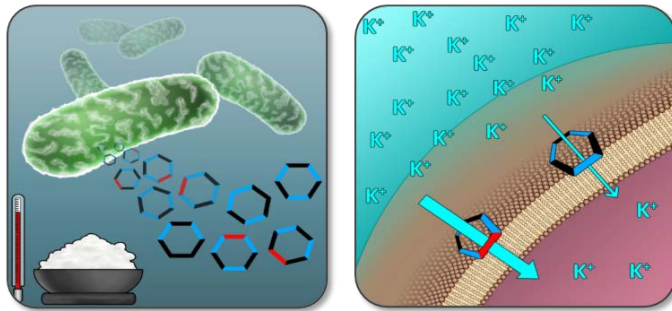


Vom IGF-Projekt zum weltweiten ISO-Standard: Wirtschaftlicher und schneller Cereulid-Toxin-Nachweis in Lebensmitteln für den vorbeugenden Verbraucherschutz



Forschungsprojekt **AiF 16845 N** (und dessen Vorläuferprojekt **AiF 15186 N**)

Forschungsstellen

Prof. Dr. Monika Ehling-Schulz
Veterinärmedizinische Universität Wien
Department für Pathobiologie
Institut für Mikrobiologie
Veterinärplatz 1
1210 Wien

Prof. Dr. Thomas Hofmann
Technische Universität München
Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und Molekulare Sensorik
Lise-Meitner-Straße 34
85354 Freising

Prof. Dr. Siegfried Scherer
Technische Universität München
Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung (ZIEL)
Abteilung Mikrobiologie
Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie
Weihenstephaner Berg 3
85354 Freising

Mitgliedsvereinigung der AiF

Dr. Volker Häusser
Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 142-148
53175 Bonn

Zusammenfassung

Im Rahmen des IGF-Projektes 16845 N und dessen Vorläufers AiF 15186 N konnte ein neues wirtschaftliches und schnelles Nachweisverfahren für das Toxin Cereulid in Lebensmitteln entwickelt werden, welches durch das weltweit verbreitete Bakterium *Bacillus cereus* gebildet wird. Für die **industrielle Qualitätssicherung sowie den vorbeugenden Verbraucherschutz** ist dieser Nachweis essentiell, weil nachgewiesene Cereulid-Lebensmittelvergiftungen deutlich zunehmen; die Symptome reichen von akutem Erbrechen bis zu schwerwiegenden Erkrankungen, die sogar tödlich verlaufen können.

Gerade für kleine und mittelständische Unternehmen (KMU) sind kaum bezifferbare Schadenersatzforderungen und Imageschäden die Folgen. Die jährlichen Kosten für Rückrufaktionen werden auf einen **zweistelligen Millionenbetrag** geschätzt; allein in einem aktuellen Schadensfall eines süddeutschen Unternehmens mussten Produkte im Wert von über 100.000 Euro aus dem Handel zurückgezogen werden.

Vor Beginn der Forschungsarbeiten war der Nachweis des Toxins teuer, zeitaufwändig und unpräzise. Eine direkte und exakte quantitative Messung des Toxingehalts in Lebensmitteln war nicht möglich – es bestand daher ein dringender Bedarf für die Lebensmittelindustrie. Vor diesem Hintergrund entwickelte das interdisziplinäre, transnationale Forscherteam einen **schnellen, sicheren und wirtschaftlichen Toxinnachweis** – eine Tool-Box innovativer Diagnostikmethoden für Cereulid in Lebensmitteln, die inzwischen in der Praxis eingesetzt wird: Dazu gehören Assays zum Echtzeitmonitoring der Biosynthese des Toxins direkt im Lebensmittel sowie eine Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIDA) zur Quantifizierung des Toxins und dessen neu entdeckten Varianten mit unterschiedlicher Toxizität.

