

Positionspapier, erarbeitetet von der Arbeitsgruppe biochemische und molekularbiologische Analytik zum Thema:

Aktuelle Fragen in der GVO-Analytik

Nachweis- und Bestimmungsgrenzen quantitativer PCR-Verfahren

Die Quantifizierung des Anteils gentechnisch veränderter (gv) Bestandteile in Lebensmitteln erfolgt heute fast ausschließlich mithilfe der Real-time-Polymerasekettenreaktion (Real-time-PCR). Dabei wird der Anteil des gentechnisch veränderten Materials relativ zur Zutat bestimmt. Es werden getrennt zwei PCR-Ansätze durchgeführt: (a) die Vervielfältigung und Quantifizierung einer für die zu untersuchende Spezies spezifischen DNA-Sequenz und (b) die Bestimmung der in derselben DNA-Lösung vorhandenen Menge an gv-Bestandteilen. Die gemessenen DNA-Kopien der getrennten PCR-Ansätze werden im Anschluss ins prozentuale Verhältnis gesetzt. Entsprechend empfiehlt die EU-Kommission zur Quantifizierung von GVO (gentechnisch veränderte Organismen) in Lebensmitteln, das „prozentuale Verhältnis der Anzahl der gv-DNA-Kopien zur Anzahl Zieltaxon- (= Arten-) spezifischer DNA-Kopien, bezogen auf haploide Genome“ heranzuziehen [1]. Die Quantifizierung des Anteils von gv-Bestandteilen in Lebensmitteln setzt sich somit immer aus zwei Verfahren zusammen, deren Ergebnisse zueinander ins Verhältnis gesetzt werden.

Zur Ermittlung der Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen der einzelnen Real-time-PCR-Systeme können die Präzisionsdaten aus Wiederholbestimmungen verwendet werden [2, 3]. Kenndaten wie die Wiederholbarkeitsstandardabweichung (RSD_r) oder der Vertrauensbereich können auch „in-house“ ermittelt werden [2–4]. Im Rahmen aktueller Projekte der Methodenstandardisierung, etwa bei dem Codex Alimentarius [5], bei CEN [6] oder dem ENGL [7] werden Kriterien für die Präzision für diese Real-time-PCR-basierende Methoden beschrieben. So wird empfohlen, dass die Wiederholstandardabweichung RSD_r – innerhalb eines Labors – über den gesamten Arbeitsbereich der Methode unter 25% liegen sollte [5, 7]. Weiterhin wird die Quantifizierungsgrenze nach Empfehlungen des Codex-Papiers als die niedrigste Analytkonzentration definiert, für welche die Reproduzierbarkeits-Standardabweichung RSD_r 50% oder weniger beträgt; im Arbeitsbereich sollte sie 35% in der Regel

Tab. 1: Empfehlungen derzeitiger Standardisierungsvorhaben zur Leistungsfähigkeit (Präzision) von Real-time PCR-Verfahren in der GVO-Analytik

Fundstelle	Wiederhol-Standardabweichung RSD_r	Reproduzierbarkeits-Standardabweichung RSD_R
Codex Alimentarius [5]	< 25% über gesamtem Arbeitsbereich	≤ 50% im Bereich der Quantifizierungsgrenze; möglichst < 35% im Arbeitsbereich
CEN [6]	-	≤ 33% im Bereich der Nachweisgrenze; ≤ 25% im Bereich der Quantifizierungsgrenze und im übrigen Arbeitsbereich
ENGL [7]	< 25% über gesamtem Arbeitsbereich	≤ 35% im Bereich des gesetzlichen Schwellenwertes (0,9%) und über den gesamten dynamischen Bereich ≤ 50% für Konzentrationen unter 0,2%

Tab. 2: Relative Nachweisgrenzen bei wichtigen Lebensmittelrohstoffen, Erfahrungswerte [9]

Zutat/Rohstoff	Zu erwartende Ausbeute an Spezies-spezifischer DNA (pro PCR-Ansatz)	Ungefähre relative Nachweisgrenzen (Anteil GVP-DNA an Gesamt-Spezies-DNA)
Sojalecithin	0 – ca. 10.000 Kopien	100% – 0,05%
Mais-Stärke, nativ	0 – ca. 7000 Kopien	100% – 0,1%
Mais-Stärke, modifiziert	0 – 500 Kopien	100% – 1%
Glucosesirup, Maltodextrine	< 20 Kopien	> 25%

unterschreiten. Die CEN-Normenentwürfe sehen dagegen für die Nachweisgrenze quantitativer Real-time PCR-Verfahren eine RSD_r von 33% oder weniger, für die Quantifizierungsgrenze eine RSD_r von 25% oder weniger vor (s. Tabelle 1).

