

## **Maus-Bioassay als Standard-Referenzmethode für die routinemäßige Analyse von Algengiften in Muscheln nicht geeignet**

Stellungnahme Nr. 032/2005 des BfR vom 26. Mai 2005

Wie alle Lebensmittel, die in der Europäischen Union in den Handel gelangen, unterliegen auch Muscheln und andere Meeres-Schalentiere der amtlichen Lebensmittelkontrolle. Sie werden u.a. auf für den Menschen gesundheitsschädliche Algentoxine untersucht, die Durchfall und Lähmungen verursachen können. Um diese Algentoxine nachzuweisen, wird in Deutschland als routinemäßige Methode ein chemisch-physikalisches Verfahren angewandt. Dagegen schreibt die Europäische Kommission als Referenzmethode den Maus-Bioassay vor, bei dem die Algentoxine im Tierversuch nachgewiesen werden.

Im Folgenden begründet das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), warum in Deutschland das chemisch-physikalische Prüfverfahren bevorzugt wird. Dabei stehen nicht nur die tierschutzrechtlichen, sondern insbesondere die wissenschaftlichen Argumente im Vordergrund.

Der Maus-Bioassay hat sich beim Nachweis von Algentoxinen als unzuverlässig erwiesen. Wissenschaftliche Untersuchungen belegen, dass der Maus-Bioassay gesundheitsrelevante Toxine nicht in ausreichendem Maße erkennt. Alternative chemisch-physikalische Methoden haben dagegen Ergebnisse geliefert, die zu einer Beanstandung von Muscheln geführt und verhindert hätten, dass diese in den Handel gelangen.

Die Ergebnisse der Toxinanalysen im Maus-Bioassay variieren je nach verwendetem Mäusstamm, Geschlecht und Gewicht der Tiere. Die Ergebnisse sind zwischen den Laboratorien der Mitgliedstaaten nicht gut reproduzierbar. Der Maus-Bioassay ist zudem für quantitative Aussagen offenbar ungeeignet. Deshalb kann er nicht zur Kontrolle der Einhaltung von Höchstmengen für Algentoxine eingesetzt werden.

Das BfR empfiehlt, chemisch-physikalische Analysen wie das LC/MS -Verfahren als Referenzmethode für die Bestimmung von Algentoxinen in Muscheln einzusetzen und den Maus-Bioassay nur als zusätzlichen Analyseschritt vorzusehen, wenn sich ein positives qualitatives Ergebnis zeigt und eine weitere Abklärung im Interesse des Verbraucherschutzes (gerichtliche Verwertbarkeit der Testergebnisse usw.) notwendig, mit chemisch-physikalischen Methoden aber nicht möglich ist.

Bei dem LC/MS-Verfahren handelt es sich um eine wissenschaftliche, nach international anerkannten Kriterien geprüfte Methode, die bereits von der Neuseeländischen Lebensmittelsicherheitsbehörde FSA (Food Safety Authority) als amtliche Methode anerkannt ist und erfolgreich in einem Ringversuch getestet wurde.

Das BfR spricht sich gegenüber der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit EFSA (European Food Safety Authority) dafür aus, die LC/MS-Methode anstelle des Maus-Bioassay als Referenzmethode zu etablieren, weil sie den Verbraucherschutz verbessert und gleichzeitig zum Tierschutz beiträgt.

## 1 Kritik am Maus-Bioassay als Referenzmethode für die routinemäßige Analyse mariner Biotoxine

Das BfR und sein Nationales Referenzlaboratorium (NRL) für die Kontrolle mariner Biotoxine ersuchen die EFSA um die wissenschaftliche Diskussion der nachfolgenden Thematik.

