

VLOG	Empfehlungen zu GVO-Analysen gemäß VLOG-Standard	
-------------	---	--

Die folgenden Anforderungen gelten derzeit als Empfehlungen an Teilnehmer im VLOG-System und werden – ggfs. überarbeitet und / oder erweitert - in die nächste VLOG-Standardversion integriert und erlangen dann als Anforderungen verpflichtende Gültigkeit.

1. Anforderungen an Auftraggeber der Untersuchung

Der Auftraggeber der GVO-Analyse ist verpflichtet,

- bis 31.12.2018 die Akkreditierung des beauftragten Labors nach DIN EN ISO/IEC 17025 (s. 2.1) regelmäßig, mindestens 1x jährlich zu prüfen.
- zum 01.01.2019 und folgend regelmäßig, mindestens 1x jährlich die VLOG-Anerkennung des beauftragten Labors (s. 2.1) zu prüfen.

Bei der Beauftragung müssen folgende Informationen im Prüfauftrag oder mitgeltenden Dokumenten angegeben sein und an das Labor übermittelt werden:

- Beauftragung von GVO-Analysen gemäß diesem Anforderungskatalog
- Zusammensetzung der Probe:
Sind Soja-, Mais-, Raps- und / oder Reis-Einzelfutter bzw. -Zutaten enthalten, ist anzugeben, in welcher Form diese enthalten sind (z.B. Mais als Maisschlempe, Soja als Sojaextraktionsschrot). Kopien der Futtermittellieferscheine / Warenbegleitpapiere / Deklarationen sollten mit der Probe an das Labor versandt werden.

Bei Erhalt des Analyseergebnisses ist vom Auftraggeber zu prüfen, dass das Labor die Einhaltung der im Kapitel 2 genannten Anforderungen bestätigt. Dies kann für jedes Analyseergebnis im Prüfbericht oder in einer separaten Bestätigung erfolgen, die 1x jährlich vom Labor ausgestellt wird.

2. Anforderungen an Labore

Für die Zertifizierung nach VLOG-Standard können nur Analyseergebnisse anerkannt werden, die gemäß den folgenden Anforderungen ermittelt wurden.

2.1. Allgemeine Anforderungen und VLOG-Anerkennung

- Die Labore müssen nach DIN EN ISO/IEC 17025 (in der gültigen Fassung) für alle durchzuführenden qualitativen und quantitativen GVO-Untersuchungsparameter akkreditiert sein. Diese kann in Form einer flexiblen Akkreditierung für den gesamten Bereich oder jeweils für alle durchzuführenden Verfahren einzeln vorliegen.
- Die Untersuchung der Proben muss vollständig im beauftragten Labor durchgeführt werden, eine Untervergabe an andere Labore ist nicht zulässig.

Spätestens ab 01.01.2019 müssen Labore vom VLOG anerkannt sein. Die Beantragung einer VLOG-Anerkennung ist für Labore ab 01.04.2018 möglich. Die Einhaltung der in 2.1, 2.2 und 3. genannten Anforderungen ist dem VLOG bei Antragstellung schriftlich nachzuweisen¹.

Nach erfolgreicher Anerkennung ist dem VLOG die regelmäßige und erfolgreiche Teilnahme an Laborvergleichsuntersuchungen mit guten Ergebnissen für GVOs zu belegen. Das Labor muss VLOG unaufgefordert im ersten Quartal für das Vorjahr mindestens

- einen Laborvergleich bzgl. GVO für quantitative Ergebnisse mit gutem Z-Score (+/- 2) und
- einen Laborvergleich bzgl. GVO für qualitative Ergebnisse (100 % positiv bzw. negativ richtige Aussagen)

für die Matrix Futtermittel oder pflanzliche Rohwaren / pflanzliche verarbeitete Produkte unter Angabe des z-Scores nachweisen.

Darüber hinaus ist dem VLOG bei Reakkreditierung bzw. Änderung des Akkreditierungsbereichs die aktualisierte Akkreditierungsurkunde nach DIN EN ISO/IEC 17025 innerhalb von 4 Wochen vorzulegen.

VLOG behält sich vor, die Einhaltung der Anforderungen im Rahmen von eigenen Laboraudits zu überprüfen.