Dieses Verfahren erlaubt es erstmalig, die Entstehung von Cereulid objektiv – von der Rohware über die Lebensmittelverarbeitung bis hin zu Lebensmittelzubereitungen – zu verfolgen und risikobehaftete Lebensmittel sowie sensitive Prozessschritte **zuverlässig zu identifizieren**. Erstmalig ist es nun auch möglich, Lebensmittel anhand ihres Cereulid-Bildungspotentials in **drei Risikogruppen zu klassifizieren**. Zudem konnten Lebensmittelinhaltsstoffe/-zusatzstoffe identifiziert werden, die die Cereulid-Synthese hemmen – durch eine Modifizierung von Rezepturen ist damit eine **gezielte Prävention der Cereulid-Bildung auch für KMU** möglich.

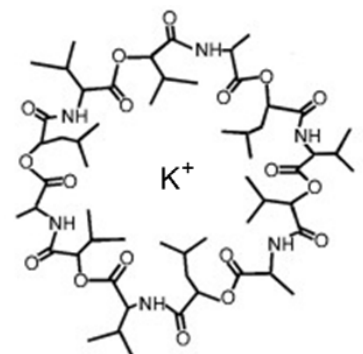
Die entwickelte SIDA-Schnellanalytik bildet die methodische Grundlage eines EU-Verfahrens zur Etablierung einer ISO-Methode, die voraussichtlich in naher Zukunft als **weltweit angewandter ISO-Standard zur Cereulid-Quantifizierung** in Lebensmitteln Anwendung finden wird.

Diese Ergebnisse der Industriellen Gemeinschaftsforschung sind ein Meilenstein: Lebensmittelunternehmen und Diagnostiklaboratorien werden analytische Werkzeuge zur Verfügung gestellt, die die **Lebensmittelsicherheit nachhaltig erhöhen**. Davon profitieren Verbraucher ebenso wie Unternehmen: Wirtschaftliche Schäden durch Produktionsstopps, Entsorgungsmaßnahmen oder gar Rückrufaktionen und Schadenersatzforderungen können präventiv abgewendet werden.

1. Ausgangssituation und Ziele des Projekts

Ob tierischen oder pflanzlichen Ursprungs, ob gekocht oder ungekocht, ob im Haushalt verarbeitet oder im Unternehmen hergestellt: Das Bodenbakterium *Bacillus cereus* ist nicht nur im Boden, sondern auch in nahezu allen Lebensmitteln allgegenwärtig. Auch bei sehr hohen Hygienestandards ist es nahezu unmöglich, eine Kontamination mit dem Bakterium zu vermeiden; Milchprodukte und Gewürze weisen mit bis zu 75 bzw. 100 % äußerst hohe Kontaminationsraten auf. Die Sporen des Keims überleben auch bei starker Hitze und bringen bei kühleren Temperaturen wieder vermehrungsfähige Bakterien hervor. Häufig bilden diese dann Bakteriengifte, die wiederum hitzestabil sind – wie das Toxin Cereulid.

Die **hohe Hitze- und Säurestabilität sowie die geringe Größe (1.2 kDa)** von Cereulid machen eine Entfernung durch z.B. Erhitzung oder Entkeimungsfiltration nahezu unmöglich, so dass das Toxin über den Konsum kontaminierter Lebensmittel in den Verdauungstrakt gelangt. In den letzten Jahren häufen sich Berichte über Cereulid-Intoxikationen: Die Aufnahme über ein kontaminiertes Lebensmittel führt typischerweise zum akuten Erbrechen (emetische Wirkung), kann jedoch auch schwerwiegende Erkrankungen hervorrufen, die in Einzelfällen sogar tödlich verlaufen können.



