

set



Stiftung zur Förderung
der Erforschung von
Ersatz- und
Ergänzungsmethoden
zur Einschränkung von
Tierversuchen

Stiftung zur Förderung der Erforschung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zur Einschränkung von Tierversuchen

Mainzer Landstraße 55, 60329 Frankfurt am Main
www.stiftung-set.de

Projektbeispiel

Entwicklung eines Real-Time-Reverse-Transcriptase-PCR-Verfahrens zum Nachweis von *Clostridium-botulinum*-TypA-, B-, E- und F-Neurotoxin-Produktion in Lebensmitteln als Alternative zum Mäuse-Bioassay

Prof. Dr. M. Bülte, Prof. Dr. Dr. habil. H. Eisgruber
Justus-Liebig-Universität Gießen

Dezember 2007 - November 2010

Entwicklung eines Reverse-Transkriptase-Real-Time-PCR-Verfahrens zum Nachweis von *Clostridium botulinum* Typ A-, B-, E- und F-Neurotoxin-Produktion in Lebensmitteln als Alternative zum Mäuse-Bioassay

Ziel dieses Forschungsprojektes ist die Entwicklung einer Ersatzmethode für den bislang als „Goldenen Standard“ geltenden Mäuse-Bioassay („Mäusetest“) zum Nachweis von *Clostridium-botulinum*-Toxin in Lebensmitteln bzw. klinischem Probenmaterial.

Die Untersuchung einer verdächtigen Lebensmittelprobe bedarf gemäß der DIN-Norm 10102/§ 64 LFGB, L 06.00-26 einer Anzahl von mindestens 54 Versuchsmäusen, wenn strikt methodenkonform verfahren wird. Zusätzliche Untersuchungen von klinischem Probenmaterial (z. B. Mageninhalt, Stuhl und Blutserum), die bei einer Botulismuserkrankung des Menschen anfallen, lassen die Anzahl an Versuchstieren entsprechend steigen. Deshalb soll als Alternativmethode ein Reverse-Transkriptase-Real-Time-PCR-Verfahren (RT Real Time-PCR) zum Nachweis von *C. botulinum* Typ A-, B-, E- und F-Neurotoxinen in Lebensmitteln entwickelt werden, mit dem die Toxinproduktion vermehrungsfähiger Erreger nachzuweisen ist. Ein solches molekularbasiertes Verfahren dürfte gleichzeitig als Basis für die innovative Entwicklung von weiteren Ergänzungs- und Ersatzmethoden dienen.

C. botulinum ist ein obligat anaerobes, sporenbildendes Stäbchenbakterium, das zur Familie der *Clostridiaceae* (gemäß National Library of Medicine Taxonomy, 2005) gehört. Der in der Umwelt weit verbreitete Erreger ist in der Lage, sieben verschiedene Neurotoxintypen (BoNT/A-G) zu produzieren. Botulinumtoxine gelten als stärkste natürlich vorkommende Gifte, die beim Menschen und bei Tieren den Botulismus verursachen. Bei Lebensmittelvergiftungen stehen die Typen A, B und E, seltener F im Vordergrund, bei den Tieren die Typen C und D.

Der klassische Nahrungsmittel-Botulismus ist eine schwere, lebensbedrohliche Intoxikation des Menschen. Nach einer Inkubationszeit von wenigen Stunden bis mehreren Tagen treten schwerwiegende Krankheitssymptome auf, die den Tod des Patienten nach sich ziehen können. Die Hauptsymptome der Erkrankung beim Menschen sind: Übelkeit, Erbrechen, Durchfall, Bauchkrämpfe, Schluck-, Sprachstörungen sowie schlaffe Lähmungen der Kopf-, Hals-, Skelett- und Atemmuskulatur. Die letale Dosis liegt für Mäuse bei 0,3 ng/kg Toxin, für den Menschen bei 0,2 µg/kg bis 2,0 µg/kg. In Deutschland wurden in den letzten Jahren durchschnittlich 5-15 Fälle gemeldet, weltweit ist aber mit mehr als 1.000 Fällen zu rechnen. Überwiegend ist der Botulismus auf selbst eingekochte Fleisch- und Gemüsekonserven, vakuumverpackte Räucherfischwaren oder Knochenschinken zurückzuführen.

Eine Sonderform stellt der Säuglingsbotulismus dar. Er kann durch Verzehr von *C.-botulinum*-sporenhaltigem Honig, aber wohl auch durch Hausstaub hervorgerufen werden. Beim Säuglingsbotulismus ist die Sterblichkeitsrate besonders hoch.

Für das im Rahmen dieses Projektes zu entwickelnde neuartige RT-Real-Time-PCR-System sollen anhand von Literatur- und Datenbankrecherchen geeignete Marker und Primer für den spezifischen Nachweis der *C.-botulinum*-Neurotoxine A, B, E und F ausgewählt werden. Im Rahmen der Validierung dieses Verfahrens sind die Bestimmung der Nachweisgrenzen, der Spezifität und der Sensitivität zu prüfen. Zu diesem Zweck sollen unterschiedliche Lebensmittel mit definierten Toxin-produzierenden Erregermengen artifiziiell kontaminiert werden. Ergänzend erfolgt die Evaluierung ausgewählter und bereits publizierter Real-Time-PCR-Verfahren (Yoon *et al.*, 2005; Akbulut *et al.*, 2004; Kimura *et al.*, 2001) und dem bisher einzigen publizierten RT-Real-Time-PCR-Verfahren (Lövenklev *et al.*, 2004).

set



**Stiftung zur Förderung
der Erforschung von
Ersatz- und
Ergänzungsmethoden
zur Einschränkung von
Tierversuchen**

Begleitend erfolgt die Evaluierung eines ELISA-Verfahrens zum Nachweis von BoNT/A, B, E und F (Ferreira *et al.*, 2003), dessen Sensitivität mit der des Mäusetests vergleichbar ist. Damit wird es möglich, Validierungsdaten für das neu zu entwickelnde RT-Real-Time-PCR-Verfahrens zu erhalten, ohne den Mäusetest als „gold standard“ mitführen zu müssen.

Ausführende Institution:

Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde

-Professur für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde-

-Professur für Hygiene der Lebensmittel tierischen Ursprungs und Verbraucherschutz-

Fachbereich Veterinärmedizin , Justus-Liebig-Universität Gießen

Frankfurter Str. 92 , 35392 Gießen

food-science@vetmed.uni-giessen.de

Projektleiter:

Univ. Prof. Dr. M. Bülte, Dipl. ECVPH

Univ. Prof. Dr. Dr. habil. H. Eisgruber, Dipl. ECVPH

Stand Dezember 2007