Im Rahmen der Lebensmittelüberwachung wird zur Untersuchung lebender Muscheln auf marine Biotoxine der Maus-Bioassay (MBA) angewendet. In einigen Fällen erwies sich der MBA als nicht empfindlich genug, um die für die menschliche Gesundheit relevanten Mengen an marinen Biotoxinen anzuzeigen. Das BfR vertritt die Auffassung, dass moderne wissenschaftliche Methoden anstelle des MBA als Referenzmethode verwendet werden sollten, um den Verbraucherschutz zu erhöhen und die Tierschutzrichtlinien im Sinne des Ersatzes, der Reduktion und Leidensminderung von Tierversuchen zu erfüllen.

Vor diesem Hintergrund wird die EFSA ersucht die folgenden wissenschaftlichen Fragen zu bewerten, um die Bedenken gegenüber dem MBA als Referenzmethode in der Routinetestung zu klären.

### 1.1 Schützt der MBA als Referenzmethode in der Routinetestung auf marine Biotoxine ausreichend die Gesundheit der Verbraucher?

Die Entscheidung 2002/226/EG der Kommission vom 15. März 2002 (ABl. EG Nr. L 75/62) enthält Durchführungsbestimmungen zur Richtlinie des Rates 91/492/EWG geändert durch die Richtlinie 97/61/EG des Rates. Die Entscheidung 2002/225/EG bestimmt Grenzwerte und Analysemethoden für marine Biotoxine in lebenden Muscheln, Stachelhäutern, Manteltieren und Meeresschnecken. In der Entscheidung werden Höchstmengen für bestimmte marine Biotoxine der DSP-Toxingruppe festgesetzt.

Durch die Entscheidung 2002/225/EG vom 15. März 2002 sind prinzipiell in vitro Methoden, wie z.B. chemisch-physikalische Testmethoden, für alle marinen Biotoxine als Alternative zum Tierversuch zugelassen. Dabei wird vorab eine Validierung der Methoden auf der Grundlage eines international anerkannten Protokolls gefordert. Im Artikel 5 der Entscheidung 2002/225/EG wird bekräftigt, dass bei Abweichungen zwischen den Ergebnissen verschiedener Analysemethoden nach wie vor der Maus-Bioassay als Referenzmethode gilt.

Die EFSA wird vom BfR ersucht, zu prüfen, ob der MBA aus wissenschaftlicher Sicht den Status einer Referenzmethode erfüllen kann. Das BfR ist der Meinung, dass der MBA nicht als Referenzmethode einsetzbar ist. Insbesondere die Ergebnisse der gemeinsamen FAO/IOC/WHO ad hoc Expertenkonsultation über Biotoxine in lebenden Muscheln, Oslo, 26. bis 30. September, 2004 stellen den Status des MBA als Standardreferenzmethode für marine Biotoxine in Frage. In einer ersten Veröffentlichung wird über die Festlegung neuer Höchstmengen für marine Biotoxine der DSP-Gruppe berichtet (vgl. Tabelle 1).

Ausgehend vom „Derived Guidance Levels/Max Levels“, der von einem Verzehr von 250 g Portionen basiert, versagt der MBA bei der Prüfung auf Azaspirosäuren, Okadasäure, Dinophysistoxine und Ester in relevanten Konzentrationen, d.h. mit falsch negativen Ergebnissen muss gerechnet werden. Obwohl diese neuen Höchstmengenvorschläge zur Risikobewertung noch in keiner Vorschrift eines Landes enthalten sind, können solche toxikologischen Daten aus der Sicht des vorbeugenden Verbraucherschutzes nicht ignoriert werden.

Tabelle 1:  
FAO/IOC/WHO ad hoc Expertenkonsultation über Biotoxine in lebenden Muscheln, Oslo, 26. bis 30. September 2004

Joint FAO/IOC/WHO ad hoc Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs

### 5.9 Summary Tables of Toxicology and Methods of Analysis

Table 2: Summary data used in the derivation of the acute RfD, as well as derived and current guidance levels.

