



3. Fachtagung „Gentechnik für Umwelt- und Verbraucherschutz“

**Fortbildungsveranstaltung
in Oberschleißheim am 2. Dezember 2009**

Gentechnik für Umwelt- und Verbraucherschutz

Herausgeber: Bayerisches Landesamt für
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
Eggenreuther Weg 43, 91058 Erlangen
Telefon: 09131 764-0
Telefax: 09131 764-102

Internet: www.lgl.bayern.de
E-Mail: poststelle@lgl.bayern.de

Fotos: Bayerisches Landesamt für
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit

Komplett Herstellung: Kaiser Medien GmbH, Nürnberg
Stand: Februar 2010

© Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, alle Rechte vorbehalten
Gedruckt auf Papier aus 100 % Altpapier

Autorinnen und Autoren des Berichts:
Alle Manuskripte sind namentlich gekennzeichnet.

Bei fachlichen Fragen wenden Sie sich bitte an:

Dr. Ulrich Busch
Telefon: 089 31560-234
E-Mail: ulrich.busch@lgl.bayern.de

| | | | |
|------------------------|---------------|------------------------|------------------|
| ISSN 1866-7767 | Druck Version | ISSN 1866-7775 | Internet Version |
| ISBN 978-3-942018-02-9 | Druck Version | ISBN 978-3-942018-03-6 | Internet Version |

Diese Druckschrift wird kostenlos im Rahmen der Öffentlichkeitsarbeit der Bayerischen Staatsregierung herausgegeben. Sie darf weder von den Parteien noch von Wahlwerbern oder Wahlhelfern im Zeitraum von fünf Monaten vor einer Wahl zum Zweck der Wahlwerbung verwendet werden. Dies gilt für Landtags-, Bundestags-, Kommunal- und Europawahlen. Missbräuchlich ist während dieser Zeit insbesondere die Verteilung auf Wahlveranstaltungen, an Informationsständen der Parteien sowie das Einlegen, Aufdrucken und Aufkleben parteipolitischer Informationen oder Werbemittel. Untersagt ist gleichfalls die Weitergabe an Dritte zum Zweck der Wahlwerbung. Auch ohne zeitlichen Bezug zu einer bevorstehenden Wahl darf die Druckschrift nicht in einer Weise verwendet werden, die als Parteinahme der Staatsregierung zugunsten einzelner politischer Gruppen verstanden werden könnte. Den Parteien ist es gestattet, die Druckschrift zur Unterrichtung ihrer eigenen Mitglieder zu verwenden. Bei publizistischer Verwertung - auch von Teilen - wird um Angabe der Quelle und Übersendung eines Belegexemplars erbeten. Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Alle Rechte sind vorbehalten. Die Broschüre wird kostenlos abgegeben, jede entgeltliche Weitergabe ist untersagt. Diese Broschüre wurde mit großer Sorgfalt zusammengestellt. Eine Gewähr für die Richtigkeit und Vollständigkeit kann dennoch nicht übernommen werden. Für die Inhalte fremder Internetangebote sind wir nicht verantwortlich.



BAYERN | DIREKT ist Ihr direkter Draht zur Bayerischen Staatsregierung.
Unter Tel. 089 122220 oder per E-Mail unter direkt@bayern.de erhalten Sie Informationsmaterial und Broschüren, Auskunft zu aktuellen Themen und Internetquellen sowie Hinweise zu Behörden, zuständigen Stellen und Ansprechpartnern bei der Bayerischen Staatsregierung.



3. Fachtagung Gentechnik

Fortbildungsveranstaltung für Lebensmittelchemikerinnen und Lebensmittelchemiker, Mikrobiologinnen und Mikrobiologen, Tierärztinnen und Tierärzte, Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter bei Gewerbeaufsicht und Arbeitssicherheit, Fachpersonal aus Wissenschaft, Behörden und Praxis



Oberschleißheim, 02. Dezember 2009

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| GRUßWORT ZUR ERÖFFNUNG DER FACHTAGUNG GENTECHNIK..... | 3 |
| GENTECHNIKGESETZ UND FORSCHUNG..... | 5 |
| AKTUELLES AUS DEM GENTECHNIKRECHT | 6 |
| EINSATZ VON TRANSGENEM MAIS (MON810) BEI MILCHKÜHEN | 12 |
| EINTRAGSPFADE UND DEGRADATION VON BT-PROTEIN IN LANDWIRTSCHAFTLICH GENUTZTEN BÖDEN..... | 23 |
| LABOR..... | 38 |
| LABORATORY BIORISK MANAGEMENT STANDARD CEN WORKSHOP AGREEMENT - CWA 15793 | 39 |
| DAS INTERDISZIPLINÄRE EXPERTENNETZWERK BIOLOGISCHE GEFAHRENLAGEN BUNDESDEUTSCHES LABORNETZWERK ZUR DIAGNOSTIK HOCHKONTAGIÖSER KRANKHEITEN . | 44 |
| NICHT ZUGELASSENE GVO – EINE HERAUSFORDERUNG FÜR AMTLICHE ÜBERWACHUNG | 50 |
| DIE ARBEIT DES NATIONALEN REFERENZLABORATORIUMS FÜR GENTECHNISCH VERÄNDERTE ORGANISMEN AM BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT ... | 57 |
| ANALYTIK I | 60 |
| ÜBERWACHUNG VON GENTECHNISCHEN ARBEITEN IN GESCHLOSSENEN SYSTEMEN: NACHWEIS VON VIRALEN KONTAMINATIONEN..... | 61 |
| ÜBERWACHUNG GENTECHNISCHER ARBEITEN IN GESCHLOSSENEN SYSTEMEN: PRÜFUNG DER REINHEIT UND IDENTIÄT..... | 69 |
| CHIPBASIERTES DURCHFLUSS-PCR-SYSTEM FÜR DIE MOBILE VOLLSTÄNDIGE NUKLEINSÄUREANALYTIK VON BIOLOGISCHEN GEFÄHRSTOFFEN | 78 |
| ANALYTIK II | 88 |
| SICHERHEITSFORSCHUNG BEI GENTECHNISCH VERÄNDERTEN PFLANZEN, VALIDIERUNG MOLEKULARER NACHWEISSYSTEMEN..... | 89 |
| NACHWEISSTRATEGIEN FÜR DIE DETEKTION NICHT ZUGELASSENER GVO | 105 |
| EIN PARALLELISIERTES ANALYSEFORMAT ZUR DIAGNOSTIK VON GVO MITTELS REAL-TIME PCR | 116 |

Grußwort zur Eröffnung der Fachtagung Gentechnik

**Dr. Andreas Zapf, Präsident des Landesamtes für Gesundheit und
Lebensmittelsicherheit**

Das Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) als die zentrale Fachbehörde des Freistaates Bayern auf dem Gebiet der Gentechnik veranstaltet regelmäßig die Fachtagung Gentechnik. Die beiden Schwerpunkte der diesjährigen Tagung sind Vorträge zur grünen Gentechnik einschließlich der Analytik von gentechnisch veränderten Lebens- und Futtermitteln und die analytische Überwachung gentechnischer Arbeiten einschließlich der Diagnostik im Bereich des Bioterrorismus.

