



2. Stellungnahme zu den Verordnungen (EU) Nr. 56/2013 zur Verhütung, Kontrolle und Tilgung bestimmter transmissibler spongiformer Enzephalopathien (TSE) und Nr. 51/2013 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 152/2009 im Hinblick auf die Analysemethoden zur Bestimmung der Bestandteile tierischen Ursprungs bei den amtlichen Futtermittelkontrollen.

Zusammenfassung

Die vorliegende Stellungnahme des Arbeitskreises PCR-Analytik im VDLUFA beschreibt die mit der Anwendung der überarbeiteten SOP des EURL-AP (Vers. 3.0/2015) weiterhin bestehenden Probleme. Diese betreffen vor allem die

- fehlende Offenlegung des Algorithmus der „Cut-off“-Bestimmung und fehlende Beschreibung der DNA-Zielsequenz,
- fehlende Angabe der Messunsicherheit / diesbezüglich nicht abgeschlossene Validierung des Verfahrens,
- hohe Gefahr von Mikrokontaminationen und damit von „Falsch-Positiven“,
- fehlendes Vorhandensein von zertifiziertem Referenzmaterial,
- Schwierigkeiten bei der Bewertung von Proben mit einem Ct-Wert in der Nähe des „Cut-off“.

Es werden Empfehlungen zur einheitlichen Vorgehensweise insbesondere bei der Bewertung der Ergebnisse gegeben und gezielte Problemstellungen zur Beachtung bzw. Umsetzung an die AFU herangetragen.



Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten

Mit der Verordnung (EU) Nr. 51/2013 vom 16. Januar 2013 wurde der Anhang VI der Verordnung (EG) Nr. 152/2009 im Hinblick auf die Analysemethoden zur Bestimmung der Bestandteile tierischen Ursprungs bei den amtlichen Futtermittelkontrollen geändert. Als mitgeltende Unterlagen wurden hierzu vom EURL-AP im April 2013, aktualisiert im Juni 2014 bzw. Mai 2015 bindende Standardarbeitsanweisungen (SOPs) sowohl zur DNA-Extraktion als auch zum PCR-Nachweis in englischer Sprache publiziert (EURL-AP SOP operational schemes V3.0 (2015); EURL-AP SOP DNA extraction V1.1 (2014); EURL-AP SOP Ruminant PCR V1.1 (2014); EURL-AP File for cut-off determination exact copy number + copies cut-off V1.1 (2014)). Das NRL-TP hat in 2014/15 eine Übersetzung der SOPs ins Deutsche vorgenommen.

Inzwischen ist die Etablierung der o.g. Nachweismethode in den amtlichen Kontrolllaboren erfolgt. Im Dezember 2014 führte das NRL-TP am BfR zur Überprüfung des Leistungsstands der Labore einen Implementierungstest durch. Damit liegen erste Erfahrungen aus der Untersuchung von Futtermittelproben auf Ruminanten mittels PCR vor. Die Probenzahlen für die amtliche Kontrolle diesbezüglich sind bundesweit derzeit noch sehr gering, auch weil bislang ausschließlich Aquakulturfutter zu untersuchen war, weil die EURL-AP SOP explizit nur für diese speziellen Futtermittel ausgerichtet ist. Futtermittel für Landtiere sind von dieser SOP ausgeschlossen. Unabhängig von der Probenanzahl bestehen bei der Anwendung der EURL-Methode verschiedene Probleme, die entweder basierend auf der individuellen Laborsituation noch nicht gelöst wurden oder die sich in den bisherigen Ringversuchen und Laborvergleichsuntersuchungen (LVU) manifestiert haben. Diese werden im Folgenden benannt:

Die Bewertung von Proben, deren Ct-Werte in der Nähe des Cut-offs (Ausschlusswert, welcher bestimmt, ob eine Probe positiv oder negativ zu bewerten ist) liegen, ist problematisch. In der letztjährigen Laborvergleichsuntersuchung (LVU) des EURL für Animal Protein in Feedingstuff (EURL-AP, Gembloux), zeigte sich dies beispielhaft an einer realistischen Marktprobe, welche nach eigenen Voruntersuchungen des EURL eine unbekannte, **geringe** Kontamination an Ruminanten-DNA enthielt¹. Die Richtigkeit der Analyse in dieser LVU erreichte für diese Probe jedoch nur 46,2 %. Von annähernd der Hälfte der 26 ausgewerteten europäischen NRL wurde diese Probe als ‚falsch‘ negativ analysiert. Dabei war auffällig, dass bei ca. 35 % der 60 Einzelanalysen für die kritische Probe „Fischmehl II“ der Ct-Messwert lediglich +/- 1 Ct-Wert um den individuell bestimmten Cut-off der Labore lag. Insgesamt 50 % der Ergebnisse für die schwierige Probe lagen in einem engen Bereich zwischen -1,4 und +1,5 Ct-Werten um den Cut-off. Im Extremfall entschieden in zwei Laboren sogar Ct-Wert-Differenzen von lediglich -0,05 oder +0,1 Ct vom Cut-off über eine Wertung ‚positiv‘ oder ‚negativ‘ (Damit schien die Kontamination deutlich unter 0,1 % w/w Wiederkäuerprotein zu liegen. Hierzu ist anzumerken, dass in den vergangenen LVU, in denen wie im Implementationstest des EURL-AP die niedrigste Dotierung bei 0,1 % w/w verarbeitetes Wiederkäuerprotein lag, die Labore der MS exzellente Ergebnisse erzielten. Im Proficiency Test (LVU) 2013 lag der Anteil der falsch negativen Resultate bei dieser

¹ Fumière, O., Marien, A. and G. Berben, EURL-AP Proficiency Test 2015, Final version, October 2015, online-Publication: <http://eurl.craw.eu/img/page/proficiency/EURL-AP%20PCR%20ILS%202015%20final%20version.pdf>

Konzentrationsstufe im gesamten europäischen NRL-Netzwerk bei lediglich 0,7 %, entsprechend 1/123 Analysen.²). Das größte Problem bei der Methode mit schwach kontaminierten Proben (< 0,1 %) ist unseres Erachtens die mangelnde Fehlerbetrachtung um den Cut-off-Wert. Zwar soll der Cut-off-Wert mittels eines statistisch-mathematischen Verfahrens über eine Verdünnungsreihe mit Plasmiden bekannter Kopienzahl bestimmt worden sein (bis heute ist die Berechnung des Cut-off-Wertes weder offengelegt noch publiziert worden), jedoch resultiert aus dem Verfahren ein fester, unveränderlicher Wert, welcher in beliebigen Nachfolgeanalysen, unabhängig von der Hintergrundfluoreszenz der unbekanntenen Proben oder anderer Einflüsse, in jedem Lauf gültig und bindend ist. Lauf-zu-Lauf-Variationen der ermittelten Ct-Werte, wie sie in jeder PCR vorkommen, werden so nicht berücksichtigt. Es erfolgt bislang keine Ermittlung der Messunsicherheit. So zeigen die Ergebnisse der LVU 2015 des EURL-AP, dass es bei Proben an der Nachweisgrenze des PCR-Systems durch eine fehlende Messunsicherheit zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen kann. Die OIE (World Organization for Animal Health), welche die internationalen Standards auf dem Feld der Tierseuchendiagnostik festlegt, stellt in einer Leitlinie zur Messunsicherheit³ fest, dass auch für rein qualitative Methoden eine Messunsicherheit anzugeben ist, sofern ein numerischer Cut-off-Wert über ein positives oder negatives Ergebnis entscheidet. Dies ist auch gemäß ISO/IEC 17025-2005 zu fordern. In dieser Hinsicht ist das EURL-AP PCR-Verfahren als nicht abschließend validiert einzustufen, da das Kapitel Messunsicherheit noch immer in Bearbeitung ist und der Validierungsreport sich diesbezüglich im Entwurfsstadium befindet (s. Section 10.3; Validation study of a real-time PCR method developed by TNO Triskelion bv for the detection of ruminant DNA in feedingstuffs, Draft, <http://eurl.craw.eu/en/176/scientific-reports>). Zertifiziertes Referenzmaterial, über das die Ergebnisse abgesichert werden könnten, ist nicht verfügbar.