Toxin Group	LOAEL(1) NOAEL(2) µg/kg bw	Safety Factor (Human data (H) Animal data (A))	Provisional Acute RfD <sup>a</sup>	Derived Guidance Level/ Max Level based on consumption of 100g (1), 250g (2) and 380g (3)	Guidance Level/Max Level currently implemented in some countries <sup>b</sup>
AZA	0.4 (1)	10(H)	0.04 µg/kg 2.4 µg/adult	0.024 mg/kg Shellfish Meat(1) 0.0096 mg/kg SM (2) 0.0063 mg/kg SM (3)	0.16 mg/kg SM
BTX			N/A		0.8 mg/kg SM as PbTx-2
Cyclic Imines			N/A		
DA	1,000 (1)	10(H)	100 µg/kg 6mg/adult <sup>a</sup>	60 mg/kg SM(1) 24 mg/kg SM(2) 16 mg/kg SM(3)	20 mg/kg SM
OA	1 (1)	3(H)	0.33µg/kg 20 µg/adult <sup>a</sup>	0.2 mg/kg SM (1) 0.08 mg/kg SM (2) 0.05 mg/kg SM(3)	0.16 mg/kg SM
PTX			N/A		
STX	2 (1)	3(H)	0.7 µg/kg 42 µg/adult <sup>a</sup>	0.42 mg/kg SM(1) 0.17 mg/kg SM(2) 0.11 mg/kg SM(3)	0.8 mg/kg SM
YTX	5,000 (2)	100(A)	50 µg/kg 3 mg/adult <sup>a</sup>	30 mg/kg SM(1) 12 mg/kg SM(2) 8 mg/kg SM(3)	1 mg/kg SM

<sup>a</sup> Based on an adult bw of 60 kg.

<sup>b</sup> These levels are considered as standard international regulatory levels, even though some countries might have different levels

Bei der Verwendung des MBA als Referenzmethode müssen folgende Nachteile diskutiert werden:

- Ungeachtet seines Status als Referenzmethode, zeigen Untersuchungsergebnisse des MBA sowohl im Vergleich zwischen Laboratorien der Mitgliedstaaten als auch innerhalb eines Labors große Streuungen.
- Die Untersuchungsergebnisse des MBA haben im Vergleich zwischen verschiedenen Laboratorien keine gute Reproduzierbarkeit gezeigt (McFarren 1959, LeDoux and Hall 2000, Toti et al. 1991). Dieser Fakt muss bei der Durchsetzung von Grenzwerten für Toxine in Muschelfleisch und bei der Risikobewertung zum Schutz der Gesundheit der Verbraucher beachtet werden. Es ist besorgniserregend, dass die Entscheidung 2002/225/EG weiterhin an Grenzwerten für Toxine festhält, obwohl nicht geklärt ist, ob auf der Grundlage des MBA quantitative Aussagen über den Gehalt an DSP-Toxinen möglich sind.

Die Untersuchungsergebnisse des MBA für DSP- und PSP-Toxine zeigen eine hohe Variabilität. Stamm der Mäuse, Geschlecht, Alter und Körpergewicht beeinflussen die Untersuchungsergebnisse (Stabell et al., 1992; Prakasch et al., 1971; Nagashima et al. 1991). In der wissenschaftlichen Literatur wird der MBA als nicht validierbar beschrieben. Die Untersuchungsergebnisse zeigen eine zu große Variabilität zwischen den Laboratorien. Anlässlich der 5. International Conference on Molluscan Shellfish Safety (Juni 2004) kritisierte McNabb et al. (2004) die geringe Sensitivität (zu viele falsch-negative Ergebnisse) und die geringe Spezifität (zu viele falsch-positive Ergebnisse) des MBA im Vergleich zu chromatographischen Methoden (z.B. LC/MS).