Cereulid, ein K⁺-bindendes cyclisches Dodecapeptid

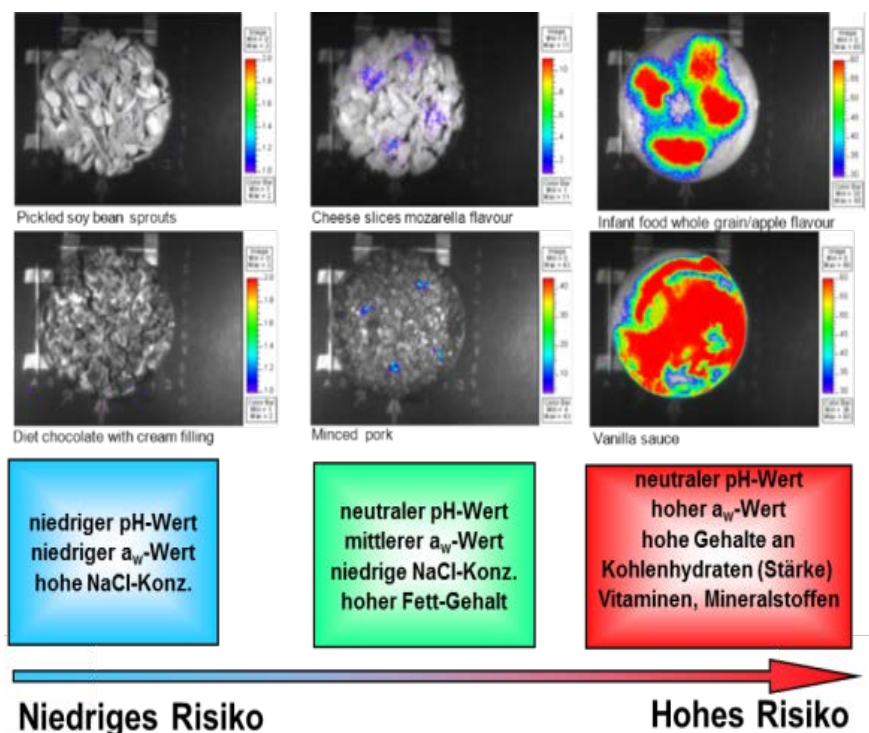
Laut der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) sind 2012 die Cereulid-Intoxikationen in Europa um 122 % im Vergleich zum Vorjahr angestiegen. Auch das Bundesinstitut für Risikobewertung hat *B. cereus* im Jahr 2012 als eine der häufigsten Ursachen von Lebensmittelintoxikationen registriert.

Der herkömmliche Nachweis des Toxins ist kosten- und zeitaufwändig und erlaubt keine direkte und exakte quantitative Messung des Toxingehalts in Lebensmitteln. Es bestand daher ein dringender Bedarf für die Lebensmittelindustrie, um bei Verdacht einer Kontamination mit *B. cereus* auf Basis exakter Messwerte rasch reagieren zu können sowie gezielte Präventionsstrategien zur Erhöhung der Produktsicherheit und zur Vermeidung hoher Folgekosten zu entwickeln.

2. Erkenntnisgewinn, Umsetzung in die Praxis und Einführung als ISO-Standardmethode

2.1. Identifizierung intoxikationsgefährdeter Lebensmittel und Entwicklung von Präventionsstrategien zur gezielten Hemmung der Toxinbildung

Zur Bewertung des Toxinbildungsvermögens von *B. cereus* in Lebensmitteln wurde ein hoch innovativer Weg gewählt: Es wurde ein aktiv leuchtender *B. cereus*-Stamm (*Lux-Reporter*) konstruiert, der es erstmals erlaubt, die Aktivität der Cereulid-Synthese durch eine ultrasensitive Kamera direkt im Lebensmittel zu messen (AiF 15186 N). So wurde nachgewiesen, dass die Cereulid-Bildung stark von den Matrixkomponenten der Lebensmittel abhängig ist. Dies ermöglichte eine Klassifizierung von Lebensmitteln in drei Risikogruppen (s. Abbildung).



Die extrem widerstandsfähigen *B. cereus*-Sporen können bei der Produktion einer Vielzahl von Lebensmitteln nicht gänzlich eliminiert werden. Deshalb wurden Maßnahmen zur Prävention der Toxinbildung entwickelt. Erstmals gelang die gezielte Hemmung der Cereulid-Biosynthese durch Lebensmittelinhaltsstoffe und marktübliche Zusatzstoffe (z.B. Polyphosphate). Durch Modifizierung von Rezepturen ist nun für mittelständische lebensmittelverarbeitende Unternehmen eine gezielte Prävention der Cereulid-Bildung möglich.