Das LGL ist nach der Bayerischen Gentechnik Zuständigkeitsverordnung (ZustVGenT) für die Untersuchung und Entnahme von Proben im Zusammenhang mit der routinemäßigen Überwachung beim Vollzug des Gentechnikgesetzes (Saatgut und Überwachung gentechnischer Anlagen) zuständig. Eine weitere Schwerpunktaufgabe ist die Kontrolle der Kennzeichnung gentechnisch veränderter Lebens- und Futtermittel. Als eines der nationalen **Referenzlaboratorien** ist das LGL für die Unterstützung des Gemeinschaftsreferenzlabors (CRL) nach VO (EG) 1981/2006 der Kommission vom 22.12.2006 für gentechnisch veränderte Organismen benannt. Außerdem ist das LGL Mitglied im Europäischen Netzwerk für GVO Laboratorien (ENGL). Durch Mitarbeit in zahlreichen nationalen und internationalen Gremien, wie § 64 LFGB, § 28 b Gentechnikgesetz, UAM, DIN, VDI, CEN, EBSA und ENGL unterstützen wir die Vernetzung in Deutschland und Europa auf dem Gebiet der Gentechnik.

Nach 2005 und 2007 findet die Fachtagung bereits zum dritten Mal in Oberschleißheim statt. Mit dem Programm, beginnend mit dem Einführungsvortrag von Frau Heenes vom Bayerischen Staatsministerium für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Herrn Prof. Meyer von der Technischen Universität

München, Frau Gruber von der Landesanstalt für Landwirtschaft bis hin zum Leiter des nationalen Referenzlaboratoriums für gentechnisch veränderte Organismen Herrn PD Dr. Mankertz, am Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, zeigt das LGL seine engen Verbindungen zu wissenschaftlichen Institutionen und den anderen zuständigen Landes- und Bundesbehörden.

Das LGL nimmt auch die Gelegenheit wahr, zahlreiche eigene Projekte vorzustellen, die vom StMUG und dem Bund gefördert werden. Zu nennen sind Themen wie die Sicherheitsforschung bei gentechnisch veränderten Pflanzen, Nachweisstrategien bis hin zur Analytik von nicht zugelassenen GVO, das Labornetzwerk Bioterrorismus und die Überwachung von gentechnischen Arbeiten in geschlossenen Systemen.

Die aktuellen Fragen machen es erforderlich, dass das LGL seine vorhandene analytische Expertise auf dem Gebiet der Gentechnik auch auf Fragen wie der Risikobewertung von gentechnisch veränderten Organismen, der Risikokommunikation oder der allgemeinen Gentechnikfolgenabschätzung erweitert. Dieser Herausforderung stellen wir uns gerne, um unserer Verantwortung für den Gesundheitsschutz in Bayern gerecht zu werden.

Gentechnikgesetz und Forschung

Aktuelles aus dem Gentechnikrecht

Andrea Heenes, Referentin für Gentechnikrecht im Referat „Rechtsfragen des technischen Umweltschutzes und des Klimaschutzes“ des Bayerischen Staatsministeriums für Umwelt und Gesundheit, Rosenkavalierplatz 2, 81825 München

Einführung

Das deutsche und europäische Gentechnikrecht bestimmen den Umgang mit der Gentechnik in Deutschland, indem sie dafür den rechtlichen Rahmen setzen.

Das deutsche Gentechnikrecht wurde zuletzt im Jahr 2008 novelliert. Interessante Entwicklungsmöglichkeiten für die Zukunft ergeben sich darüber hinaus aus dem Koalitionsvertrag zwischen CDU, CSU und FDP vom 26.10.2009. Die wichtigsten Neuerungen sind:

- Bürokratieabbau bei der Forschung mit gentechnisch veränderten Organismen (GVO) in Anlagen
- Genaue Abstandsregelungen und andere gute fachliche Praxis beim Anbau von gentechnisch veränderten Pflanzen (GV-Pflanzen), wobei zukünftig die Abstandsregelungen in Länderverantwortung liegen sollen.
- Kennzeichnung von Produkten „Ohne Gentechnik“, wobei zukünftig eine Prozesskennzeichnung auf europäischer Ebene angestrebt wird

Zum europäischen Gentechnikrecht gibt es Signale aus Brüssel für eine gänzliche Neuerung im System: mit einer Rechtsänderung könnte zugelassen werden, dass Mitgliedstaaten nationale Anbauverbote verhängen dürfen, unabhängig von evtl. vorliegenden neuen Erkenntnissen über Gefahren von GV-Pflanzen.

Die Novellierung des Gentechnikrechts 2008¹

Bei der vierten Novellierung des deutschen Gentechnikrechts, die am 04.04.2008² in Kraft trat, wurden das Gentechnikgesetz und das EG-Gentechnik-Durchführungsgesetz geändert³. In der Folge wurden die Verordnungen zum Gentechnikrecht entsprechend angepasst und insbesondere eine neue Verordnung über die gute fachliche Praxis bei der Erzeugung gentechnisch veränderter Pflanzen (Gentechnik-Pflanzenerzeugungsverordnung) erlassen⁴.

Forschung und Entsorgung nicht zugelassener GVO

Für die Forschung in geschlossenen gentechnischen Anlagen bedeutet die Gesetzesänderungen einen Abbau von Bürokratie, ohne das Sicherheitsniveau zu senken: Anlagen der Sicherheitsstufe 1, bei denen nicht von einem Risiko auszugehen ist, unterliegen keinem Anmeldeverfahren mit einer Wartezeit von 45 Tagen mehr (§ 8 Abs. 2 GenTG). Der Betreiber kann mit Errichtung und Betrieb der gentechnischen Anlage bzw. den gentechnischen Arbeiten beginnen, nachdem er die Anlage bei der zuständigen Behörde angezeigt hat und alle sicherheitsrelevanten Unterlagen vorgelegt hat (§ 12 Abs. 5a i.V.m. Abs. 2 GenTG). Indem die Behörde gegen den sofortigen Beginn einschreiten kann, ist gewährleistet, dass das Anzeigeverfahren nicht zu einem Weniger an Sicherheit führt (§ 12 Abs. 5a Satz 2 GenTG). Dasselbe gilt für Folgearbeiten derselben Sicherheitsstufe in einer bereits angemeldeten Anlage der Sicherheitsstufe 2 (§ 9 Abs. 2 GenTG). Bei Freisetzungen ermöglicht die Novelle im Rahmen des einschlägigen EG-Rechts ein vereinfachtes Verfahren für gentechnisch veränderte Pflanzen, mit denen bereits genügend Erfahrungen gesammelt wurden (§ 11 Gentechnik-Verfahrensverordnung). Neu eingeführt wurde außerdem die Möglichkeit, Produkte, die nicht zum Inverkehrbringen zugelassene Organismen enthalten, in einer industriellen

¹ siehe insbesondere zum Gesetzgebungsverfahren: Burchardi: Die Novellierung des Gentechnikrechts, ZUR 2009, S. 9ff

² Die Änderungen zur „Ohne Gentechnik“-Kennzeichnung traten abweichend davon am 01.05.2008 in Kraft

³ Gesetzentwürfe: Bundesratsdrucksache 535/07 und 536/07 vom 10.8.2007; grundlegende Änderung mit „Ohne Gentechnik“ Kennzeichnung durch Bundestagsdrucksache 16/7868 vom 31.1.2008

⁴ BGBL. I S. 655 vom 10.04.2008

Verarbeitung oder thermischen Verwertung zu entsorgen (§ 26 Abs. 5 Satz 4 GenTG).