Diese Kriterien gelten für Methoden, die im Ringversuch erprobt werden. Zumeist handelt es sich bisher um Methoden, die eine relative Quantifizierung und damit die Messunsicherheit zweier Quantifizierungsmethoden in einer Untersuchung beinhalten. Ergebnisse aus solchen Ringstudien zeigen bisher, dass eine Quantifizierungsgrenze RSD_r von 25% oder weniger ein sehr ehrgeiziges Ziel darstellen und bisher nicht erreicht werden konnte, zumindest nicht über einen GV-Konzentrationsbereich von 0,1–5% [7].

Relative Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen können, wie oben beschrieben, anhand von Präzisionsdaten aus Ringversuchen mit „DNA-armen“ Matrizes und definierten GVO-Anteilen ermittelt werden. Die Menge an amplifizierbarer Spezies-DNA unterliegt bei bestimmten Zutatengruppen erfahrungsgemäß starken Schwankungen, sodass die Durchführung entsprechender Validierungsstudien weder praktikabel noch zielführend sein dürfte.

In-house können dagegen – ausgehend von dem Gehalt an Spezies-DNA – probenspezifisch Nachweis-, und Quantifizierungsgrenzen abgeschätzt werden [2, 4] (= praktische Nachweis-/Bestimmungsgrenze). In Tabelle 2 ist die Bandbreite solcher relativer Nachweisgrenzen, basierend auf Erfahrungswerten [9], dargestellt.

Dazu wird zunächst in der extrahierten Proben-DNA die Menge an artenspezifischer und mittels Real-time-PCR amplifizierbarer DNA ermittelt. Die Menge an gv-DNA, welche in dieser Lösung noch nachweisbar bzw. quantifizierbar ist, wird dazu ins Verhältnis gesetzt. Bestimmt werden kann diese DNA-Menge im Rahmen der Methodenvalidierung der jeweiligen PCR-Systeme über die Präzisionsdaten aus Wiederholbestimmungen. Für die Quantifizierungsgrenze kann ebenfalls das Kriterium einer Wiederholbarkeitsstandardabweichung von 25% und darunter angesetzt werden. Ein anderer Ansatz verwendet als Kriterium für die Quantifizierungsgrenze eine maximale Streuung des Vertrauensbereichs von ± 30%, für die Nachweisgrenze von ± 100% [2]. Langjährige Erfahrungswerte zeigen, dass bei effizienten Real-time-PCR-Systemen diese Kriterien bei 5 bis 10 Kopien bzw. Genomäquivalenten (Nachweisgrenze) bzw. 40 bis 100 Kopien (Bestimmungsgrenze) erreicht werden [9].

Davon ausgehend werden bei verarbeiteten Lebensmitteln und „DNA-armen“ Zutaten oft nur praktische Nachweis-/Bestimmungsgrenzen von 0,9% oder darüber erreicht. In solchen Erzeugnissen ist eine analytische Überprüfung im Hinblick auf den Grenzwert von 0,9% somit nicht möglich und es muss auf die entsprechenden Rohstoffe zurückgegriffen werden. Sollten diese Erzeugnisse dennoch untersucht werden, so ist im Ergebnisbericht auf diesen Umstand hinzuweisen.

Die neuen Kennzeichnungsregelungen für gv-Lebens- und Futtermittel (VO (EG) 1829/2003 und 1830/2003) erfassen nunmehr, unabhängig von der Nachweisbarkeit von DNA oder Protein im Endprodukt aufgrund der genetischen Veränderung, alle aus GVO bestehenden oder aus GVO hergestellten Lebensmittelzutaten und Zusatzstoffe wie raffiniertes Soja- und Rapsöl, Glucosesirup, Maltodextrin, Lecithin oder modifizierte Stärken. Bisher genügte für die Befreiung von der Kennzeichnungspflicht ein negatives Resultat bei der Untersuchung auf gv-Bestandteile (z.B. „nicht nachweisbar mittels PCR“). So können raffinierte Sojaöle aus 100% gentechnisch veränderter Soja hergestellt worden sein und dennoch mittels molekularbiologischen, PCR-basierenden Nachweismethoden ein negatives Resultat liefern. Eine grundsätzliche „Gen-Kennzeichnung“ ist nach neuer Rechtslage dennoch vorgeschrieben, um eine potenzielle Irreführung des Verbrauchers hinsichtlich des Herstellungs- oder Gewinnungsverfahrens zu vermeiden.

Nicht zugelassene GVO und analytische Nulltoleranz

Für gv-Pflanzen, die weder zugelassen noch sicherheitsbewertet sind, gilt nach den derzeitigen Regelungen die Nulltoleranz.