Deshalb wurden Maßnahmen zur Prävention der Toxinbildung entwickelt. Erstmals gelang die gezielte Hemmung der Cereulid-Biosynthese durch Lebensmittelinhaltsstoffe und marktübliche Zusatzstoffe (z.B. Polyphosphate). Durch Modifizierung von Rezepturen ist nun für mittelständische lebensmittelverarbeitende Unternehmen eine gezielte Prävention der Cereulid-Bildung möglich.

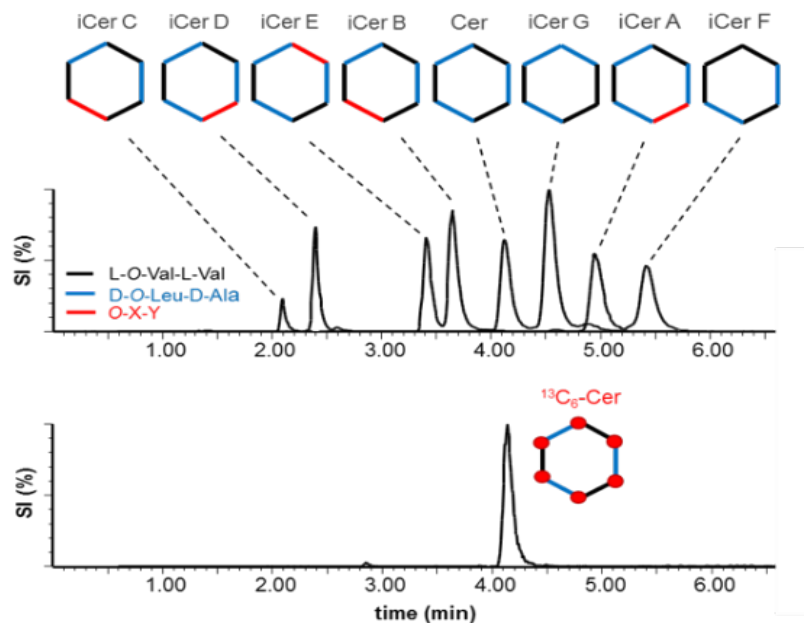
Der im IGF-Projekt AiF 16845 N weiterentwickelte Hochdurchsatz-Assay ermöglicht **innovative Vermeidungsstrategien zur Toxinbildung** – von der Rohware über die Lebensmittelverarbeitung bis hin zu Lebensmittelzubereitungen.

2.2 Entdeckung gefährlicher Cereulidvarianten und deren akkurate quantitative Bestimmung in der Praxis

Mittels Hochleistungsmassenspektrometrie konnte gezeigt werden, dass die Toxinbildung von *B. cereus* unerwartet komplex ist und nicht, wie bisher angenommen, auf Cereulid als das einzige Toxin beschränkt ist. So konnten insgesamt sieben Toxinvarianten (sog. Isocereulide) identifiziert und deren Struktur vollständig aufgeklärt werden (AiF 16845 N; s. *Abbildung*). Isocereulid A wies dabei sogar eine ca. 8-fach höhere Toxizität als Cereulid auf.

Um die Bedeutung *aller* Toxinvarianten für die Lebensmittelsicherheit bewerten zu können, wurde eine massenspektroskopische Methode zu deren Nachweis entwickelt. Durch Isotopenmarkierung gelang die Entwicklung und Validierung einer Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIDA) zur **routinetauglichen Quantifizierung** von (Iso)cereuliden direkt in Lebensmitteln.

Diese Methode wurde inzwischen bereits erfolgreich zur **Aufklärung von Lebensmittelintoxikationen** in zwei Kindergärten in Deutschland eingesetzt. Neben Cereulid wurde das toxischere Isocereulid A in zwei Nudelgerichten bestimmt – die hohen Gehalte überraschten. Damit kommt Isocereulid A eine ebenso bedeutende Rolle bei der Risikoabschätzung von Lebensmitteln zu wie dem Cereulid selbst.