Anbau von zugelassenen GV-Pflanzen

Den Anbau von zugelassenen GV-Pflanzen hat die Novelle erstmals mit genauen Regeln zur Koexistenz von Gentechnik verwendender Landwirtschaft und ökologischer bzw. konventioneller Landwirtschaft ausgestaltet (sogenannte gute fachliche Praxis). Für die einzige bisher in der EU angebaute gentechnisch veränderte Pflanze, GV-Mais, legt die neue Gentechnik-Pflanzenerzeugungsverordnung Abstandsflächen zu benachbarten Flächen mit Maisanbau fest, um Auskreuzungen zu verhindern (150m zu konventionellen Flächen, 300 m zu ökologischem Anbau). Sorgfaltspflichten bei Ernte, Transport und Kontrolle von Pflanzendurchwuchs sowie Mitteilungspflichten gegenüber dem Nachbarn runden die gute fachliche Praxis ab, die ein Landwirt, der GV-Pflanzen anbaut, einhalten muss. In der Praxis stellte sich insbesondere die Frage, ob solche Sorgfaltspflichten auch der Nachbar eines Anbauers von GV-Pflanzen einhalten muss, wenn er auf die Einhaltung des Mindestabstands freiwillig verzichtet. Dies ist allerdings bereits wegen des klaren Wortlauts der Gentechnik-Pflanzenerzeugungsverordnung nicht der Fall, deren Pflichten sich nur an den Anbauer richten. Aufgrund des vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit erlassenen Anbauverbots für Mais der Linie MON 810 (sog. Ruhensanordnung) vom 17.04.2009 kommen derzeit die Vorschriften zur guten fachlichen Praxis in Deutschland allerdings zu keiner praktischen Anwendung.

Kennzeichnung „Ohne Gentechnik“ für Lebensmittel

Praktikabler ausgestaltet werden sollte mit der Novelle die Kennzeichnung „Ohne Gentechnik“ für Lebensmittel. Diese wurde in der Vergangenheit kaum genutzt, da unklar war, wie weit in das Vorfeld der Lebensmittelerzeugung, z.B. der Tierhaltung, sich die Kennzeichnung und die damit verbundenen Verpflichtungen erstrecken. Nunmehr darf die Kennzeichnung verwendet werden, wenn bei der Herstellung keine Lebensmittel oder Lebensmittelzutaten verwendet werden, die GVO enthalten oder aus GVO hergestellt sind (§ 3a EG-Gentechnik-Durchführungsgesetz). Dasselbe gilt für Verarbeitungshilfsstoffe, die durch GVO hergestellt sind, außer diese sind im

Rahmen der EG-Ökoverordnung zugelassen. Bei Lebensmitteln oder Lebensmittelzutaten tierischer Herkunft (z.B. Milch) dürfen die Tiere in einem bestimmten Zeitraum nicht mit als gentechnisch verändert gekennzeichnetem Futter gefüttert worden sein (§ 3a Abs. 4 EG-Gentechnik-Durchführungsgesetz). Konventionelles Futter und mit Hilfe von GVO hergestellte Tierarzneimittel oder Vitamine sollen aber weiter verwendet werden dürfen. Dies soll der Gesundheit der Tiere dienen, führte allerdings zu Kritik an der Regelung. In der Praxis wird von der Kennzeichnung weiter eher selten Gebrauch gemacht. Um die Kennzeichnung zu erleichtern und die Produkte für Verbraucher einfacher erkennbar zu machen, hat das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz im August 2009 ein einheitliches Logo eingeführt, das von interessierten Herstellern unentgeltlich genutzt werden kann.

Zukünftige Änderungen angekündigt im Koalitionsvertrag vom 26.10.2009⁵

Der Koalitionsvertrag zwischen CDU, CSU und FDP sieht weitere Neuerungen für die Zukunft vor.

Abstandsflächen sollen künftig innerhalb eines bundeseinheitlichen Rahmens von Kriterien eigenständig von den Bundesländern festgelegt werden können. Dazu muss das geltende Recht geändert werden.

Auch soll im Gentechnikgesetz und dem EG-Gentechnikdurchführungsgesetz eine Ermächtigung geschaffen werden, um offizielle Probenahme- und Nachweismethoden festzulegen. Damit soll eine praktikable Anwendung der im EU-Recht festgelegten Nulltoleranz für nicht in der EU zugelassene GVO ermöglicht werden.

Auf europäischer Ebene will sich die Koalition für eine Positivkennzeichnung im Sinne einer Prozesskennzeichnung einsetzen. Ziel ist eine größere Transparenz für den Verbraucher. Eine solche Kennzeichnung würde sich auf die einzelnen Schritte bei der Herstellung eines Lebensmittels vom Rohstoff bis zum Endprodukt beziehen - diese würden auf gentechnische Veränderungen durch GVO überprüft.

⁵ <http://www.cdu.de/portal2009/29145.htm>

Außerdem plädiert die Koalition für eine stärkere Wissenschaftsorientierung und effiziente Zulassungsverfahren von GVO auf EU-Ebene.

Möglichkeit der Einführung nationaler Anbauverbote auf europäischer Ebene

Nach geltender EU-Rechtslage dürfen Mitgliedstaaten den Anbau von zum Anbau in der EU zugelassenen GV-Pflanzen nicht verbieten, einschränken oder behindern (Art. 22 der EG-Freisetzungsrichtlinie 2001/18/EG). Nationale Anbauverbote z.B. wegen einer Ablehnung der Gentechnik in der Bevölkerung, sind daher nicht EG-rechtskonform. Auch sogenannte „gentechnikfreie Zonen“ sind deswegen nur als freiwillige Zusammenschlüsse möglich.

Einzigste Ausnahme von diesem Behinderungsverbot ist die sogenannte Schutzklausel in Gestalt von Art. 23 der Freisetzungsrichtlinie. Danach kann ein Mitgliedstaat den Anbau einer bestimmten Pflanze vorübergehend verbieten, wenn aufgrund neuer wissenschaftlicher Erkenntnisse über die fragliche Pflanze Grund zu der Annahme besteht, dass sie eine Gefahr für die menschliche Gesundheit oder Umwelt darstellt. Aufgrund dieser Regelung hat das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit das derzeit in Deutschland geltende Anbauverbot für Mais der Linie MON 810 erlassen.

EU-Kommissionspräsident Barroso hat nunmehr in seinen „Leitlinien für die nächste Kommission“⁶ in Aussicht gestellt, „den Mitgliedstaaten die Freiheit der Entscheidung zu lassen, ob sie in ihrem Hoheitsgebiet gentechnisch veränderte Pflanzen anbauen möchten oder nicht“. Die Kommission reagiert damit auf zunehmenden politischen Druck aus den Mitgliedstaaten. Es bleibt abzuwarten, ob und unter welchen Voraussetzungen solche nationale Anbauverbote ermöglicht werden. Für Deutschland würde sich dann die Folgefrage stellen, ob die Entscheidungsbefugnis auf die Bundesländer übertragen werden kann bzw. soll.