2.2. Methodische Anforderungen

DIN-Normen und Protokolle des Joint Research Centre (JRC; <http://gmocrl.jrc.ec.europa.eu/StatusOfDossiers.aspx>) sollten eingesetzt werden (falls vorhanden). Für Methoden aus anderen Quellen ist laborseitig zu verifizieren, dass vergleichbare Mindestanforderungen erfüllt sind.

2.2.1. Analytischer Prozess

Vermahlung:

Abhängig von der Probenmatrix sind jeweils folgende Mindestmengen an Probenmaterial komplett zu vermahlen:

- Futtermittel: mindestens 400 g, maximal bis 1 kg, komplett vermahlen
- Rohwaren (ganze Körner Mais, Sojabohnen, Raps u.ä.): mindestens 3000 Körner bzw. ca. die Probenmenge, die jeweils dieser Anzahl entspricht (Mais mind. 1000 g; Soja mind. 700 g, Raps mind. 60 g), komplett vermahlen

DNA-Extraktion:

Von jeder Probe werden nach dem Mahlen / Homogenisieren mindestens 2 DNA-Extraktionen durchgeführt. Die Einwaage sollte dabei für Futtermittel, Saaten und Material mit Verdacht auf inhomogene Verteilung mindestens 2000 mg betragen. In Ausnahmefällen (bei sonst nicht extrahierbarem Material) kann die Einwaage auch bei nur 500mg liegen.

PCR-Analyse:

Es werden Real-Time PCR-Verfahren mit Sondentechnologie (45 Zyklen) empfohlen. Bei der Verwendung von konventionellen Endpunkt- („endpoint“) - PCR-Verfahren muss bei positiven Ergebnissen eine zusätzliche Bestätigungsreaktion erfolgen (z.B. Real-Time PCR mit Sondentechnologie, Restriktionsanalyse oder Sequenzierung).

Die in Kapitel 3 enthaltenen Anforderungen zum Analysenumfang müssen eingehalten werden.

¹ Begründete Abweichungen von den Anforderungen an die Qualifikationen sind bei Antragstellung ausführlich zu begründen und bedürfen der schriftlichen Zustimmung der VLOG Geschäftsstelle.

2.2.2. Absicherung der Analytik

Alle Qualitätskontrollen nach den relevanten ISO- und DIN-Normen müssen die nach diesen Normen geforderten Resultate zeigen. Vom Labor ist sicherzustellen, dass keine inhibitorischen Effekte die Messergebnisse beeinflussen. Weichen die Messergebnisse von den Kontrollwerten so stark ab, dass die vom Labor definierten Toleranzgrenzen für Abweichungen bzw. Qualitätsvorgaben überschritten werden, muss der PCR-Lauf wiederholt werden.

Um systematische Fehler, Instabilitäten der Reagenzien etc. zu verhindern, müssen Verfahren über die regelmäßige Durchführung und Dokumentation von QS-Maßnahmen etabliert und umgesetzt werden (z.B. Kontroll- und Regelkarten).

2.2.3. Freigabe von Analyseergebnissen

Die Ergebnisse müssen nach dem 4-Augen-Prinzip durch einen Hauptverantwortlichen freigegeben werden.

2.2.4. Anforderungen an Prüfberichte

Ein Prüfbericht muss neben den in den in DIN EN ISO 24276, DIN EN ISO 21569 und DIN EN ISO 21570 geforderten Angaben mindestens folgende Angaben enthalten:

- die eingesandte und die vermahlene Probenmenge
- die in der DNA-Extraktion eingesetzte Probenmenge
- die genaue Probenbeschreibung
- die Nachweisgrenze (Methoden-LOD in % oder als Kopienzahl des Targets)
- die angewandte Methode
- das Untersuchungsergebnis
- die Messunsicherheit des Verfahrens,
- Bestätigung, dass das Ergebnis gemäß den Anforderungen des VLOG-Standards ermittelt wurde. Alternativ kann diese Bestätigung in einem separaten Schreiben erfolgen, das dem Auftraggeber 1x jährlich ausgestellt wird.
- Zusätzlich bei Identifizierungen / Quantifizierungen:
 - Warnung, wenn die Menge an speziesspezifischer DNA für quantitative Aussagen in Bezug auf den relevanten Grenzwert (0,1 % bzw. 0,9 % GVO-DNA) nicht ausreicht.
 - Bei Quantifizierungen die Angabe der mittleren Abweichung der Unterproben (mindestens zweifacher Ansatz), die Angabe der pLOQ wird empfohlen.