- **Es ist nicht möglich, den MBA zur quantitativen Bestimmung von marinen Biotoxinen der DSP-Gruppe zu validieren.** Der MBA liefert ausschließlich qualitative Ergebnisse für DSP- und andere fettlösliche Toxine. Zur Bestimmung von PSP-Toxine ist der MBA nicht spezifisch genug. Die Genauigkeit, Zuverlässigkeit und Relevanz der Untersuchungsergebnisse sind nicht ausreichend.
- In der Literatur wird diskutiert, dass die in der neuen Richtlinie empfohlene Extraktionsmethode für bestimmte Toxine, wie z.B. Yessotoxin, nicht ausreichend ist. Aus den Berichten des Europäischen Lebensmittel- und Veterinärämtes ((FVO), Grange/Ireland) und aus anderen Quellen geht hervor, dass die Mitgliedstaaten diese Extraktionsmethode nicht anwenden. Bei Yessotoxin oder anderen Faktoren wie z.B. Zink oder freien Fettsäuren zeigt der MBA falsch-positive Ergebnisse (McCulloch et al. 1989, Park et al. 1986, Suzuki et al. 1996, Lawrence et al. 1994, Takagi et al. 1984, Stabell et al., 1991).
- Der MBA ist in einigen Fällen nicht empfindlich genug und kann daher nicht als absolut sichere Untersuchungsmethode bewertet werden. Die wissenschaftliche Literatur beschreibt ernste Erkrankungsfälle bei Menschen bei gleichzeitig negativen Untersuchungsergebnissen des MBA (Jørgensen et al. 2004). Dagegen zeigten alternative in vitro Methoden zum Nachweis von DSP (wie z.B. die validierte CEN Methode DIN EN 14524) Untersuchungsergebnisse, die die betroffenen Chargen gestoppt hätten.

## 1.2 Welche wissenschaftliche Strategie empfiehlt die EFSA zur Validierung und regulatorischen Akzeptanz von in vitro Methoden zur Bestimmung von marinen Biotoxinen, die den Verbraucherschutz sichert und den Ersatz des MBA als Referenzmethode ermöglicht?

Es gibt umfangreiche Bemühungen bei der Entwicklung und Validierung von in vitro Alternativen zum MBA, z.B. chromatographische Methoden, Enzym-Immunoassays, Protein-Phosphatase-Inhibitions-Assays, Ligand-Rezeptor-Bindungs- und Zellkulturtests. Aufgrund

der vorliegenden wissenschaftlichen Literatur vertreten das BfR und das Deutsche NRL für die Kontrolle mariner Biotoxine die Auffassung, dass große Fortschritte zu verzeichnen sind.

Bereits 1985 berichtete Yasumoto et al. über den chromatographischen Nachweis von Tetrodotoxin (Toxin in Kugelfischen). In der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG (Gesetz über den Verkehr mit Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und sonstigen Bedarfsgegenständen, Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz) wird 1989 ein fluorimetrisches Verfahren zur Bestimmung des Gehalts an PSP-Algentoxinen in Muscheltieren und Muschelerzeugnissen veröffentlicht.

Holland et al. berichteten 2002 über das neue Überwachungsprogramm für marine Biotoxine in Neuseeland, das auf der Anwendung der LC/MS Methode basiert. Voraussetzung für das Überwachungsprogramm ist die bereits abgeschlossene Validierung der in vitro Methoden für ASP mit einer Höchstmengenregelung von 20 mg/kg und für DSP mit einer Höchstmengenregelung von 20 µg/100g. Holland et al. (2002) heben hervor, dass die Anwendung der LC/MS-Methode auch für die PSP-Toxine gegenwärtig in Neuseeland geprüft wird. Auch im Deutschen NRL für die Kontrolle mariner Biotoxine im BfR wird daran gearbeitet.

Unabhängig von den internationalen Entwicklungen und Fortschritten bei der Validierung chromatographischer Verfahren sind für die behördliche Anerkennung von in vitro Methoden in Europa die Aktivitäten des CEN von besonderer Bedeutung. Im Oktober 2004 wurde die Norm DIN EN 14524 „Lebensmittel – Bestimmung von Okadasäure in Muscheln – HPLC-Verfahren“ herausgegeben. Die europäischen Normen EN 14176:2003 zur Bestimmung von Domoinsäure in Muscheln mit dem HPLC-Verfahren und EN 14526:2004 zur Bestimmung von Saxitoxin in Muscheln mit dem HPLC-Verfahren wurden vom CEN verabschiedet und ihre Veröffentlichung angekündigt (CEN/TC 275-Published Standards, <http://www.cenorm.be>).