⁶ http://ec.europa.eu/commission_barroso/president/pdf/press_20090903_DE.pdf

Fazit

Die vierte Novelle des Gentechnikrechts hat das deutsche Recht mit Präzisierungen zur guten fachlichen Praxis beim Anbau von GV-Pflanzen und Bürokratierleichterungen bei der Anlagenzulassung für die Praxis griffiger gestaltet. Eine große inhaltliche Änderung im Sinne einer Neuorientierung war damit nicht verbunden. Es bleibt aber abzuwarten, ob sich solche inhaltlichen Reformen nicht in naher Zukunft durch Entwicklungen auf europäischer Ebene hin zu einer möglichen Erlaubnis nationaler Anbauverbote oder einer Prozesskennzeichnung ergeben.

Einsatz von transgenem Mais (MON810) bei Milchkühen

Heinrich H.D. Meyer¹, Hubert Spiekers², Frieder Schwarz³, Patrick Guertler¹,
Vijay Paul¹, Kerstin Steinke^{2,3}, Wolfgang Preißinger², Christiane Albrecht^{1,4},
Steffi Wiedemann¹

¹ Lehrstuhl für Physiologie, Wissenschaftszentrum Weihenstephan, TUM

² Institut für Tierernährung, Bayr. Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Grub

³ Lehrstuhl für Tierernährung, Wissenschaftszentrum Weihenstephan, TUM

⁴ aktuelle Adresse: Institut für Biochemie und Molekulare Medizin, Universität
Bern

Korrespondenz an

Prof. Dr. Heinrich H.D. Meyer
Lehrstuhl für Physiologie
Technische Universität München
Weihenstephaner Berg 3
85354 Freising/Germany
physio@wzw.tum.de
<http://www.wzw.tum.de/fml/physio/>

Einleitung und Ausgangssituation

Bis 2004 waren in der wissenschaftlichen Primärliteratur nur Kurzzeitstudien über wenige Wochen bzw. wenige Monate zum Einsatz von gentechnisch verändertem Mais MON810 bekannt. Es bestand grundsätzlicher Klärungsbedarf, ob bei einer langfristigen Fütterung Auswirkungen bei Lebensmittel liefernden Tieren auftreten können.

Die vergleichenden Studien, die als Originalarbeiten in referierten Journalen publiziert waren, bezogen sich vorrangig auf die Prüfung der Nährstoffäquivalenz und auf Leistungsdaten, wie Milchproduktion oder Wachstum, sowie auf die Tiergesundheit. Bezüglich des Abbaus transgener Komponenten stand die

rekombinante DNA im Vordergrund, und es zeigte sich, dass beim Abbau nicht transgener DNA-Bereiche und rekombinanter DNA keine Unterschiede bestehen. Demgegenüber existierten weniger solide Daten zum Abbau des Cry1Ab-Proteins, dem Protein, das als Fraßschutz gegen den Maiszünsler in den Zellen des transgenen Mais direkt produziert wird. Mais der Sorte MON810 ist resistent gegen den Maiszünsler. Dies wurde durch die Integration des *cry1Ab*-Gens in das Maisgenom erreicht, was die Maispflanze dazu befähigt, das insektizid wirkende Cry1Ab-Protein zu produzieren.

Das aktive Cry1Ab-Protein bindet an Rezeptoren auf dem Mikrovillisaum des Darmepithels der Maiszünslerlarven. Das Cry1Ab-Protein perforiert die Epithelmembran und infolge eines erhöhten Kationenaustausches zwischen Darminhalt und Epithelzellen kommt es zu einem gestörten elektrischen Potential und einer Beeinträchtigung des Ionen- und pH-Gradienten. Die Epithelzellen quellen bis zum Platzen durch den erhöhten osmotischen Druck. Der Darminhalt gelangt in die Hämolymphe und die Larve verendet nach wenigen Stunden.

In Maiszünsler-Befallsregionen, zu denen auch niedrig liegende Maisanbaugebiete Bayerns gehören, kann der Anbau von Mais der Sorte MON810 den Einsatz klassischer Insektizide vermeiden.

Ziele der Studie

- Anbau, Produktion und Konservierung von isogenem und transgenem Mais mit äquivalenter Qualität
- Untersuchungen zu den langfristigen Auswirkungen des Einsatzes von gentechnisch verändertem Mais in der Milchviehfütterung
- Erfassung von Milchleistungsparametern, Stoffwechsel und Tiergesundheit
- Aufbau einer validen hoch-sensitiven Analytik für alle transgenen Komponenten gemäß der Kriterien der EU Kommissions Richtlinie 2002/657/EC
- Erfassung der Metabolisierung der „rekombinanten DNA“ und des „Cry1Ab-Proteins“
- Vergleichende Bewertung der produzierten Milch

Ein besonderer Schwerpunkt der Analytik sollte auf die Verbesserung der Nachweisgrenze aller rekombinanten Komponenten sowie auf die Zuverlässigkeit der Methodik gelegt werden.

Maisanbau und -konservierung

Der Anbau der isogenen Maislinie sowie der korrespondierenden transgenen Maislinie und die Futterkonservierung – mit der gesamten dazugehörigen Qualitätssicherung – erfolgte unter der Leitung der fachkundigen Wissenschaftler der Bayr. LfL an verschiedenen Standorten in Bayern. Dabei wurde beachtet, dass die Bedingungen für die Pflanzenentwicklung, wie Aussaat, Boden, Nährstoffversorgung, Erntezeitpunkt etc, für beide Maislinien jeweils äquivalent waren, um Ernten und Futter gleicher Qualität zu erhalten. Die Belastungen mit Mykotoxinen lagen unter den empfohlenen Orientierungswerten. Die Konservierung erfolgte als Silage, Miscobs und Körnermais.

Die eingesetzten Maisprodukte unterschieden sich ausschließlich im Vorhandensein bzw. Fehlen von Cry1Ab-Protein und der *cry1Ab*-DNA. Während der Silierung wurden Cry1Ab-Protein und *cry1Ab*-DNA stark abgebaut und der Eintrag transgener Komponenten in das Futter erfolgte zu einem wesentlichen Teil über Miscobs.

25-monatige Fütterungsstudie mit Milchkühen

Die Studie wurde mit 36 Milchkühen der Rasse bayrisches Fleckvieh an der LfL, Versuchsstation Grub, durchgeführt. Die Einteilung in zwei Gruppen erfolgte unter Berücksichtigung gleichen Alters, gleicher Milchleistung und guter Gesundheit.

Im Versuch wurden im Prinzip 2 Betriebe mit je 18 Kühen verglichen – das experimentelle Prozedere erfolgte unter gleichen Bedingungen, nur der Genotyp des Mais (iso- bzw. transgen) war unterschiedlich. Wegen Krankheit oder Unfruchtbarkeit abgehende Tiere wurden durch Jungkühe ersetzt. In beiden Gruppen wurden je 9 Tiere in den 25 Monaten ausgetauscht. In der Gesamtauswertung wurden jedoch alle Tiere und alle Datensätze berücksichtigt.