2.2.5. Interpretation der Messergebnisse - Kontroll- und Bewertungskriterien

Für jede Probe muss eine abschließende Beurteilung auf dem Prüfbericht enthalten sein, ob die Probe für die analysierten Parameter den Vorgaben des VLOG-Standards entspricht oder nicht.

Für die Bewertung ist die Standardabweichung zwingend zu berücksichtigen, um der inhomogenen Verteilung von GVO in Futtermitteln oder Lebensmitteln Rechnung zu tragen: In Anlehnung an EU VO Nr. 691/2013 wird zur Beurteilung der analysierte GVO-Gehalt — nach Abzug der erweiterten Messunsicherheit — herangezogen.

Für Futtermittel werden für die Bewertung Kapitel 5 und die Anhänge 1 und 2 des „Leitfadens zur Kontrolle von GVO in Futtermitteln“² berücksichtigt.

Falls eine abschließende Beurteilung der Messergebnisse nicht möglich ist, muss dies auf dem Prüfbericht angemessen dargestellt werden (Vermerk bei eingeschränkter Analysierbarkeit der Probe, Angabe der praktischen LOD, fehlenden Informationen zu Einzelfuttermitteln).

² Leitfaden zur Kontrolle von GVO in Futtermitteln (Stand November 2011). Überwachung des Herstellens, Behandelns, Verwendens und Inverkehrbringens von Futtermitteln im Zusammenhang mit gentechnisch veränderten Organismen (GVO). ... Erarbeitet von der PG GVO in Futtermitteln der LAV Arbeitsgruppe Futtermittel unter Beteiligung des Bundes und des VDLUFA, http://www.ohnegentechnik.org/Leitfaden_Futtermittel

3. Anforderungen an den Analysenumfang

Bei den in Kapitel 3.1 bis 3.6 folgenden Mindestanforderungen zum Analysenumfang ist zu beachten, dass dabei nicht alle GVOs berücksichtigt sind, die in der EU zugelassen bzw. für Futtermittel im Sinne der EU-Verordnung Nr. 619/2011 toleriert sind. Ebenso sind in der EU nicht-zugelassene GVOs nicht Bestandteil der Mindestanforderungen. Im Falle einer Überprüfung der Verkehrsfähigkeit und korrekten Kennzeichnung eines Futtermittels würden weitere GVOs berücksichtigt werden (dies umfasst weitere in der EU zugelassene GVOs, in der EU in Futtermitteln nach EU-Verordnung Nr. 619/2011 tolerierte GVOs, sowie in der EU nicht zugelassenen GVOs).

In Rücksprache mit Laboren überprüft und aktualisiert VLOG in regelmäßigen Abständen die in Kapitel 3.1 bis 3.6 folgenden Mindestanforderungen an den Analysenumfang von Rohstoffen und Futtermitteln. Falls Entwicklungen zu verzeichnen sind, dass weitere GVO relevant werden (z.B. RASFF-Meldungen), gibt der VLOG zeitnah entsprechende Analysevorgaben / -empfehlungen an seine Mitglieder und VLOG-zertifizierte Unternehmen weiter.

Damit ist die Selbstverpflichtung der im VLOG-System beteiligten Unternehmen nicht aufgehoben, im Rahmen Ihrer Sorgfaltspflicht regelmäßig den Analysenumfang zu überprüfen und ggfs. zu aktualisieren.

3.1. Mindestanforderungen für Soja-Rohwaren / Soja-basierte Einzelfuttermittel

Bestimmung und Beurteilung des Summationswertes der relevantesten Soja-GMOs:

- Quantifizierung von GTS 40-3-2 (RRS- 1)
- Quantifizierung von MON89788 (RRS-2)
- qualitativer Nachweis von A2704-12

Bei einem positiven Nachweis von A2704 kann der Gehalt dieses GVO beispielsweise mittels des $\Delta\Delta$ ct-Verfahrens oder einer vergleichbaren Methode abgeschätzt werden, die das ausreichende Vorhandensein von Spezies-DNA sicherstellt. Bei Werten über 0,1% muss eine Nachquantifizierung durchgeführt werden.

Alternativ kann auch mit Screening-Parametern gearbeitet werden, die mindestens die genannten GVOs erfassen. Bei der nachfolgenden Identifizierung / Quantifizierung positiver Befunde müssen dann auch mindestens alle hier genannten GVOs (wenn entsprechende Elemente positiv sind) quantifiziert werden.

