

Marine Biotoxine – Abschaffung des Maus- Bioassays: Ein Meilenstein

Anja These

NRL für marine Biotoxine

Eingliederung im BfR:

- Abteilung 8: Sicherheit in der Nahrungskette
- Fachgruppe 82: Kontaminanten
- NRL für marine Biotoxine seit 1993 im BfR
- Benennung als NRL für Litauen und Lettland
- GRL für marine Biotoxine befindet sich in Vigo (Spanien)



Marine Biotoxine

Von **Algen** gebildete sekundäre
Stoffwechselprodukte

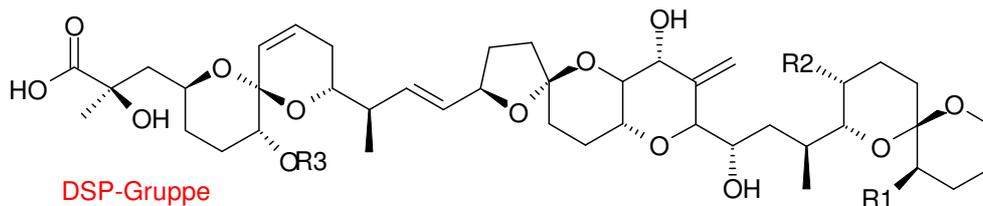
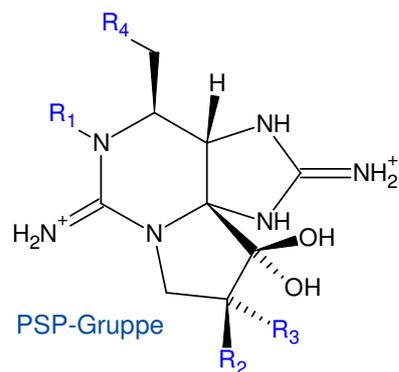
Anreicherung in filtrierenden **Muscheln**

Einteilung in Gruppen:

- bezüglich der beim **Menschen** hervorgerufenen Symptome
- oder bezüglich der Struktur

In Europa vorkommende marine Biotoxine – Einteilung

- **ASP - amnesic shellfish toxin**
- **PSP - paralytic shellfish toxin**
- **Gruppe der lipophilen Toxine
(DSP/YTX/PTX/AZA)**



„Geschichte“ der DSP-Toxine und des MBAs

164 Erkrankte nach Verzehr von Muscheln in Japan

YASUMOTO et al., (1978)

▪ Entwicklung des Maus-Bioassays

3 Mäuse

ip. Injektion von 1 mL Extrakt

24h

Tod von 2 Mäusen

Nachweis von DSP-Toxinen



marine sponge:
Halichondria okadae



Nachweis von PSP-Toxinen

Tachibana et al., (1981). "Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus Halichondria"

Der MBA als Referenzmethode

2005:

- > BfR Position Papier: „Maus-Bioassay als Standard-Referenzmethode für die routinemäßige Analyse von Algengiften in Muscheln nicht geeignet“
- > Anfrage des BfRs bei der EFSA, ob der MBA den gesundheitlichen Verbraucherschutz gewährleisten kann
- >> **Besuch des FVO in Deutschland**
- Einführung der CRL/NRL AG zur Entwicklung einer LC-MS/MS Methode
- Europäische Forschungsprojekte (z.B. BIOTOX, DETECTOX, BioCop)

Der MBA als Referenzmethode

Gesundheitsrelevante Toxine wurden vom MBA nicht in ausreichendem Maße erkannt

Ergebnisse des MBA hängen vom Mäusestamm, Geschlecht, Gewicht der Tiere ab



UMWELT

Das unsichtbare Gift

Von Fichtner, Ullrich

Arcachon, Frankreichs berühmte Austernbucht, fürchtet um ihre Existenz. Angeblich sind die Meeresfrüchte verseucht, Mäuse sterben bei Labortests. Züchter kämpfen gegen Politiker, die Platz schaffen wollen für den Tourismus.