Fütterung und Nährstoffäquivalenz

Beginnend im Mai 2005 wurden die 36 Kühe mit Rationen mit maximal sinnvollem Anteil maisbasierter Futtermittel bedarfsgemäß gefüttert. Neben Strukturträgern (Grassilage, Stroh), Eiweißträgern plus Mineralfutter in gleicher Weise für alle Tiere, erhielten 18 Tiere ausschließlich isogenen Mais, und 18 Tiere erhielten nur transgenen Mais des Typs MON810. In Abhängigkeit vom Laktationsstadium wurden die Rationen bedarfsgemäß zusammen gestellt und der Maisanteil des Futters lieferte im Mittel etwa 2/3 der Gesamtenergie. Es wurde sichergestellt, dass beide Gruppen mit Futter gleicher Energie sowie auch sonst gleicher Qualität und Zusammensetzung versorgt wurden. Die Überprüfung von rekombinanter DNA und Cry1Ab-Protein in den Ausgangsfuttermitteln sowie in den Mischrationen bestätigte durchgehend die korrekte Handhabung der Futtermittel, und gewährleistete, dass nach allen Vermahlungen und Mischungserstellungen die jeweiligen Gruppen auch mit dem vorgesehenen Futter versorgt wurden. Bei einer durchschnittlichen täglichen Futteraufnahme von ca. 16 kg Trockenmasse an Grundration wurden von den Kühen der Gruppe, die mit transgenem Mais gefüttert wurde, täglich ca. 5,3 mg Cry1Ab-Protein aufgenommen – hinzu kamen kleinere Mengen aus dem bedarfsgemäß gefütterten Leistungsfutter.

Während der Fütterungsperiode von insgesamt 25 Monaten wurden monatlich Proben von Blut, Milch und Exkreten sowie vom jeweiligen Futter genommen. Von den gemerzten Tieren, so wie am Ende der Studie von den geschlachteten Kühen, wurden zusätzlich Proben vom Magen-Darm-Trakt und von den inneren Organen gezogen.

Milchleistung

Über die gesamte Versuchszeit betrug die Milchleistung ohne die nicht erfasste Biestmilch 7.420 kg Milch je Kuh und Jahr in der isogen gefütterten Gruppe und 7.460 kg in der mit transgenen Maisprodukten gefütterten Gruppe.

In Zusammenschau mit der aufgeführten wissenschaftlichen Literatur ist festzuhalten, dass der Einsatz von Bt-Mais bei Gewährleistung gleicher Maisqualitäten zu keinen Differenzen in der Futteraufnahme und der tierischen Leistung führt. Die angenommene substantielle Äquivalenz ist aus dieser Sicht somit als gegeben zu erachten.

Dies zeigte sich neben der Futteraufnahme und Milchleistung auch in den Daten zur Lebendmasse und zur Körperkondition. Niveau und Entwicklung waren vergleichbar für beide Tiergruppen. Die Tiere hatten eine für Fleckviehkühe passende Körperkondition und Rückenfettdicke. Insgesamt waren die Tiere beider Gruppen energetisch gut versorgt.

Stoffwechselformparameter, Tiergesundheit und Fruchtbarkeit

Im Versuch lag ein Hauptaugenmerk auf der Erfassung eventueller Beeinträchtigungen von Gesundheit und Fruchtbarkeit durch die Verfütterung von Bt-Mais. Neben der Erfassung von Krankheitsdaten erfolgte daher eine intensive Untersuchung des Stoffwechselgeschehens über Untersuchungen in Blutplasma und Harn. Zur Beurteilung der Fruchtbarkeit wurden ergänzend die Gehalte an Progesteron in der Milch ermittelt.

Die zu prüfende Ausgangshypothese des Versuchs war, dass Bt-Mais über das Cry1Ab-Protein auf das Stoffwechselgeschehen und die Gesundheit einwirken kann. Unter den im Versuch vorliegenden Bedingungen war eine Beeinträchtigung von Stoffwechselgeschehen, Gesundheit und Fruchtbarkeit nicht ersichtlich. Es bestehen keine Hinweise auf Änderungen der Funktionen wesentlicher Organe, wie Magen-Darm-Trakt, Leber, Niere, Milchdrüse etc. Bezüglich der Häufigkeit von Einzelerkrankungen und der Fruchtbarkeit ergaben sich keine signifikanten Veränderungen; hier ist die beschränkte Aussage auf Grund der Tierzahlen zu beachten. Die Versorgung mit Makro- und Mikronährstoffen war bei beiden Tiergruppen als gut balanciert zu erachten.

Fazit der 25-monatigen Fütterungsstudie mit Milchkühen

Mit dem vorliegenden Fütterungsversuch ist es gelungen, langfristig hohe Mengen an Bt-Mais unter vergleichbaren Bedingungen an gut leistende Milchkühe einzusetzen.

Durch den Einsatz von Maiscobts und Maiskörnern in Ergänzung zur Maissilage war eine hohe Aufnahme an Cry1Ab-Protein und *cry1Ab*-DNA gewährleistet. Etwaige Beeinträchtigungen im Bereich der Futteraufnahme, der Milchleistung, des Stoffwechselgeschehens, der Gesundheit und der Fruchtbarkeit hätten sich somit zeigen können.

Trotz der relativ hohen Aufnahme an Cry1Ab-Protein waren Veränderungen in der Bt-Maisgruppe unter den gewählten Bedingungen nicht ersichtlich.

Die Tiere zeigten insgesamt eine gute Leistung, waren energetisch ausgefüttert und stoffwechselstabil. Auf Grund der beschränkten Tierzahl und dem erforderlichen Tieraustausch über die gewählte lange Versuchsdauer ergeben sich teils Unterschiede in den Leistungsdaten, die aus den kaum vermeidbaren Unterschieden zwischen Tiergruppen und der normalen Streuung im Versuch erklärbar sind. Für die eigentliche Versuchsfrage der Beeinträchtigung von Leistung, Gesundheit und Stoffwechsel sind diese jedoch von geringer Relevanz.

Der Versuch liefert einen guten Ansatz zur Beurteilung eines eventuellen Übergangs von Cry1Ab-Protein und *cry1Ab*-DNA in Milch sowie den Exkrementen, da über lange Zeit hohe Mengen mit dem Bt-Mais verfüttert werden konnten. Die Tiere wurden im Versuch gezielt nach Empfehlung versorgt. Wie sich eventuelle Stresssituationen, die über die aufgetretenen Erkrankungen hinausgehen oder sich durch massive Fehlversorgung ergeben, auswirken würden, kann anhand der vorliegenden Daten nicht beurteilt werden.

Insgesamt passen sich die Daten gut in die bisherige Literatur ein. Für Bt-Mais MON810 wird die Hypothese der substanziellen Äquivalenz bestätigt. Nach umfangreicher Datenanalyse ergeben sich bislang keine Hinweise auf maßgebliche Unterschiede in Futtermittelverwertung, Milchleistung und Tiergesundheit.

Neue Entwicklungen in der Analytik

In früheren Fütterungsstudien lag der Schwerpunkt der Analytik auf der Erfassung der rekombinanten DNA. Ergänzend sollte in dieser Studie die Analytik für das Cry1Ab-Protein aufgebaut werden. Weitere Schwerpunkte sollten auf die Validierung der Quantifizierungen sowie auf die Verbesserung der Nachweisgrenze und die Zuverlässigkeit der Methodik gelegt werden.