2.3 Einführung als ISO-Standardmethode

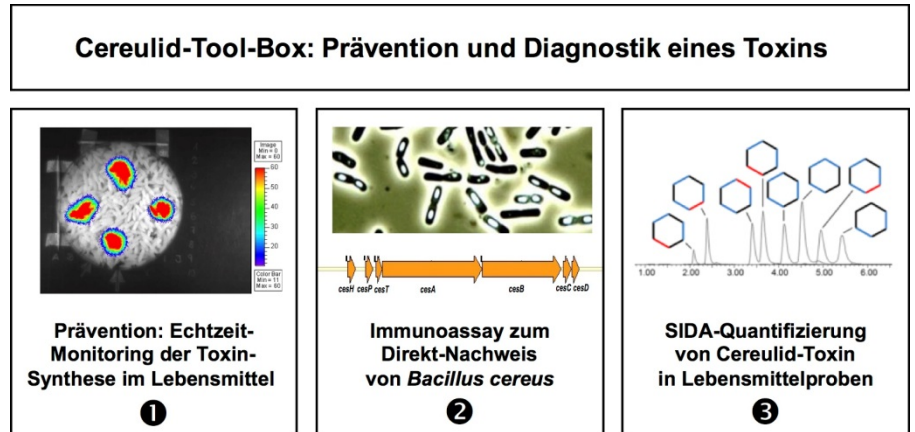
Die entwickelte SIDA-Schnellanalytik bildet die methodische Grundlage für das EU-Verfahren CEN/TC 275/WG 6 zur Erarbeitung einer entsprechenden ISO-Methode (EN/ISO/18465, in Vorbereitung), anhand derer Unternehmen künftig rasch **evidenzbasierte Entscheidungen bezüglich Produktfreigaben bzw. -sperren** treffen können. Es ist absehbar, dass sie in naher Zukunft **als weltweit angewandter ISO-Standard zur Cereulid-Quantifizierung in Lebensmitteln** Anwendung finden wird – ein wichtiger Meilenstein für die Erarbeitung belastbarer Grenzwerte für Cereulid-Toxine und deren Diagnostik (*siehe auch unter 3. Umsetzung in die betriebliche Praxis*).

2.4 Entdeckung eines neuen Biosynthesemechanismus für Cereulid und Isocereulide

Durch lebensmittelchemische und molekularbiologische Analysen wurden im IGF-Projekt AiF 16845 N erstmals auch Intermediate der Cereulid-Biosynthese aufgeklärt, die dem bisher vermuteten Synthesemechanismus widersprechen. Diese Kenntnisse wurden bereits zur gezielten Steigerung der Cereulid-Ausbeute bei dessen biofermentativer Herstellung genutzt; damit können analytische Referenzsubstanzen der Cereulidvarianten künftig wirtschaftlich hergestellt werden. Zudem wurde ein gegen die Cereulid-Synthetase gerichteter monoklonaler Antikörper hergestellt, der nun die Entwicklung von Immunoassays für den **diagnostischen Schnellnachweis von Cereulid-produzierenden Bakterienstämmen** in lebensmittelproduzierenden Unternehmen ermöglicht.

3. Umsetzung in die betriebliche Praxis

Im Rahmen des auf das Vorläuferprojekt AiF 15186 N unmittelbar aufbauenden IGF-Projekts AiF 16845 N wurde eine auf drei Säulen beruhende ‚Cereulid-Tool-Box‘ aus innovativen und leistungsstarken Methoden zur Diagnostik und zur Etablierung neuer Präventionsstrategien gegen emetische *B. cereus*-Toxine entwickelt (s. Abbildung).



Erstmals können damit risikobehaftete Lebensmittel sowie sensitive Prozessschritte zuverlässig identifiziert (①), Lebensmittel nach deren Cereulid-Gefährdungspotential klassifiziert (②) und Cereulid in Lebensmitteln direkt quantifiziert werden (③).

Die ‚Cereulid-Tool-Box‘ wird inzwischen von Unternehmen der verschiedensten Branchen der Lebensmittelindustrie nachgefragt und für entsprechende Auftragsuntersuchungen eingesetzt. Darüber hinaus gibt es zahlreiche Nachfragen aus der Futtermittel- und Pharmaindustrie sowie aus der humanmedizinischen Diagnostik. Bereits heute zeichnet sich ab, dass das **Marktpotential für die neu etablierten Methoden weit umfangreicher** ist, als zu Beginn der Forschungsvorhaben absehbar – und **deutlich über die Lebensmittelindustrie hinausreicht**.