In der wissenschaftlichen Literatur werden darüber hinaus die Entwicklungen von Enzym-Immunoassays, Protein-Phosphatase-Inhibitions-Assays, Ligand-Rezeptor-Bindungs- und Zellkulturtests beschrieben. Für diese Methoden liegen noch keine Standardprotokolle vor, das heißt, die Entwicklung der Methoden ist noch nicht abgeschlossen. Enzym-Immunoassays bieten zum Beispiel einen schnellen Nachweis mit hohem Probendurchsatz.

1.3 Sind klare Strategien zur Implementierung der verfügbaren besten Methode zur routinemäßigen Untersuchung auf marine Biotoxine entwickelt worden?

Die gegenwärtigen Untersuchungsmethoden zur Bestimmung von Algentoxinen sollten im Sinne eines besseren Verbraucherschutzes und der Anwendung der verfügbaren besten Methode weiterentwickelt werden. Im Hinblick auf den technischen Fortschritt, der seit dem Inkrafttreten der Muscheltoxin-Richtlinie zu verzeichnen ist, schlägt das BfR vor, über die Notwendigkeit der Änderung der gegenwärtigen gesetzlichen Regelungen zu diskutieren. Das BfR vertritt die Auffassung, dass die zu untersuchenden Proben zunächst mit den derzeit verfügbaren chemisch-physikalischen Methoden auf eine Kontamination mit marinen Biotoxinen untersucht werden sollten. Der MBA sollte in einem zweiten Schritt nur dann angewandt werden, wenn sich ein positives qualitatives Ergebnis zeigt und eine weitere Abklärung notwendig, aber mit chemisch-physikalischen Methoden nicht möglich ist.

1.4 Könnte die LC/MS-Methode nach einer erfolgreichen Validierung als zuverlässige Referenzmethode anerkannt werden?

Weltweit gibt es noch keine evaluierte Referenzmethode zur Bestimmung von marinen Biotoxinen in Muscheln. Die Mitgliedstaaten der EU importieren pro Jahr mehrere tausend Ton-

nen Muscheln aus Neuseeland. Die offizielle Methode zur Bestimmung des Gehalts an DSP-Toxinen (entsprechend der Entscheidung 2002/2005/EG) ist hier eine LC/MS-Methode, die von der Neuseeländischen Behörde für Lebensmittelsicherheit FSA anerkannt ist und inzwischen in einer Intra-Laboruntersuchung entsprechend einem internationalen Protokoll validiert ist. Darüber hinaus wurde diese Methode auch in einem internationalen Ringversuch erfolgreich getestet.

Das FVO kontrollierte im Jahr 2003 die Produktions- und Untersuchungseinrichtungen für Schalentiere und Muscheln in Neuseeland. Das FVO erhob dort keine Bedenken gegen die Anwendung der LC/MS-Methode anstelle des in Europa vorgeschriebenen MBA.

Da für einige marine Biotoxine der DSP-Gruppe gegenwärtig keine Referenzsubstanzen verfügbar sind, können alternative Methoden für solche Verbindungen noch nicht validiert und der MBA in Europa nicht durch sichere Analysemethoden ersetzt werden.

Unabhängig davon akzeptiert die Europäische Kommission Importe von Muscheln, deren Gehalt an DSP-Toxinen mit der LC/MS-Methode geprüft wurde.