Entwicklung und Validierung sensitiver Verfahren für cry1Ab-DNA

Für Futtermittel, Blut, Exkrete und Milch wurden spezielle DNA-Extraktionsverfahren entwickelt. Hier ist zu betonen, dass die DNA-Isolierung jeweils aus dem Gesamtmaterial – also auch aus Vollmilch – erfolgte, um Verluste bei einer Vorfraktionierung zu vermeiden. Die quantitative Bestimmung der *cry1Ab*-DNA wurde mittels hoch-spezifischer sensitiver real-time qPCR durchgeführt. Die Gehaltsbestimmung erfolgte anhand von Eichkurven, die regelmäßige Identifizierung der Amplifikate über deren Schmelzkurven. Die Spezifität wurde weiterhin durch Gel-Elektrophorese und Resequenzierung der Amplicons gezeigt. Für Milch wurde eine zuverlässige Bestimmungsgrenze von 100 Kopien pro Mikroliter erreicht. Aus der bisherigen Literatur sind uns derart sensitive Bestimmungsgrenzen nicht bekannt.

Entwicklung und Validierung sensitiver Verfahren für Cry1Ab-Protein

Vor Beginn dieser Studie war uns aus der Literatur kein Immunoassay zur Detektion immunoaktiver Fragmente des Cry1Ab-Proteins in tierischen Geweben oder Flüssigkeiten bekannt, der nach den Kriterien der EU Kommissions Richtlinie 2002/657/EC validiert war.

Da gegenwärtig mit Immunoassays die besten Sensitivitäten für einzelne Proteine erreicht werden können, wurde ein sensitiver ELISA für die Detektion von Cry1Ab-Protein entwickelt und gemäß der Richtlinie validiert. Ein spezifischer Antikörper gegen das Cry1Ab-Protein wurde in Kaninchen generiert und maturiert. Mittels einer eigens entwickelten Immuno-Affinitäts-Chromatographie konnte nach Vorreinigung bei hoher Stringenz ein hoch-affiner sehr spezifischer Antikörper isoliert werden – als wesentliches Schlüsselreagenz für einen neuen ELISA mit einer absoluten Nachweisgrenze von 16 Attomol Cry1Ab-Protein.

Der unterste Messbereich dieses Assays in komplexen Matrices liegt bei Futtermitteln, Exkreten und Blut im unteren ppb-Bereich (Nanogramm pro Gramm) und für Milch war der Test noch um eine Größenordnung sensitiver mit Werten unterhalb des ppb-Bereiches. Der CC α betrug 0,25 ng/mL und der CC β lag bei 0,4 ng/mL Milch. Die Wiederfindungsrate für Cry1Ab-Protein betrug durchschnittlich 97%.

Definitionen gemäß EU Kommissions Richtlinie 2002/657/EC:

- (1) CC α = decision limit = Entscheidungsgrenze
- (2) CC β = detection capability = Nachweisvermögen (Bestimmungsgrenze)

Metabolisierung von rekombinanter DNA und Cry1Ab-Protein in der Milchkuh

In allen Futtermittelproben der mit transgenem Mais erstellten Rationen wurde *cry1Ab*-DNA und Cry1Ab-Protein nachgewiesen und in geringerer Konzentration in den entsprechenden Fäcesproben. Untersuchungen mittels „western-blot“ von Proben des Darminhalts geschlachteter Kühe sowie von Fäcesproben zeigten, dass beim Abbau von Cry1Ab-Protein ein Fragment etwa des halben Molekulargewichtes als Zwischenprodukt auftritt.

Nach Verfütterung von MON810-Mais ergaben sich aus der Analyse von keiner der insgesamt 450 Blutproben Hinweise auf den Transfer von *cry1Ab*-DNA oder Cry1Ab-Protein in das Blut bzw. in den Organismus der Kuh.

In fast allen Urinproben waren *cry1Ab*-DNA und Cry1Ab-Protein ebenfalls nicht nachweisbar; einige wenige schwach positive Befunde im Urin sind durch Kontamination mit Kot bei der Probennahme erklärbar.

Befunde zum Lebensmittel Milch

Aus der Untersuchung der insgesamt 900 Milchproben beider Gruppen ergaben sich keine Hinweise auf den Transfer von *cry1Ab*-DNA oder Cry1Ab-Protein in die Milch. Milch von Kühen nach Verfütterung von isogenem Mais oder transgenem Mais ist zu keinem Zeitpunkt unterscheidbar – auch nicht mit der gegenwärtig besten Technologie.

Geschwindigkeit des Cry1Ab-Protein Abbaus bei der Verdauung in der Milchkuh

In einer kleinen separaten Studie wurde die Konzentration bzw. die Verdaulichkeit des Cry1Ab-Proteins im Vergleich zum Gesamtprotein erfasst. Die Untersuchungen zeigten, dass der Anteil des Cry1Ab-Proteins im Futter am höchsten (9,4 Mikrogramm Cry1Ab-Protein pro Gramm Gesamtprotein der Mischration) und in den Fäcesproben der Anteil etwa halbiert war (4,2 Mikrogramm Cry1Ab-Protein pro Gramm unverdautes Gesamtprotein).

Resümee und Schlussfolgerungen

In dieser Studie wurden von den 36 Tieren insgesamt ca. 30 000 Einzelbefunde zu den Themenkomplexen Fütterung, Nährstoffäquivalenz, Milchleistung, Stoffwechsel, Tiergesundheit und Fruchtbarkeit erhoben. Hinzu kommen ca. 8 000 Einzelbefunde zu den Themenkomplexen Metabolisierung von *cry1Ab*-DNA und Cry1Ab-Protein. Die Bewertungen von MON810 basieren somit auf der Gegenüberstellung von jeweils ca. 19 000 Einzelbefunden, die pro Fütterungsgruppe erhoben wurden.

Die Analytik zur Metabolisierung von *cry1Ab*-DNA und Cry1Ab-Protein wurde wesentlich verbessert bzw. völlig neu entwickelt und in hochrangigen, streng referierten wissenschaftlichen Journalen publiziert. Die Qualität der Daten ist damit als außerordentlich solide zu erachten.

Nach 25-monatigem Einsatz in der Milchviehfütterung ergibt sich eine Äquivalenz des Futterwertes von isogenem Mais und transgenem Mais des Typs MON810. Stoffwechsel, Tiergesundheit und Leistung sind nicht beeinflusst.

Die Bewertungen der Cry1Ab-Protein Metabolisierung kennzeichnen keine spezifische Persistenz sondern eine schnelle Abbaubarkeit im Verdauungssystem analog zu anderen Proteinen. Der Anteil an unverdaulichem Gesamtprotein ist eher höher als der Anteil an unverdaulichem Cry1Ab-Protein.

Auch bei hoher Beprobungsintensität und extrem sensitiver Nachweisgrenze bis in den ppt-Bereich (Picogramm pro Milliliter) existieren keinerlei Hinweise auf einen Transfer transgener Komponenten in das Lebensmittel Milch. Milch von Kühen nach Verfütterung von isogenem Mais oder transgenem Mais ist zu keinem Zeitpunkt unterscheidbar.

Acknowledgement

Gefördert wurde das Vorhaben durch die Bayrische Milchwirtschaft und das Bayrische Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten.