Die hohe Sensitivität der Methode forciert zudem das Problem, dass auch Mikrokontaminationen aufgezeigt werden. Wurde jemals in einem Labor mit Ruminanten-DNA gearbeitet, (d. h. mit Proben jeglicher Art, die Wiederkäuer-DNA enthalten haben), muss ein sehr hoher Aufwand betrieben werden, um diese zu reduzieren. In den bisher durchgeführten LVU des EURL-AP für die NRL der MS waren Proben, welche verarbeitetes Protein nur aus Schwein enthielten, durch gehäufte falsch positive Ergebnisse charakterisiert. Soweit dem NRL-TP bekannt ist, handelt es sich bei der Zielsequenz um einen multicopy-Locus, der in den nicht kodierenden Bereichen des Genoms vorkommt. Es ist zwar ein sehr guter phylogenetischer Marker, liegt aber in ca. 200.000facher Kopie pro Genom je Zelle (!) vor. Das erklärt die hohe Kontaminationsanfälligkeit der Methode.

Aber auch die Probenahme im Rahmen der Futtermittelkontrolle ist ein massiver Unsicherheitsfaktor (Kreuzkontamination während Probenahme/-transport). Es wird daher empfohlen, die Probennehmer speziell zu schulen und für diese Problematik zu sensibilisieren. Aus den vorgetragenen Erfahrungen ergibt sich als dringendstes Problem für die amtliche Futtermittel-

² EURL-AP Proficiency Test 2013; Report: <http://www.eurl.craw.eu/img/page/proficiency/EURL-AP%20PCR%20ILS%202013%20final%20version.pdf>

³ http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/GUIDELINE_3.6.4_MEASUREMENT_UNCERT.pdf

Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten

überwachung, wie mit der zu erwartenden hohen Rate an positiven Analyseergebnissen umgegangen wird/werden soll. Nach jetzigem Kenntnisstand gibt es dafür keine befriedigende Lösung.

Der Arbeitskreis PCR-Analytik der Fachgruppe Futtermittel im VDLUFA einigt sich deshalb auf folgendes Vorgehen:

Die endgültige Bewertung, ob in einer fraglichen Probe Ruminanten-DNA im Sinne des Überwachungsauftrags nachgewiesen wurde, oder ob es sich um zufällige und unvermeidbare Mikrokontaminationen handelt, ist eine Einzelfallentscheidung, die von den jeweiligen zuständigen Behörden getroffen werden muss. Folgende Erkenntnisse aus den verschiedenen Bundesländern können als Entscheidungshilfe für eine Harmonisierung der Probenbeurteilung dienen:

- Das freundlicherweise vom BfR (ZAGON) im Rahmen der Implementationsstudie zur Verfügung gestellte 0,1 % PAP-„Konventions“-Material wird in Ermangelung von zertifiziertem Referenzmaterial als „Qualitätskontrollprobe“ bei der Analyse mitgeführt.
- Als Entscheidungshilfe sollten zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse der Threshold und die Basislinie beim Ruminantennachweis immer gleich sein. Hilfreich ist in diesem Zusammenhang die Mitführung eines Kalibranten (möglichst des kleinsten mit 40 Kopien) in Triplikaten, um eine Verschlechterung des Systems sofort bemerken zu können. Dieser Standard kann auch als Inhibitionskontrolle eingesetzt werden.
- Ist der gemessene **Ct-Wert** einer Probe **deutlich kleiner** als der Ct-Wert des Cut-offs und des 0,1 % PAP-„Konventions“-Materials, gilt Ruminanten-DNA in der Probe als **nachgewiesen**.
- Ist der gemessene **Ct-Wert** einer Probe **deutlich größer** als der Ct-Wert des Cut-offs und des 0,1 % PAP-„Konventions“-Materials, gilt Ruminanten-DNA in der Probe als **nicht nachgewiesen**.
- Ist der gemessene Ct-Wert der Probe **kleiner als der Ct-Wert des Cut-offs**, aber **größer als der Ct-Wert des 0,1 % PAP-„Konventions“-Materials**, gilt die Ruminanten-DNA nach der SOP des EURL als **nachgewiesen**. Bei solchen Befunden sollte in der Befundmitteilung darauf hingewiesen werden, dass eine mögliche Mikrokontamination, z. B. durch andere Futtermittelbestandteile oder Verschleppungen in der Produktion, aufgrund der hohen Sensitivität der Methode nicht ausgeschlossen werden kann. Da kein geeignetes zertifiziertes Referenzmaterial zur Verfügung steht, kann die Nachweisgrenze der Methode nicht ermittelt werden.

