

Die ISTA-Akkreditierung für GVO-Untersuchungen im Rahmen des „Performance Based Approach“ Aus dem Blickwinkel der Labore

B. SPECK, G. SCHUON, N. LEIST und A. JONITZ

Einleitung

Die ISTA (International Seed Testing Association) wurde im Jahr 1924 mit dem Ziel gegründet, Standardmethoden zu Probenahme und der Untersuchung von Saatgut zu entwickeln, zu validieren und in den ISTA-Vorschriften [1] zu veröffentlichen. Neben der Laborakkreditierung, der Durchführung regelmäßiger, problemorientierter Proficiency Tests und dem Angebot umfangreicher Weiterbildungsmaßnahmen leisteten diese Aktivitäten einen immensen Beitrag zur internationalen Vergleichbarkeit von Analyseergebnissen.

Vor elf Jahren begann der Anbau und Handel mit gentechnisch veränderten Organismen (GVO), ohne dass zeitgleich geeignete Methoden für die Einhaltung von Vorgaben etabliert waren. Daher startete die ISTA gemeinsam mit der International Seed Federation (ISF) und der OECD im Jahr 1998 eine Initiative, um Methoden für den Nachweis von GVO-Verunreinigungen in konventionellen Saatgutpartien zu etablieren.

Reaktion der ISTA

Die hierfür gegründete International Seed Network Initiative (I.S.N.I.) stieß aufgrund der international stark unterschiedlichen Auffassung von Schwellenwerten bald an ihre Grenzen.

Daher beschloss die ISTA bereits im Jahr 2000 unabhängig von Grenzwerten eigenständig entsprechend ihrer Satzung Methodenentwicklungen voranzutreiben, mit dem Ziel diese später in die „Internationalen Vorschriften zur Prüfung von Saatgut“ aufzunehmen [2].

Bald war die Polymerase-Chain Reaktion (PCR) die Methode der Wahl. So genial und sensitiv diese innovative Technologie auch ist, so überaus sensibel ist sie auch in der Anwendung. Dies bedeutet, dass die Methoden eng an bestimmte Gerätetypen, aber auch an Reagenzien gebunden sind. So ist es gut möglich, dass eine extern vorzüglich validierte Methode mit der verfügbaren Ausrüstung weniger geeignet ist als eine validierte „Haus-Methode“.

Zugleich waren bei dem raschen wissenschaftlichen Fortschritt auf dem Gebiet der Dann-Untersuchung in kurzer Zeitfolge neue Methoden zu erwarten. So verabschiedete der Vorstand der ISTA Jahr 2001 ein Strategiepapier bezüglich „Methoden zur Erkennung, Identifizierung und Quantifizierung von gentechnisch veränderten Samen in konventionellem Saatgut.“ Unter anderem sind in diesem Strategiepapier folgende Aufgabengebiete skizziert:

1. Festlegung der Methodenanforderungen bezüglich Genauigkeit und Wiederholbarkeit und die entsprechende Aufnahme in Kapitel der ISTA-Vorschriften zur Erkennung, Identifizierung und Quantifizierung von GVO in konventionellem Saatgut.
2. Die Organisation verbindlicher und regelmäßiger Proficiency Tests durch die GMO Task Force.
3. Optimierung des Informationsaustausches durch eine ISTA-Webseite [3].

Damit weicht die ISTA in diesem besonderen Gebiet von ihrer bewährten Strategie „Einheitlichkeit der Methoden“ ab und benutzt den leistungsbezogenen Ansatz (performance based approach), in dem die Labore jede Methode benutzen können, aber in eigenen Validierungen und umfangreichen Ringtests nachweisen müssen, dass sie eine bestimmte Analysegenauigkeit erreichen.

Der Performance based Approach (PBA)

Der Performance based Approach (PBA) wurde 2005 in die International Rules for Seed Testing aufgenommen (Kapitel 8, [1]) und trat im Februar 2006 in Kraft. Somit haben die Labore die Möglichkeit, die Methoden und Geräte zum Nachweis von GVO-Beimengungen in konventionellem Saatgut anzuwenden, die bei ihnen installiert sind.