## 2 Referenzen

Food and Agriculture Organization of the United Nation (FAO), Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO (IOC), World Health Organization (WHO): Report of the Joint FAO/IOC/WHO ad hoc Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs. Oslo, Norway, Sept. 26-30, 2004

Kevin Jørgensen and Lene Bai Jensen: Distribution of DSP toxins in consignments of blue mussels. *Food Additives and Contaminants*. 21:341-347 (2004)

Lawrence, J.F., Chadha, R.K., Ratnayake, W.M., Truelove, J.F.: An Incident of Elevated Levels of Unsaturated free Fatty Acids in Mussels from Nova Scotia and their toxic effect in Mice After Intraperitoneal injection. *Natural Toxins* 2:318-321 (1994)

LeDoux, M. and Hall, S.: Proficiency testing of Eight French Laboratories in Using the AOAC Mouse Bioassay for Paralytic Shellfish Poisoning: Interlaboratory Collaborative Study. *Journal of the A.O.A.C.* 83(2):305-310 (2000)

McCulloch, A.W., Body, R.K., de Freitas, A.S., Foxall, R.A., Jamieson, W.D., Laycock, M.V., Quilliam, M.A., Wright, J.L., Boyko, V.J., McLaren, J.W.: Zinc from Oyster Tissue as Causative Factor in Mouse Deaths in Official Bioassay for Paralytic Shellfish Poison. *Journal of the A.O.A.C.* 72(2):384-386 (1989)

McFarren E.F.: Report on Collaborative Studies of the Bioassay for Paralytic Shellfish Poison. *Journal of the A.O.A.C.* 42 (2): 263-271 (1959)

McNabb, P., Holland, P., Ginkel van R., Selwood, A.: Using Liquid Chromatography Spectrometry (LCMS) to manage Shellfish Harvesting and Protect Public Health. Book of Abstracts, 5<sup>th</sup> International Conference on Molluscan Shellfish Safety, 14<sup>th</sup>-18<sup>th</sup> June 2004, National University of Ireland, Galway.

Nagashima Y., Noguchi T., Kawabata T., Hashimoto K.: Dose-Death Time Curves of Paralytic Shellfish Poisons in ddY Strain Mice. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57(4): 699-704 (1991)

Park, D.L., Adams WN, Graham SL, Jackson RC.: Variability of Mouse Bioassay for Determination of paralytic Shellfish Poisoning. *Journal of the A.O.A.C.* 69(3): 547-550 (1986)

Prakash A., Medcof J.C., Tennant A.D.: Paralytic shellfish poisoning in eastern Canada. Bulletin 177, Fisheries Research Board of Canada (1971)

Stabell, O.B., Yndestad, M., Heidenreich, B.: Paralytic shellfish toxins seems absent in extracts of diarrhetic shellfish toxins. Environ. Toxicol. Chem. 10: 331-334 (1991)

Stabell O.B., Steffenak I., Aune T.: An Evaluation of the Mouse Bioassay applied to Extracts of Diarrhetic Shellfish Toxins. Food & Chemical Toxicology 30: 139-144 (1992)

Suzuki, T., Yoshizawa, R., Kawamura, T., Yamasaki, M.: Interference of Free Fatty Acids from the Hepatopancreas of Mussels with the Mouse Bioassay for Shellfish Toxins. Lipids 31(6):641-645 (1996)

Takagi, T. et al.: Toxic Effect of Free Unsaturated Fatty Acids in the Mouse Bioassay of Diarrhetic Shellfish Toxin by Intraperitoneal Injection. Bulletin Japan. Soc. Of Sci. Fisheries 50(8):1413-1418 (1984)

Toti, L., Croci, L., De Medici, D., Gizzarelli, S., Di Pasquale, M., Orfice, L. and Stazi, A.: Evaluation of Yasumoto test for the determination of DSP toxin in shellfish. Proceedings of Symposium on Marine Biotoxins: 107-110, Paris (1991)

Yasumoto et al. Yasumoto T; Michishita T.: Fluorometric determination of tetrodotoxin by high-performance liquid chromatography. Agricultural and biological chemistry , 49 , 3077-3089, 1985