Die beteiligten Mitarbeiter, Bachelor- und Masterstudenten, Praktikanten, Gäste und Diplomanden an der TUM und an der LfL haben dieses Projekt stets mit großem Interesse sachlich und fachlich begleitet, engagiert diskutiert und mit zum Erfolg geführt. Die Ergebnisse wurden auf etlichen wissenschaftlichen Veranstaltungen im In- und Ausland präsentiert und von Kollegen mit Ideen bereichert. Bei Allen, die zum Gelingen des Projektes beigetragen haben, bedanken wir uns sehr.

Referenzen

Steinke K., Gürtler P., Paul V., Wiedemann S., Etle T., Albrecht C., Meyer H.H.D., Spiekers H., Schwarz F.J.: Effects of long-term feeding of genetically modified corn (event MON810) on the performance of lactating dairy cows. (2009) submitted to Journal of Animal Physiology and Nutrition

Guertler P., Paul V., Albrecht C., Meyer H.H.D.: Sensitive and highly specific quantitative real-time PCR and ELISA for recording a potential transfer of novel DNA and Cry1Ab protein from feed into bovine milk. Analytical and Bioanalytical Chemistry 393 (2009) 1629-1638

Paul V., Steinke K., Meyer H.H.D.: Development and validation of a sensitive enzyme immunoassay for surveillance of Cry1Ab toxin in bovine blood plasma of cows fed Bt-maize (MON810). Analytica Chimica Acta 607 (2008) 106-113

Guertler P., Paul V., Steinke K., Wiedemann S., Preißinger W., Albrecht C., Spiekers H., Schwarz F.J., Meyer H.H.D.: Long-term feeding of genetically modified corn (MON810) – fate of *cry1Ab* DNA and recombinant protein during the metabolism of the dairy cow (2009) Manuscript, submitted to Livestock Science

Paul V., Guertler P., Wiedemann S., Meyer H.H.D.: Degradation of cry1Ab protein from genetically modified maize (MON810) in relation to total protein in dairy cow digestion (2009) Transgenic Research, online-version DOI 10.1007/s11248-009-9339-z

Eintragungspfade und Degradation von Bt-Protein in landwirtschaftlich genutzten Böden

Helga Gruber^{1,2}, Vijay Paul², Hubert Spiekers³, Heinrich H.D. Meyer², Martin Müller¹

¹Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Freising

²Lehrstuhl für Physiologie der Technischen Universität München, Freising-Weihenstephan

³Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Tierernährung und Futterwirtschaft, Poing-Grub

Zusammenfassung

Das insektizid wirkende Cry1Ab-Protein aus Bt-Mais gelangt in landwirtschaftlichen Praxisabläufen auf direktem Weg über Ernterückstände oder auf indirektem Weg über die Ausbringung von Gülle Bt-Mais-gefütterter Rinder in den Boden. Um den Abbau des Cry1Ab-Proteins auf diesen zwei Eintragungspfaden zu verfolgen, wurde Cry1Ab-Protein in Mais-Pflanzenmaterial, Gülle, Boden und Mais-Aufwuchs nach Daueranbau von Bt-Mais (MON810) sowie nach Güllegewinnung und -ausbringung aus Bt-Mais-Fütterung von Milchkühen untersucht. Die Analyse der Cry1Ab-Protein-Konzentrationen in den verschiedenen Probenmaterialien erfolgte mittels validiertem ELISA unter Einsatz von polyklonalen Anti-Cry1Ab-Antikörpern. In der Gülle Bt-Mais gefütterter Kühe nahmen die Cry1Ab-Protein-Gehalte während 25-wöchiger Lagerung von anfänglich 21 ng pro Gramm Gülle auf 51 % des Ausgangsgehaltes ab. Im Anschluss war weder im Boden noch im Mais-Aufwuchs von mit Cry1Ab-haltiger Gülle behandelten Kleinparzellen Cry1Ab-Protein messbar. In Bodenproben von vier verschiedenen Versuchsstandorten wurde zum Zeitpunkt vor der Aussaat nach sieben Jahren Bt-Mais-Daueranbau kein Bt-Protein nachgewiesen, wobei die Entscheidungsgrenze CC α im Assay bei 2.0 ng Cry1Ab-Protein g⁻¹ Boden lag. Unter klimatischen Sonderbedingungen überdauerte das Protein auf dem Standort Neuhof bis zum Zeitpunkt der Probenahme sechs Wochen nach der Ernte, an dem es in Konzentrationen von 2,5 ng Cry1Ab-Protein g⁻¹ Boden gemessen wurde. Insgesamt

zeigen die Ergebnisse, dass das Cry1Ab-Protein aus Bt-Mais (MON810) keine außergewöhnliche Stabilität aufweist und wie andere Proteine einem raschen Abbau unterliegt, sobald es mit Maispflanzenmaterial oder Gülle in den biologisch aktiven Boden eingebracht wird.

Einleitung

Bt-Pflanzen gehören zur ersten Generation gentechnisch veränderter Kulturpflanzen. Sie schützen sich vor Schädlingsfraß, indem sie bestimmte natürlicherweise in dem Bodenbakterium *Bacillus thuringiensis* vorkommende insektizide Proteine (Bt-Endotoxine) in ihren Pflanzenteilen produzieren. In Deutschland war bisher ausschließlich Bt-Mais (MON810) für den kommerziellen Anbau zugelassen bis im Jahr 2009 ein nationales Anbauverbot erlassen wurde. Die betroffenen Sorten, die das Event MON810 enthalten, produzieren das auf den Maiszünsler (*Ostrinia nubilalis*) insektizid wirkende Bt-Endotoxin Cry1Ab.

Um potenzielle Umweltwirkungen von gentechnisch veränderten Organismen wie Bt-Mais frühzeitig zu erkennen, ist deren Inverkehrbringen obligatorisch mit einem Sicherheitsmonitoring verbunden. Ein umfassendes Monitoring sollte hierbei alle beteiligten Glieder einer Verarbeitungskette oder des betroffenen Ökosystemkompartiments mit einschließen. Im Falle der landwirtschaftlichen Nutzung von Bt-Mais ist beispielsweise der Maisanbau auf dem Feld, sein Einsatz als Futtermittel in der Milchkuhfütterung, sowie die Ausbringung von Gülle Bt-Mais gefütterter Rinder auf weiteren Nutzflächen vom Standpunkt der Biosicherheit her zu beobachten und zu beurteilen. Während diesen landwirtschaftlichen Praxisabläufen ist das insektizide Bt-Protein aus der gentechnisch veränderten Pflanze einer Vielzahl von physiologischen und chemischen Prozessen ausgesetzt, die sich von der Produktion in der Pflanze bis zu seinem Eintrag in den Boden fortsetzen.

Um einzelne Abbauschritte des Cry1Ab-Proteins auf diesem komplexen Weg mit neuen und validierten immunchemischen Methoden zu verfolgen, wurde das beschriebene Forschungsvorhaben in Zusammenarbeit der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft und dem Lehrstuhl für Physiologie der Technischen Universität München durchgeführt. In dem Verbundprojekt wurden der Cry1Ab-Protein-Bodeneintrag über die zwei Pfade Ernterückstände und Gülle in

Feldversuchen unter landwirtschaftlichen Praxisbedingungen betrachtet. Im Kern sollte die Frage geklärt werden, welche Mengen des in den Bt-Mais Pflanzenteilen enthaltenen insektiziden Cry1Ab-Proteins über Ernterückstände, Wurzelexsudate und Pollendeposition sowie über die Gülle Bt-Mais gefütterter Rinder in den Boden eingetragen werden und in welchem Ausmaß dort die Einlagerung und der Abbau des Cry1Ab-Proteins erfolgen.