Es sollte den zuständigen Behörden deutlich kommuniziert werden, dass es für das Problem der Mikrokontamination nach jetzigem Kenntnisstand keine Lösung gibt. Es wird als Aufgabe des EURL-AP gesehen, hier eine praktikable Lösung zu finden.

Eigene „Problemproben“, insbesondere in Hinblick auf Inhibierung, sollten vom Labor an ein anderes Labor zur Untersuchung weitergeleitet werden. Die so ermittelten Daten sollten

zusammengefasst und über die oberen Landesbehörden an den Bund geleitet werden. Es wird gewünscht, dass dadurch das EURL auch von politischer Seite dazu angehalten wird, sich mit den methodischen Problemen auseinanderzusetzen.

In diesem Zusammenhang bittet der AK PCR-Analytik die AFU um offizielle Klärung, ob analog zur GVO-Analytik oder Mikrobiologie (z. B. Salmonellen-Untersuchung) eine gesonderte Probenahme für Futtermittel, die auf Ruminanten-DNA mittels PCR untersucht werden sollen, etabliert werden muss.

Für eine zuverlässige Bewertung zweifelhafter Ergebnisse wäre aus unserer Sicht die Angabe einer Messunsicherheit zwingend erforderlich.

Der Algorithmus der Cut-off-Bestimmung, die die Methode nutzt, um über das Vorhandensein von Ruminanten-DNA zu entscheiden, ist seitens des EURL-TP bisher nicht offengelegt und deshalb von den Laboren selbst nicht nachvollziehbar. Zudem fehlen eine Beschreibung der entsprechenden DNA-Zielsequenz, die für den Nachweis ausgewählt wurde, sowie eine Angabe zu deren Auswahlkriterien und zum detaillierten Nachweis der Tierartenspezifität, um eine in silicio-Nachprüfung zu ermöglichen.

Gemäß des Ablaufschemas (Abbildung 2, EURL-AP SOP „Operational protocols for the combination of light microscopy and PCR, V3.0) soll für die Untersuchung von Futtermitteln für Aquakulturen, die bezüglich PAP und Blutmehlen deklariert sind, zuerst die PCR-Analysemethode eingesetzt werden. Wenn diese Futtermittel zum Beispiel aber auch aus Milch gewonnene Erzeugnisse als zugelassenen Bestandteil oder diesen als Verschleppung enthalten, kann mit der PCR bezüglich zusätzlicher nicht erlaubter Ruminantenanteile keine eindeutige Aussage getroffen werden. Ein PCR-Ergebnis wäre nicht gerichtsfest. Hier ist die Lichtmikroskopie auf jeden Fall anzuschließen. Dies ist so nicht in der o. g. SOP „Operational protocols...“ (Abb. 2) vorgesehen. Zudem verlangt eine aktuelle Gesetzgebung (VERORDNUNG (EU) 2016/27 DER KOMMISSION vom 13. Januar 2016) die Analyse von verarbeitetem, tierischem Protein aus Nichtwiederkäuern, welches für den Export bestimmt ist, auf die Präsenz von Ruminanten-Material. Die SOP muss also entsprechend angepasst werden. Ein erhöhtes Probenaufkommen ist zukünftig nicht auszuschließen.

Mit freundlichem Gruß

i.A. Brigitte Speck
(Vorsitzende)