3.2. Mindestanforderungen für Mais-Rohwaren / Mais-basierte Einzelfuttermittel

1. Screening auf 35S-Promotor (p35S) und NOS-Terminator (tNOS).

Weitere Screening-Elemente können zum Eingrenzen der GVO eingesetzt werden.

2. Wenn positiv: Analyse auf mindestens NK603, TC1507, MON810, MON89034 + RRS-1

Falls über die positiven Screening-Parameter eine / mehrere dieser GV-Maissorten ausgeschlossen werden können, muss stattdessen nach einer gleichen Anzahl an kommerzialisierten, stattdessen in Frage kommenden GV-Maissorten gesucht werden.

Positive Screening-Befunden müssen aufgeklärt werden; wenn keine der 4 GV-Maissorten positiv ist, müssen andere GV-Sorten analysiert werden.

3. Bestimmung des Summationswertes der Mais-GVO

Identifizierte Sorten müssen quantifiziert werden, wenn die Abschätzung des Gehaltes beispielsweise mittels des $\Delta\Delta$ ct-Verfahrens oder einer vergleichbaren Methode, die das ausreichende Vorhandensein von Spezies-DNA sicherstellt, Werte über 0,1% ergibt.

RRS-1 positiv:

Abschätzung der Sojamasse und Beurteilung der ermittelten Sojamenge: Handelt es sich um relevante Einträge oder minimale Spuren? Wird eine botanische, GVO-haltige Verunreinigung festgestellt, muss eine Beurteilung gemäß offiziellem Leitfaden² erfolgen.

3.3. Mindestanforderungen für Raps-Rohwaren / Raps-basierte Einzelfuttermittel

1. **3er Screening**, bei dem alle relevanten GVO-Rapssorten erfasst werden (z.B. tNOS, pat-Gen (oder LibertyLink-Konstrukt), CTP2-CP4epsps (oder pFMV)
2. **ID je nach positivem Screening-Befund**
 - tNOS positiv: mindestens RRS + bar-Gen wegen MS8 / RF3 oder diese beide direkt
 - pat-Gen / LibertyLink positiv: mindestens T45-Raps
 - CTP2-CP4epsps / pFMV positiv: mindestens GT73
3. **Bestimmung des Summationswertes der Raps-GVO**

Quantifizierung der identifizierten GV-Rapssorten, wenn die Abschätzung des Gehaltes beispielsweise mittels des $\Delta\Delta$ ct-Verfahrens oder einer vergleichbaren Methode, die das ausreichende Vorhandensein von Spezies-DNA sicherstellt, Werte über 0,1% ergibt.

Positive Screening-Befunde müssen aufgeklärt werden.

Wenn kein Raps-GVO ermittelt wird, muss das Vorhandensein einer botanischen, GVO-haltigen Verunreinigung mit Soja-GVO / Mais-GVO geklärt werden (Abschätzung und Beurteilung der Massen). Handelt es sich dabei um relevante Einträge oder minimale Spuren? Wird eine botanische, GVO-haltige Verunreinigung festgestellt, muss eine Beurteilung gemäß offiziellem Leitfaden² erfolgen.

3.4. Mindestanforderungen für sojahaltige Mischfuttermittel

Bestimmung und Beurteilung des Summationswertes der relevantesten GVOs:

Soja:

- Quantifizierung von GTS 40-3-2 (RRS- 1)
- Quantifizierung von MON89788 (RRS-2)
- qualitativer Nachweis von A2704-12

Bei einem positiven Nachweis von A2704 kann der Gehalt dieses GVO beispielsweise mittels des $\Delta\Delta$ ct-Verfahrens oder einer vergleichbaren Methode abgeschätzt werden, die das ausreichende Vorhandensein von Spezies-DNA sicherstellt. Bei Werten über 0,1% muss eine Nachquantifizierung durchgeführt werden.

Bei eingeschränkter Analysierbarkeit der Zutat Soja muss die praktische LOD angegeben werden.

Bei Zutat Mais:

Zusätzlich qualitativer Nachweis der 3 kommerzialisierten Maissorten: NK603, TC1507, MON810

Bei einem positiven Nachweis kann der Gehalt dieses GVO beispielsweise mittels des $\Delta\Delta$ ct-Verfahrens oder einer vergleichbaren Methode abgeschätzt werden, die das ausreichende Vorhandensein von Spezies-DNA sicherstellt. Bei Werten über 0,1% muss eine Nachquantifizierung des / der nachgewiesenen GVOs durchgeführt werden.