Ängstliches Warten auf die Laboregebnisse

Von Florian Bamberg, Bordeaux

Delikatessen. Nach Skandalen bangen die Austernzüchter von Arcachon jetzt um ihre Muscheln.



Eine der großen französischen Delikatessenbranchen ist in der Krise. Die Austernindustrie. Ist doch seit dem 31. August der Verkauf der Gourmetmuschel aus Europas größter

Schwierigkeiten bei der Validierung alternativer Methoden

- DSP-Gruppe
- Yessotoxingruppe
- Pectenotoxingruppe
- Azaspiracidgruppe

12 rechtlich geregelte Toxine

4 zertifizierte Standards

Labore mit wenigen analytischen Vorkenntnissen

Validierung von LC-MS/MS Verfahren generell schwierig (Matrixeffekte etc.)

Methodenvalidierungsstudie zur Bestimmung lipophiler Mariner Biotoxine mittels LC-MS/MS

2009-2010 Durchführung eines Ringversuchs im Rahmen der § 64 LFGB AG „Phycotoxine“

15 Labore (8 aus DE; 7 aus EU)
16 Proben

- Probenaufarbeitung: festgelegt
- LC-MS/MS Bedingungen: frei wählbar
- **Erarbeitung von Analysenkriterien zur Qualitätssicherung der LC-MS/MS Messung**

Konzept der Methodenvalidierungsstudie

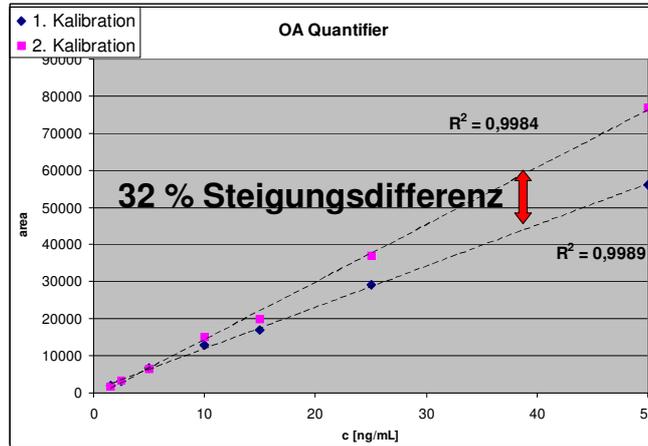
Untersuchung zur Wiederhol- bzw. Vergleichbarkeit:

- Probenvorbereitung
- Doppelinjektion
- Wiederholbarkeit von LC-MS Analysen in verschiedenen Sequenzen
- Einfluss von Responsedrift/Matrixeffekten
- Strategien zur Korrektur von Matrixeffekten

Ausgewählte Ergebnisse der Methodvalidierungsstudie

Response Drift

Steigungsdifferenz von Kalibriergeraden nach 30 Injektionen



Ausgewählte Ergebnisse der Methodvalidierungsstudie

Response Drift:

Steigungsdifferenz der Kalibriergeraden aller Labore nach 30 Injektionen

AZA1	OA	PTX2	YTX
5,7	5,3	3,5	2,1
8,8	2,5	11,5	17,1
12,3	14,1	4,3	10,9
24,6	14,3	6,2	21,7
14,3	2,1	5,7	13,1
10,2	15,7	16,2	13,0
3,3	7,4	2,6	10,0
4,7	1,1	5,0	3,7
1,0	6,4	4,9	6,3
5,8	3,6	11,0	42,6
3,5	10,9	6,3	16,7
7,5	11,7	0,3	42,2
13,1	1,7	3,3	16,4
8,6	14,5	5,9	18,9
1,3	8,6	6,8	16,4
1,9	4,0	11,1	23,6
17,9	6,8	18,3	10,6
4,1	9,8	3,1	2,1
17,5	3,2	1,7	19,3
39,2	0,4	0,2	10,1
14,5	14,1	1,1	5,5
4,4	3,3	15,9	2,3
3,1	1,2	0,7	7,8
1,7	0,6	15,9	3,1
7,5	3,8	5,4	15,5
2,1	1,5	1,4	5,3
7,5	3,8	7,0	20,3
2,3	2,2	3,5	17,8
1,3	6,0	24,4	13,7
1,3	14,0	2,7	
6,4	7,2		
4,0	19,5		
0,4	11,4		