Zudem ist mit dem neu generierten monoklonalen Antikörper (②) gegen die Cereulid-Synthetase die **Basis** zur Entwicklung ELISA-basierter Nachweissysteme bzw. von Biosensoren zur Abschätzung des emetischen Toxinbildungsvermögens einer *B. cereus*-Kontamination geschaffen worden. Solche Biosensorsysteme eröffnen Herstellern entsprechender Geräte **neue Geschäftsfelder** und ermöglichen Unternehmen, **schnell und kostengünstig Vor-Ort-Analysen** durchzuführen und aufwändige Außer-Haus-Untersuchungen zu reduzieren.

Bisher bestand in den USA z.B. eine Nulltoleranz für Cereulid in Lebensmitteln, weil die genaue Messung des Toxins nicht möglich war – dies ist in Anbetracht der stetig zunehmenden Sensitivität analytischer Methoden für die Industrie nicht umsetzbar. Die SIDA-Methode zur Quantifizierung von Cereulid ist deshalb ein **wichtiger Meilenstein** auf dem Weg zu einer rationalen Grenzwertsetzung. Sie wurde inzwischen bereits in diversen Ländern in Einrichtungen der Lebensmittelüberwachung implementiert, u.a. in den USA (FDA), in Belgien, Österreich (Magistrat der Stadt Wien) und der Schweiz (Kantonales Labor in Basel). Diese Nachweismethode (③) bildet die Grundlage für ein kurz vor dem Abschluss stehendes EU-Verfahren zur Etablierung der ISO-Methode EN/ISO/18465. Es ist daher zu erwarten, dass die aus dem IGF-Projekt hervorgegangene SIDA-Methode zur Quantifizierung von Cereulid in Lebensmitteln in naher Zukunft zum **weltweit angewandten ISO-Standard** wird.

Die hier entwickelte Cereulid-Analytik wird nach Inkrafttreten der ISO-Methode **rasch und kostengünstig auch für kleine und mittlere Unternehmen der Lebensmittelindustrie** verfügbar sein, da sie an bereits etablierte analytische Plattformen angepasst wurde. Hiervon profitieren auch jene Diagnostiklaboratorien, die als mittelständische Dienstleister der Lebensmittelbranche tätig sind.

Ebenso ist zu erwarten, dass die in der Endphase des Projekts entwickelte Methode zur gleichzeitigen quantitativen Bestimmung von Cereulid und Isocereuliden rasch Eingang in die Praxis finden wird, da sie auf dem gleichen Prinzip beruht wie die Methode zur Cereulid-Quantifizierung; wie unter 2.2 erläutert, wurde die Methode bereits zur Aufklärung zwei akuter Lebensmittelvergiftungsfälle eingesetzt. Ebenso kam sie kürzlich zur Anwendung, um den Einfluss verschiedener Parameter in der Lebensmittelproduktion auf die Cereulid- und Isocereulid-Bildung zu untersuchen.

Zudem konnten die neuen Erkenntnisse zum Mechanismus und zur Regulation der Cereulid-Biosynthese schon zur gezielten Steigerung der Cereulid-Ausbeute bei dessen biofermentativer Herstellung genutzt werden; damit können künftig analytische Referenzsubstanzen der Cereulid-Varianten wirtschaftlich hergestellt werden.

