt erschienenen Ausgabe)

Euginius Datenbank. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit / RIKILT. The European GMO reference database. <http://www.euginius.eu>

EU-RL GMFF Method database: EU Database of Reference Methods for GMO Analysis.
<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/>

Liste Referenzmaterialien GVO-Analytik

Euginius Datenbank http://www.euginius.eu/euginius/pages/material_searchview.jsf

DIN CEN/TS 15568

Lebensmittel - Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten – Probenahmestrategien (in zuletzt erschienenen Ausgabe)

ALS-Stellungnahme Nr. 2019/06

Probenahmeschema zugelassene GVO

https://www.bvl.bund.de/DE/01_Lebensmittel/01_Aufgaben/02_AmtlicheLebensmittelueberwachung/12_ALS/lm_ALS_node.html

ALS-Stellungnahme Nr. 2019/07

Probenahmeschema nicht zugelassene GVO

https://www.bvl.bund.de/DE/01_Lebensmittel/01_Aufgaben/02_AmtlicheLebensmittelueberwachung/12_ALS/lm_ALS_node.html

Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über genetisch veränderte Lebensmittel und Futtermittel (ABl. EU Nr. L 268, S. 1).

Verordnung (EG) Nr. 1830/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über die Rückverfolgbarkeit und Kennzeichnung von genetisch veränderten Organismen und über die Rückverfolgbarkeit von aus genetisch veränderten Organismen hergestellten Lebensmitteln und Futtermitteln sowie zur Änderung der Richtlinie 2001/18/EG (ABl. EU Nr. L 268, S. 24).

Diese Stellungnahme (Nr. 2019/08) ersetzt die Stellungnahme Nr. 2007/43.