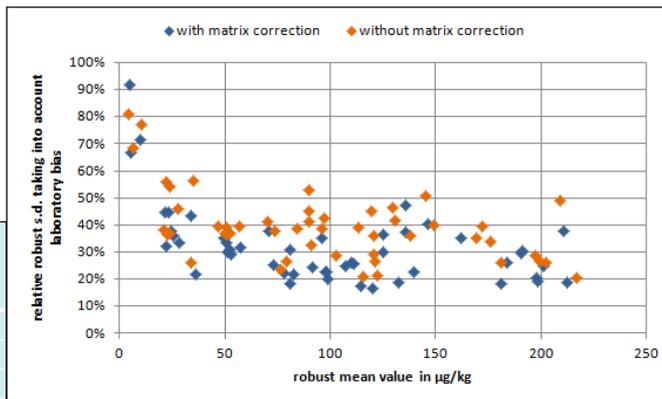
MEAN	8,0	8,3	6,9	13,1
MAX	39,2	32,3	24,4	42,6

	7,8	25,0		
	20,3	22,8		
	12,8	19,5		
MEAN	8,0	8,1	6,9	13,1
MAX	39,2	25,0	24,4	42,6

Ausgewählte Ergebnisse der Methodvalidierungsstudie

Einfluss der Matrixkorrektur auf die Präzision?

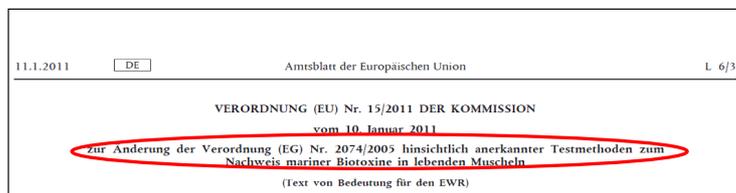
Analyt	Relative improvement of reproducibility
AZA1	43%
AZA2	22%
AZA3	18%
DTX1	29%
DTX2	6%
OA	15%
OH_YTX	22%
PTX2	16%
YTX	26%



Mittlere Reduktion über alle Analyten: 26 %
Matrixkorrektur reduziert die Vergleichsstandardabweichung

Zusammenfassung - Ersatz des MBA

- § 64 LFGB:** Aufnahme in die Amtliche Sammlung erfolgte im September 2010 (L-12.03/04)
- CEN:** Standardisierung des Verfahrens als Europäische Norm von 2010-2012 (EN 16204)
- EU:** Ersatz des Maus-Bioassays als Referenzmethode durch ein LC-MSMS Verfahren in 2011



Publikation der Studie:

Anja These, Christine Klemm, Ingo Nausch, Steffen Uhlig:
ANAL & BIOANAL CHEM, 2011, 399 (3), 1245-1256

Ausblicke – derzeitige Aufgaben

- ❖ Erweiterung der LC-MS/MS Methode zur Bestimmung der lipophilen Toxine um die **ASP-Gruppe**
 - Durchführung der Validierungsstudie in Rahmen der § 64 LFGB AG „Phycotoxine“
 - Erweiterung der CEN-Methode (EN 16204)



DANKE FÜR IHRE AUFMERKSAMKEIT

Anja These

Bundesinstitut für Risikobewertung
Max-Dohrn-Straße 8-10 • D-10589 Berlin
Tel. 0 30 - 84 12 - 0 • Fax 0 30 - 84 12 - 47 41
bfr@bfr.bund.de • www.bfr.bund.de