

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* Typ A-, 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

set



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

Entwicklung eines Real Time Reverse Transkriptase-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 war es, eine Ersatzmethode des bislang als „golden standard“ geltenden Mäuse-Bioassays („Mäusetest“) zum Nachweis von *Clostridium botulinum*-Neurotoxinen (Bont) in Lebensmitteln durch ein Real Time Reverse Transkriptase – PCR – Verfahren (Real Time RT – PCR) zu entwickeln.

Clostridium botulinum (*C. botulinum*) ist ein obligat anaerobes, sporenbildendes Stäbchenbakterium, das zur Familie der *Clostridiaceae* 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 hauptsächlich die Typen A, B und E, seltener F, im Vordergrund, während bei den Tieren überwiegend die Typen C und D klinisch Botulismus hervorrufen können.

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-, und Sprachstörungen sowie schlaffe Lähmungen der Kopf-, Hals-, Skelett- und Atemmuskulatur. Der Erkrankte stirbt bei vollem Bewusstsein. 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.

Die Untersuchung einer verdächtigen Lebensmittelprobe bedarf gemäß der DIN-Norm 10102/§ 64 LFGB, L 06.00-26 einer Anzahl von mindestens 54 Versuchsmäusen. Deshalb wurde als Alternativmethode ein Real Time Reverse Transkriptase-PCR-Verfahren (Real Time RT -PCR) zum Nachweis von *C. botulinum* Typ A-, B-, E- und F-Neurotoxinproduktion in Lebensmitteln entwickelt. Ein solches molekularbasiertes Verfahren dürfte gleichzeitig als Basis für die innovative Entwicklung von weiteren Ergänzungs- und Ersatzmethoden dienen.

set



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

Es ist gelungen, ein molekularbasiertes Verfahren (Real Time RT-PCR-Verfahren) zu entwickeln, mit dessen Hilfe ein eindeutiger, sowohl qualitativer als auch quantitativer Nachweis einer Genexpression aller Lebensmittel-assoziierten *C. botulinum* Toxintypen (Typ A, B, E und F), einschließlich deren Subtypen, möglich ist. Als Ausgangsbasis zur Etablierung der neuartigen Methode dienten 67, mittels biochemischer, serologischer und molekularbiologischer Feindifferenzierungs- und Typisierungsverfahren als *C. botulinum* charakterisierte Stämme (24 Typ A-, 31 Typ B-, sechs Typ E- und sechs Typ F-Stämme). Durch die Etablierung entsprechender Primer-Sondensysteme konnte über dem Nachweis der mRNA und deren Transkription in die cDNA eine Bont A-, B-, E- und F-Produktion nachgewiesen werden.

Die absolute Quantifizierung basierte auf einer dekadischen Verdünnungsreihe von Bont A-, B-, E- und F-cDNA und wurde anhand einer Standardkurve berechnet. Die relative Quantifizierung der Bont A, B, E und F erfolgte durch den Einsatz eines als endogene Kontrolle fungierenden „Housekeeping“-Gens, unter Einbeziehung der vergleichenden Ct-Methode. Hierbei wird die Expression des Bont A-, B-, E- und F-Genabschnitts vergleichend zur Expression des ausgewählten „Housekeeping“-Genes dargestellt. Auf dieser Weise konnte die tatsächliche Expression und somit die reale Menge an produziertem Neurotoxin ermittelt werden. Insgesamt kann nunmehr eine Methodenkaskade vorgestellt werden, die als Alternative zum Mäuse-Bioassay dienen kann.

Eigene Publikationen / Vorträge

1. ABMUS, N., ROSA, S., ABDULMAWJOOD, A., NIKOLAUS, S., GAREIS, M., BÜLTE, M. and H. EISGRUBER (Poster)
Development of a Reverse Transcriptase Real Time-PCR for the detection of neurotoxin-production of *Clostridium botulinum* Type A, B, E and F in foodstuff as an alternative to the mouse-bioassay, *Clostridium botulinum* congress, Helsinki (16.-19.6.2008)
2. BÜLTE, M., S. NIKOLAUS
Nahrungsmittelbotulismus, Internes Symposium zum Nachweis von *Clostridium botulinum*-Toxinen, Hannover (25.03.2009)
3. ABDULMAWJOOD, A.
Molekularbasierte Identifizierung von Botulinum-Toxin, Internes Symposium zum Nachweis von *Clostridium botulinum*-Toxinen, Hannover (25.03.2009)



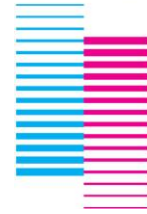
Stiftung zur Förderung
der Erforschung von
Ersatz- und
Ergänzungsmethoden
zur Einschränkung von
Tierversuchen

4. NIKOLAUS, S., ABDULMAWJOOD, A., AßMUS, N., ROSA, S., GAREIS, M., BÜLTE, M. und H. EISGRUBER (Poster)
„Phänotypische und genotypische Charakterisierung von lebensmittelrelevanten *Clostridium botulinum*-Stämmen“, 49. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Dtsch. Vet. Med. Ges. (DVG), Garmisch-Partenkirchen (29.09.-02.10.2008)
5. NIKOLAUS, S., BÜLTE, M. und H. EISGRUBER (Vortrag)
„Zur phänotypischen Charakterisierung von *C. botulinum*-Stämmen“, 50. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Dtsch. Vet. Med. Ges. (DVG), Garmisch-Partenkirchen (29.09.-02.10.2009)
6. ABDULMAWJOOD, A., ROSA, S., EISGRUBER, H. und M. BÜLTE (Poster)
„Molekularbasierter Nachweis von Botulinumtoxin-Genen“, 50. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Dtsch. Vet. Med. Ges. (DVG), Garmisch-Partenkirchen (29.09.-02.10.2009)
7. ABDULMAWJOOD, A., DÜKER, F., BABIĆ STEGELMANN, K., EISGRUBER, H. and M. BÜLTE (Poster)
„Quantification of neurotoxin type-A gene expression of *Clostridium botulinum* by using Reverse Transkriptase Real Time-PCR“, 51. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Dtsch. Vet. Med. Ges. (DVG), Garmisch-Partenkirchen (27.09.-01.10.2010)

Publikationen in Vorbereitung

1. Characterization of food-borne *Clostridium botulinum* strains by means of ELISA and polymerase chain reaction
2. Development of Reverse Transcriptase Real Time-PCR for the detection of botulinum toxins from food-borne strains
3. The Reverse Transcriptase Real Time-PCR as alternative to the mouse bioassay

set



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

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

Stand Mai 2011