4. Wirtschaftlicher Nutzen

Die Forschungsergebnisse sind im Sinne des **vorbeugenden Verbraucherschutzes und der industriellen Qualitätssicherung** für die gesamte mittelständisch strukturierte Lebensmittelindustrie von erheblicher Bedeutung, sowohl für lebensmittelproduzierende Betriebe, als auch für ihre Zulieferer und für Hersteller von Lebensmittelzusatzstoffen. Über den durch *B. cereus* bundesweit entstehenden Schaden existieren keine gesicherten Zahlen – es ist jedoch von **zweistelligen Millionenbeträgen** pro Jahr auszugehen. In einem aktuellen Schadensfall, der kürzlich an Forschungsstelle 3 (ZIEL/TUM) analytisch bearbeitet wurde, mussten Produkte im Wert von über 100.000 Euro aus dem Handel zurückgezogen werden. Dazu kommt der finanziell kaum bezifferbare Imageschaden durch Beschwerden tausender Konsumenten. In einem anderen Fall sorgte Cereulid-kontaminierter Milchreis, der in Berlin als Ursache für die Erkrankung von 43 Kindern und 4 Erwachsenen identifiziert wurde, für geschäftsschädigende Schlagzeilen, woraufhin die Produktion bis auf Weiteres einem unnötig engmaschigen, aufwändigen Produkt-Monitoring unterworfen werden musste. Solche Interventionen führen zu weiteren Schäden, da die endgültigen Ergebnisse der herkömmlichen mikrobiologischen Untersuchungen **erst nach ca. 60 Stunden** verfügbar sind und die Kühllagerung bei verzögerter Auslieferung erhebliche Kosten verursacht. Gerade für kleine und mittelständische Unternehmen kann eine solche Kontamination durch rufschädigende Rückrufaktionen oder Schadensersatzforderungen eine **wirtschaftliche Tragweite haben, die existenzbedrohend** sein kann.

Die Anwendung der entwickelten und validierten SIDA-Methode zur schnellen und quantitativen Bestimmung von Cereulid in Lebensmitteln dauert hingegen **lediglich 45 Minuten von der Probe zum Ergebnis** – sie beschleunigt die Intervention in solchen Fällen massiv und führt zu **erheblichen Einsparungen**.

Seit Projektabschluss haben die Forschungsstellen dazu beigetragen, die Methode in einschlägigen Diagnostiklaboratorien zu implementieren. Viele dieser mittelständischen Dienstleistungsunternehmen verfügen bereits über eine LC/MS-basierte Mykotoxin-Analytik und können die entwickelte Cereulid-Methode direkt in ihr Portfolio integrieren, d.h. **ohne weitere Geräteinvestitionen** durchführen. Mit ihr verfügen die Unternehmen der Lebensmittelbranche erstmals über ein effizientes Werkzeug, um Kontaminationen mit Cereulid und Isocereuliden rasch und kostengünstig in ihren Rohstoffen und Produkten quantitativ zu erfassen.

5. Wirksame Maßnahmen zum Ergebnistransfer

Die Forschungsergebnisse und entwickelte Methoden wurden in zahlreichen **englisch- und deutschsprachigen Fachzeitschriften** (s. *Anhang A*) und auf **(inter)nationalen Tagungen** (s. *Anhang B*), in Jahresberichten (und Homepages) des FEI und der Forschungsstellen publiziert und **branchenweit bekannt gemacht**.

Einschlägigen Industrieunternehmen wurden die Ergebnisse auf **zahlreichen Fachkongressen und Seminaren** vorgestellt, so z.B.: Milchwirtschaftliche Herbsttagung (Freising), Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie (Tutzing, Stuttgart, Bremen), Arbeitstagung des Regionalverbandes Bayern der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Fachgruppe in der GDCh (Würzburg), American Chemical Society (Philadelphia), Waters User Meeting, American Society for Mass spectrometry (Denver), Congress of European Microbiologists FEMS (Genf, Leipzig), CEN mandate 'Cereulide' (Utrecht), International Conference on *Bacillus anthracis*, *B. cereus* and *B. thuringiensis* (Bruges), Food Safety Forum: Emerging Issues in Food Safety (Toronto), Austrian Proteomic Research Symposium (Graz), Waters – MS Technology Days (Stuttgart, Berlin), LVA- Pathogenentag (Wien), Symposium 'Schnellmethoden und Automatisierung in der Lebensmittel-Mikrobiologie' (Lippe-Lemgo), BACELL (Bratislava), International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins (Wien), DGHM-Jahrestagung (Münster) und FEI-Jahrestagung (Braunschweig).

Als **Multiplikatoren für den breitenwirksamen Ergebnistransfer** waren außer dem FEI des Weiteren folgende Fachverbände beteiligt: Milchindustrieverband (MIV), Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh), Federation of European Microbiological Societies (FEMS), American Society of Mass Spectrometry (ASMS) und American Chemical Society (ACS).