Der Nachweis nicht zugelassener gentechnisch veränderter Pflanzen ist auch nach Inkrafttreten der neuen EU-Verordnungen weiterhin sehr schwierig bzw. unmöglich, da weder Referenzmaterialien noch Event-spezifische DNA-Sequenzen zur Verfügung stehen. Für eine Reihe solcher nicht zugelassenen GVO liegen Methoden vor, die in der Regel Sequenzen aus dem genetischen Konstrukt nachweisen können. Informationen zur Erarbeitung von Nachweismethoden können insbesondere aus entsprechenden Datenbanken [10, 11] abgeleitet werden. Mit derartigen Methoden und anhand von Positivkontrollen, die über diverse Quellen (z.B. weltweite Laborvergleichsuntersuchungen) beschafft wurden, können Methoden erarbeitet werden, die zumindest eine qualitative Aussage erlauben. Eine exakte Quantifizierung sowie eine abschließende Identifizierung des Transformations-Events wird dagegen nicht möglich sein, da Referenzmaterial fehlt.

Angesichts der großen Tragweite positiver Befunde mit Verdacht auf nicht zugelassene GVO sollte höchstmögliche Sorgfalt in die Absicherung solcher Befunde gelegt werden. Derartige Ergebnisse sollten laborübergreifend reproduzierbar sein. Einen großen Einfluss hat hier Art und Weise der Beprobung, sie sollte repräsentativ sein und sich an aktuellen Empfehlungen orientieren [1].

Hinsichtlich der Reproduzierbarkeit des Nachweises selbst sollten Kriterien für die Präzision beachtet werden:

Stehen lediglich qualitative (Endpunkt-PCR-) Verfahren zur Verfügung, ist eine ausreichende Zahl von Wiederholungen (mindestens 4–5) der Untersuchung mit jeweils positivem Resultat erforderlich. Zu empfehlen ist sowohl bei qualitativen als auch bei quantitativen Untersuchungen eine Absicherung der Befunde durch ein weiteres Labor.

Sind quantitative (Real-time-PCR-) Methoden vorhanden, können weitergehende Abschätzungen der Methodenpräzision erfolgen. Neben einer ausreichenden Zahl von Wiederholungen mit jeweils positivem Resultat (siehe Endpunkt-PCR) sollten Präzisionskriterien für die Nachweisgrenze, besser noch für die Erfassung- oder Bestimmungsgrenze erfüllt sein.

Hierfür stehen bislang lediglich Konzepte aus der Rückstandsanalytik zur Verfügung, welche nicht vollständig dem „digitalen“ Phänomen der PCR Rechnung tragen („ja/nein-Aussage“). Besitzt eine Probe genau den Gehalt der Nachweisgrenze des Analyten, so wird nach dem Konzept der DIN 32645 in 50% der Fälle der konkrete Messwert kleiner als die Nachweisgrenze sein (sogenannter Beta-Fehler = 50%). Auch deshalb wird in der DIN 32645 die sogenannte Erfassungsgrenze beschrieben. Im Bereich der Erfassungsgrenze ist der Beta-Fehler so klein wie der Alpha-Fehler, welcher in der Regel 1 oder 5% beträgt. Ein Alpha-Fehler von 5% bedeutet, dass mit einer vorgegebenen Sicherheit (Signifikanz) von z.B. 95% davon ausgegangen werden kann, dass der Analyt vorhanden ist. Die Erfassungsgrenze entspricht dem 2-fachen der Nachweisgrenze.

Teile des Konzeptes zu Nachweis- und Erfassungsgrenze nach DIN 32645 können für PCR-basierende Verfahren und die vorliegende Problemstellung (analytische Nulltoleranz – i.d.R. sind keine im Ringversuch ermittelten Daten verfügbar) hilfreich sein: Werden nun beispielsweise die Vertrauensbereiche aus Wiederholbestimmungen mittels Real-time-PCR bestimmt (z.B. in Prozent transgener DNA im Verhältnis zur Spezies-DNA), so kann ermittelt werden, ob das Kriterium für die Nachweisgrenze, nämlich eine maximale Streuung des Vertrauensbereichs (VB) von $\pm 100\%$ [2] erfüllt ist. Nach den bisherigen Erfahrungen sollte dieses Kriterium im Falle eines positiven Befundes bei nicht zugelassenen gv-Pflanzen mindestens erfüllt sein. Eine höhere Sicherheit des Nachweises ist allerdings dann gegeben, wenn Präzisionskriterien für die Erfassungsgrenze (Streuung VB \leq ca. $\pm 50\%$) oder die Quantifi-

zierungsgrenze (Streuung VB ca. $\leq \pm 30\%$ oder RSD $\leq 25\%$) erfüllt sind.