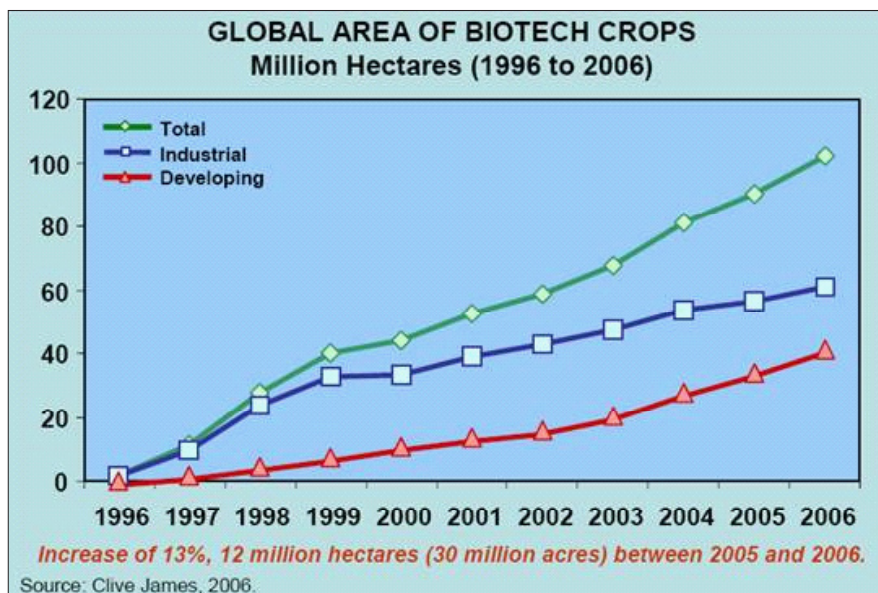


Abbildung 1: GVO-Anbauflächen seit 1996 (Quelle: Clive James; ISAAA Brief 35-2006)

Autoren: Dipl. Biol. Brigitte SPECK, Norbert LEIST und Andrea JONITZ, LTZ, Augustenberg, Neßlerstraße 23, D-76227 KARLSRUHE; G. SCHUON, ISTA Sekretariat, ZÜRICH

Für den Bereich der Untersuchungen auf gentechnisch veränderte Organismen hat sich die ISTA für eine neue Maßgabe entschieden (Abbildung 3).

Es stehen nicht die einheitlichen Methoden im Vordergrund, sondern einheitliche Anforderungen an die jeweilige Leistungsfähigkeit und Zuverlässigkeit. Das Ziel weltweit zu gewährleisten, dass ein Ergebnis maximal repräsentativ für die beprobte Partie bzw. Einsendeprobe ist, wird auch auf diesem Wege erreicht, da konkrete Mindestanforderungen zu Genauigkeit und Wiederholbarkeit vorgegeben werden.

Grundvoraussetzung für den PBA ist es, dass die Untersuchungen auf der Zumischung ganzer Samen beruhen, deren Reinheit zu prüfen ist. Die ISTA empfiehlt zur Überprüfung der Reinheit 400 Einzelkornuntersuchungen bei gv-Samen und 30 Untersuchungen zu je 1000 Samen bei der konventionellen Sorte.

Für die Akkreditierung des qualitativen Nachweises sind 30 Zumischungsproben mit jeweils 400 Samen notwendig, für die Akkreditierung der Quantifizierung 28 Proben mit jeweils 2000 Samen (Tabelle 1).

Für die qualitative Analyse entsprechen jeweils zehn Blindproben dem wahren Wert von 0%, 0,50% sowie 0,75%.

Für die quantitative Analyse müssen in

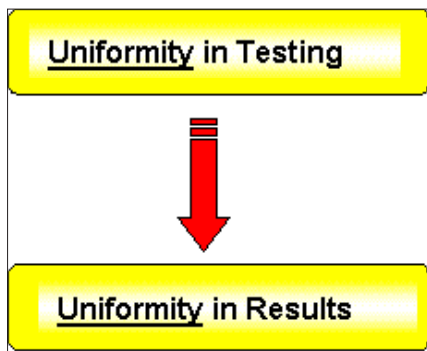


Abbildung 3: Die neue „Maßgabe“ der ISTA für biomolekulare Untersuchungen.