Bei eingeschränkter Analysierbarkeit der Zutat Mais muss die praktische LOD angegeben werden.

Bei Zutat Raps:

Zusätzlich qualitativer Nachweis von GT73

Bei positiver Identifizierung muss eine Quantifizierung von GT73 erfolgen, wenn die Abschätzung des Gehaltes beispielsweise mittels des $\Delta\Delta\text{ct}$ -Verfahrens oder einer vergleichbaren Methode, die das ausreichende Vorhandensein von Spezies-DNA sicherstellt, Werte über 0,1% ergibt.

Bei eingeschränkter Analysierbarkeit der Zutat Raps muss die praktische LOD angegeben werden.

Alternativ kann auch mit Screening-Parametern gearbeitet werden, die mindestens die genannten GVOs (Soja, Raps und Mais) erfassen. Bei der nachfolgenden Identifizierung / Quantifizierung positiver Befunde müssen dann auch mindestens alle hier genannten GVOs (wenn entsprechende Elemente positiv sind) identifiziert und ggfs. quantifiziert werden.

3.5. Mindestanforderungen für sojafreie Mischfuttermittel

Bestimmung und Beurteilung des Summationswertes der relevantesten GVOs:**Abschätzung der Sojamasse:**

In einem ersten Schritt wird die Sojamasse im Futtermittel abgeschätzt. Bei Werten über 0,9% muss der Anteil an GV-Soja ermittelt werden (siehe Mindestanforderungen für sojahaltige Futtermittel) und eine Beurteilung gemäß offiziellem Leitfaden² erfolgen.

Bei Zutat Raps:

Qualitativer Nachweis von GT73-Raps + MS8-Raps oder RF3-Raps (oder bar-Gen)

Bei positiver Identifizierung muss eine Quantifizierung des / der gefundenen GVO erfolgen, wenn die Abschätzung des Gehaltes beispielsweise mittels des $\Delta\Delta\text{ct}$ -Verfahrens oder einer vergleichbaren Methode, die das ausreichende Vorhandensein von Spezies-DNA sicherstellt, Werte über 0,1% ergibt.

Bei eingeschränkter Analysierbarkeit der Zutat Mais muss die praktische LOD angegeben werden.

Bei Zutat Mais:

qualitativer Nachweis der 3 kommerziell genutzten Maissorten: NK603, TC1507, MON810

Bei positiver Identifizierung muss eine Quantifizierung des / der gefundenen GVO erfolgen, wenn die Abschätzung des Gehaltes beispielsweise mittels des $\Delta\Delta\text{ct}$ -Verfahrens oder einer vergleichbaren Methode, die das ausreichende Vorhandensein von Spezies-DNA sicherstellt, Werte über 0,1% ergibt.

Bei eingeschränkter Analysierbarkeit der Zutat Mais muss die praktischen LOD angegeben werden.

Alternativ kann auch mit Screening-Parametern gearbeitet werden, die mindestens die genannten GVOs (Raps, und Mais betreffend) erfassen. Bei der nachfolgenden Identifizierung / Quantifizierung positiver Befunde müssen dann auch mindestens alle hier genannten GVOs (wenn entsprechende Elemente positiv sind) identifiziert und ggfs. quantifiziert werden.

3.6. Mindestanforderungen an Reis und Reisprodukte

Für die GVO-Analytik von Reis und Reisprodukten hat VLOG bereits ein Dokument veröffentlicht, das auch Anforderungen an den Analysenumfang enthält³.

3.7. Sonstige Produkte / Rohwaren

Die Strategien zur GVO-Analytik anderer Einzelfuttermittel, Rohwaren, (Lebensmittel-)Zutaten, Zwischenprodukte oder Lebensmittel sind unter Berücksichtigung Ihrer Zusammensetzung und Herkunft weiterhin mit dem beauftragten Labor zu vereinbaren.

³ „Vorgaben für die „Ohne Gentechnik“-Zertifizierung von Reis- und Reisprodukten“ (Stand 16.09.2016) von Verband Lebensmittel ohne Gentechnik e.V. (VLOG), http://www.ohnegentechnik.org/fileadmin/ohne-gentechnik/fuer_unternehmen/Zertifizierungsvorgaben_Reis_Reisprodukte_final_160916.pdf