Generell, d.h. bei jeder quantitativen Bestimmung von gv-Bestandteilen, ist die Angabe der aus der Analyse ermittelten Ergebnisunsicherheit (bzw. des Vertrauensbereichs) im Untersuchungsbericht zu empfehlen.

Botanische Verunreinigungen

Bestandteile von gentechnisch veränderten Pflanzen können auch als botanische Verunreinigungen oder Fremdbesatz in Lebensmitteln gelangen. Entsprechend wurden beispielsweise in Maismehlen Verunreinigungen durch Soja, in Speisesenf Verunreinigungen durch Raps festgestellt, die ihrerseits Anteile an gentechnisch veränderter Soja bzw. Raps aufwiesen. Im Lebensmittelrecht sind keine expliziten Höchstwerte für Verunreinigungen beispielsweise von Ölsaaten durch Saaten anderer Pflanzenarten festgelegt jedoch wird bei Ölsaaten eine botanische Verunreinigung von maximal 0,5% toleriert. Aus dem Futtermittelbereich ist die Anforderung einer 95% Reinheit gemäß § 4 Abs. 1 Futtermittelverordnung bekannt; Die Verordnung (EG) 1829/2003 beschränkt den Geltungsbereich der Kennzeichnungsvorschriften auf Lebensmittel und Lebensmittelzutaten und verweist hinsichtlich des Zutatensbegriffs in Art. 2 Nr. 13 auf Art. 6 Abs. 4 der Richtlinie 2000/13/EG. Botanische Verunreinigungen oder Fremdbesatz gelten danach nicht als Zutat; vom Zutatensbegriff werden unbeabsichtigte oder technisch unvermeidbare Einträge nicht erfasst.

Liegen Anhaltspunkte auf „artfremde“ gv-Bestandteile vor, ist daher zunächst zu ermitteln, ob überhaupt eine nicht deklarierte Zutat oder eine technisch unvermeidbare Verunreinigung vorliegt. Mit den derzeit verfügbaren PCR-Verfahren ist die hierfür erforderliche quantitative Bestimmung der jeweiligen Pflanzenart derzeit allerdings nicht möglich. So kann über die Bestimmung amplifizierbarer Raps-DNA, bezogen auf die Gesamt-DNA anhand geeigneter Vergleiche (möglichst gleicher Probenmatrix) zwar eine Abschätzung dieses Anteils erfolgen, nicht aber eine Quantifizierung. Eine abschließende Beurteilung, ob eine deklarationspflichtige Zutat bzw. ein technisch unvermeidbarer Fremdbesatz vorliegt, muss daher mit weiteren Methoden erfolgen. Erst danach wird die mittels Real-time-PCR lösbare Fragestellung des Anteils gentechnisch veränderter DNA, bezogen auf die Spezies-DNA des Fremdbesatz-Anteils, relevant.

Literatur

1. 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. 1831/2003. Amtsblatt der Europäischen Union L 348/18 vom 24.11.2004.
2. Waiblinger HU, Gutmann M, Hädrich J, Pietsch K (2001) Deutsche Lebensmittel-Rundschau 97: 121–125.
 3. Hübner P, Waiblinger HU, Pietsch K, Brodmann P (2001) J. AOAC Int. 84: 1855.
 4. Holst-Jensen A, Ronning S, Lovseth A, Berdal K (2003) Anal. Bioanal. Chem. 375: 985.
 5. Codex Alimentarius Commission, Codex Committee on methods of Analysis and Sampling (2005) Consideration of the methods for the detection and identification of foods derived from biotechnology. CX/MAS 05/26/9 (01/2005).
 6. DIN/CEN TC 275 (2003) prEN 24276.
 7. Community Reference Laboratory (CRL): Validation reports (Status of dossiers; detection methods submitted under article 47 of regulation EC 1829/2003. <http://gmo-crl.jrc.it/statusof-doss.htm>. Update 31.03.2005
 8. Europäisches Netzwerk für GVO Laboratorien (ENGL) (2005) Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing, Version 25.01.2005. <http://gmo-crl.jrc.it/guidancedocs.htm>.
 9. Ergebnisse aus Routineuntersuchungen des CVUA Freiburg, der Fa. Nestlé Deutschland sowie der Fa. Eurofins | GeneScan Analytics, Freiburg
 10. Datenbank Agbios: <http://www.agbios.com>.
 11. GMO-Watch Report: Genetically Modified Crops: molecular and regulatory facts www.gmo-watch.org