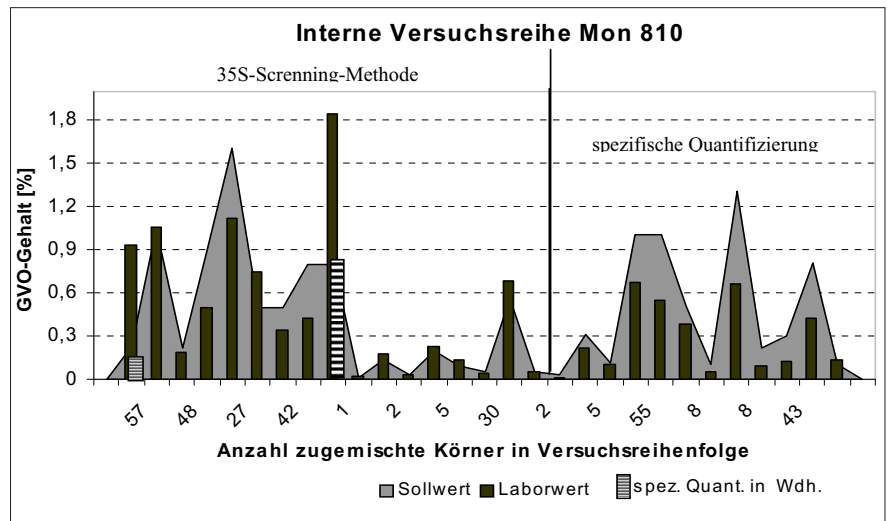


Abbildung 2: Ergebnisse aus interner Versuchsreihe; Vergleich der Quantifizierung auf Basis von 35S-Screening und der spezifischen Methode

Vierfachbestimmung die wahren Werte 0,1%, 0,5% und 1,0% abgedeckt werden. Ebenso müssen je vier unbekannte Proben in den Bereichen 0,1%-0,5%, 0,5%-1,0%, 1,0%-2,0%, 2,0%-3,0% untersucht werden (Tabelle 2).

Im Dezember 2006 erhielt das Labor des LTZ Augustenberg weltweit als zweites die Bestätigung über die Akkreditierung für die qualitative und quantitative Bestimmung von MON 810 in konventionellem Saatgut von Mais. Im Jahr 2007 konnte der Akkreditierungsumfang deutlich erweitert werden (Tabelle 3).

Dem wahren Wert der Probe auf der Spur

Dem hoheitlichen Auftrag entsprechend ist es die Aufgabe des Saatgutlabors,

den wahren Wert der Probe mit höchster Wahrscheinlichkeit zu erfassen. Die beprobte Saatgutpartie kann zum Beispiel bis zu 120 Millionen Maiskörner umfassen, von denen repräsentativ 3000 Korn für die Untersuchung gewaschen, getrocknet und vermahlen werden. In Doppelbestimmung werden 3 g des homogenisierten Mehls extrahiert. In die qualitative Analyse zum Beispiel gehen schlussendlich 200 ng DNA ein.

Die laborinterne Validierung wird mit Hilfe von Proben mit gezielten Zumischungen von GVO-Samen und, soweit auf dem Markt erhältlich, zertifizierten Standard-Mehlen durchgeführt. Zur Überprüfung der gesamten Methode wurden im Rahmen des Qualitätsma-

Tabelle 2: Anzahl Samen für die Zumischungsversuche, quantitativer Nachweis (PBA; Version 2.1)

	Seeds with specified trait(s)	Seeds without specified trait(s)
0.1% level	2 x 4 = 8	1998 x 4 = 7992
0.5% level	10 x 4 = 40	1990 x 4 = 7960
1% level	20 x 4 = 80	1980 x 4 = 7920
Blind level 1	9 x 4 = 36 max	1998 x 4 = 7992 max
Blind level 2	19 x 4 = 76 max	1990 x 4 = 7960 max
Blind level 3	39 x 4 = 156 max	1980 x 4 = 7920 max
Blind level 4	60 x 4 = 240 max	1960 x 4 = 7840 max
Total	636	55 584

Tabelle 1: Anzahl Samen für die Zumischungsversuche (PBA; Version 2.1)

	Seeds with trait(s)	Seeds without trait(s)	step	comments
Ability to check for presence/absence of specified trait(s)	50	11 950	ability to detect presence/absence of the specified trait(s)	30 samples of 400 seeds
Ability to check for quantification of presence of specified trait(s)	636	55 584	ability to quantify the specified trait(s)	28 samples of 2000 seeds
Approx. number of seeds	700	67 600		

nagements über 200 anonyme Kontrollproben mit unterschiedlichem GVO-Anteil hergestellt. Bei den Positivproben Körner der jeweiligen GVO-Sorte gezählt, gewogen und mit konventionellem Saatgut bekannter Tausendkornmasse auf ein Kilogramm Probenmenge ergänzt.

Das *Abbildung 2* zeigt deutlich, dass die spezifische Quantifizierung den wahren Wert der Probe im Rahmen der Möglichkeiten (verschiedene DNA-Anteile bei Mutterlinie oder Vaterlinie im Maiskorn) wesentlich besser erfasst als das weitaus weniger spezifische 35S-Screeningverfahren.

Zusammenfassung

Der Performance based Approach ermöglicht eine schnelle Reaktion auf Entwicklungen in der Analytik.

Da die Labore ihre Kompetenz sowie die Eignung der gewählten Methoden in den „Performance data“ und durch die erfolgreiche Teilnahme am ISTA GMO Proficiency Test Programm sowie regelmäßige Konformitäts-Audits umfangreich belegen, ist die Qualität der Untersuchungsmethoden klar belegt. Die hieraus resultierende Vergleichbarkeit von Analyseergebnissen zwischen Laboren hilft Handelsbarrieren abzubauen.

Um mit höchster Wahrscheinlichkeit analytisch den wahren Wert der Untersuchungsprobe zu erfassen müssen die Nachweissysteme möglichst spezifisch sein. Für die entsprechende Validierung sind eigene Zumischungsversuche mit ganzen Samen unumgänglich, wofür jedoch eventspezifisches Referenzmaterial unabdingbar ist. Leider sind fast ausschließlich zertifizierte Mehle, vorgegebener GVO-Konzentration im Handel. Die ISTA stellt sich auch dieser Herausforderung indem die GMO Task Force in diesem Sommer eine Arbeits-

Annex to the Accreditation Certificate - Performance Approved				
Species	Testing principle	Trait	Qual./Quant.	Reference
<i>Brassica napus</i>	PCR	GT200/GT73	Qual.	23-ME-0808
		GT73	Quantitative	23-ME0812, II
<i>Glycine max</i>		GTS 40-3-2	Qual.	23-ME-0806
		GTS 40-3-2	Quantitative	23-ME-0807, II
<i>Zea mays</i>		Bt 176	Qual.	23-ME-0803
		T 25	Qual.	23-ME-0803
		MON 810	Qual.	23-ME-0803
		MON 863	Qual.	23-ME-0803
		35S Promoter	Qual.	23-ME-0803
		NOS Terminator	Qual.	23-ME-0803
		Bt 11	Qual.	23-ME-0803
		GA 21	Qual.	23-ME-0803
		CBH 351	Qual.	23-ME-0803
		NK 603	Qual.	23-ME-0803
		MON 810	Quantitative	23-ME-0809
Bt 11	Quantitative	23-ME-0809		
Bt 176/E176	Quantitative	23-ME-0803		

Tabelle 3: ISTA-Akkreditierungsumfang: „Performance Approved Methods“

gruppe zur Beschaffung von GV-Samen gegründet hat.

Ausblick

Die Wunschliste bezüglich reiner Samen diverser Gentechnisch Veränderte Organismen verschiedener Kulturarten an die neue Arbeitsgruppe der GMO-Task-Force hat einen respektablen Umfang:

Mais

Mon810, 591225 „Herculex“1507, 1507 x 59122,1507 x NK603, 3272, 59122 „Herculex“, 59122 x 1507 x NK603, 59122 x NK603, Bt11, Bt176, GA21, GA21 x MON810, LY038, LY038 x MON810, MIR604, MON810, MON863, MON863 x MON810, MON863 x MON810 x NK603, MON863 x NK603, MON88017, MON88017 x MON810, MON89034, MON89034 x MON88017, MON89034 x NK603, NK603, NK603 x MON810, T25

Raps

GT 73 (bei AOCs erhältlich), GS40 / 90pHoe6 / Ac, Liberator pHoe6/Ac, MS1

x RF1, MS1 x RF2, MS8 x RF3, T45, TOPAS 19/2

Soja

A2704-12; 305423; 356043, MON40-3-2, MON40-3-2, MON89788, A2704-12, 305423

Der umfassende und regelmäßige Leistungsnachweis ist eine immerwährende Herausforderung für die Labore. So bleibt der Anteil der Untersuchungsproben im Rahmen der Qualitätssicherung im Bereich der GVO-Analytik auch weiterhin sehr hoch.

„Akkreditierung ist die formelle Anerkennung der Kompetenz“ [Zitat, 3].

Literatur

- [1] International Rules for Seed Testing; Edition 2007/1, The International Seed Testing Association, Bassersdorf, CH-Switzerland
- [2] LEIST, N. und M. KRUSE, 2005: Position der ISTA zum Nachweis von GVO-Beimengungen im Saatgut, Ausgewählte Vorträge aus GPZ-Arbeitsgemeinschaften, Heft 67, 228-232, Verlag Liddy Halm, Göttingen.
- [3] www.seedtest.org.
- [4] Bundesamt für Sicherheit und Informationstechnik, Akkreditierung von Prüfstellen.