Die Gülle wurde im Rahmen des Langzeitfütterungsversuches mit Bt-Mais an Milchkühen gewonnen (Steinke et al., 2009). Die vorangegangenen Studien zeigten, dass ein Anteil des Cry1Ab-Proteins aus Bt-Mais-haltigen Futtermitteln die Darmpassage übersteht und im Kot der Tiere nachweisbar ist (Gürtler et al. 2009). Die hier dargestellten fortführenden Analysen sollten den Effekt der Güllelagerung auf den Cry1Ab-Protein-Gehalt, sowie den Verbleib des Cry1Ab-Proteins in Boden, nachdem die Gülle ausgebracht wurde, verfolgen. Als letztes Glied der Kette wurde auch der Pflanzenaufwuchs der güllebehandelten Flächen in die Untersuchungen mit einbezogen, um einer umfassenden Sicherheitsbewertung im betrachteten Agrarökosystem des Maisfeldes gerecht zu werden.

Zum Eintrag über Ernterückstände standen im Projekt vier bayerische Versuchsstandorte zur Verfügung, die langjährig mit Bt-Mais bewirtschaftet wurden. Da in Laborversuchen eine Bindung von Bt-Proteinen an Tonmineral Komplexe des Bodens wiederholt nachgewiesen wurde (Pagel-Wieder et al. 2007; Fiorito et al. 2008), stellt sich die Frage, ob Cry1Ab-Protein aus Bt-Mais im Boden über längere Zeiträume immobilisiert werden kann. Vor diesem Hintergrund soll die Untersuchung von Versuchsflächen, die sich durch mehrere Jahre Bt-Mais-Daueranbau auszeichnen, die Frage klären, ob im Feldversuch eine Persistenz oder Akkumulation des Cry1Ab-Proteins oder ein restloser Abbau des Cry1Ab-Proteins stattfindet.

Material und Methoden

Versuchsflächen

Die Versuchsflächen liegen über den Freistaat Bayern verteilt. Auf vier von ihnen wurde unter verschiedenen Standortbedingungen vom Jahr 2000 bis zum Jahr 2008 im Daueranbau Bt-Mais angebaut (Tabelle 1). Auf dem zur Gülleausbringung herangezogenen zusätzlichen Standort Finsing fand Bt-Mais-Bewirtschaftung in den Jahren 2006 und 2007 statt.

Tabelle 1: Kenndaten zu den vier untersuchten bayrischen Versuchsflächen mit Bt-Mais Daueranbau seit Beginn des Erprobungsanbaus im Jahr 2000

| Staatsgut | Höhe über NN[m] | Bodentyp | Ackerzahl Bodenart | pH [CaCl ₂] | Textur T/U/S | Temp. Jahresmittel [°C] | Niedersch. langj. Mittel [mm] |
|-------------|-----------------|---------------|--------------------|-------------------------|--------------|-------------------------|-------------------------------|
| Baumannshof | 365 | Braunerde | 25 hS | 4,8 | 4/15/81 | 7,8 | 636 |
| Puch | 550 | Rendzina | 66 IS | 5,8 | 18/70/12 | 8,0 | 920 |
| Grub | 525 | Parabraunerde | 43 sL | 7,0 | 30/42/28 | 7,4 | 967 |
| Neuhof | 516 | Pseudogley | 58 uL | 6,8 | 21/6/18 | 7,6 | 764 |

In der Versuchsanlage werden seit 2007 auf allen Standorten vier Anbauvarianten (Bt-Mais, isogener Mais, Grünland nach Bt-Mais, Grünland nach isogener Maislinie) untersucht, wobei für die Maisflächen jeweils vier 30 m x 25 m große Wiederholungspartellen eingerichtet wurden (Abbildung 1). Als Bt-Mais wurde die Sorte Kuratus (MON810) und zur Kontrolle die nah isogene Sorte Gavott, beide KWS-Saat AG, angebaut.

Für die Untersuchungen zum Bodeneintrag von Cry1Ab-Protein über Gülle wurden auf dem Standort Grub und dem zusätzlichen Standort Finsing bei gleicher Versuchsanlage auf jeder der Maispartellen je zwei Kleinpartellen (2 m x 3 m) eingerichtet, auf denen die Versuchsgülle ausgebracht wurde (Abbildung 1).

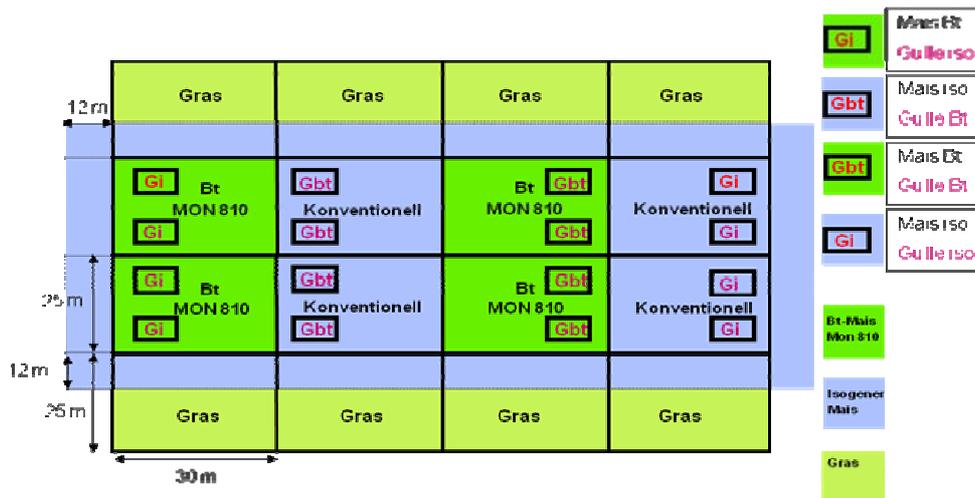


Abbildung 1: Versuchsanlage zum Monitoring von Eintrag von Cry1Ab-Protein in landwirtschaftlich genutzte Böden, mit 16 Mais-Großparzellen (30 m x 25 m) und 16 Gülle-Kleinparzellen (2 m x 3 m)

Güllemanagement und Probenahmen

Die Gülle wurde von Milchkühen der Rasse Fleckvieh gewonnen, die im Rahmen der Langzeitfütterungsstudie R 446 mit einer Futtermischung aus über 60 % (der TM) Bt-Maisprodukten (Maissilage, Maiscob, Maiskörner) (MON810) versorgt wurden, während eine Kontrollgruppe äquivalente Futtermittel mit ausschließlich isogenem Maismaterial erhielt. Von diesen Kühen wurden in zwei Abschnitten jeweils fünf Milchkühe als Kontrollgruppe bzw. Versuchsgruppe in der Stoffwechselanlage des Instituts für Tierernährung der LfL eingestallt und die in sechs Tagen anfallende Gülle gesammelt, homogenisiert und in vier getrennte Lagerungsbehälter abgefüllt. Zu Beginn der Gülleeinlagerung sowie zu jedem Ausbringungstermin auf die Kleinparzellen der Versuchsflächen wurde die Gülle in den Behältern homogenisiert und mit Hilfe eines Probenahmerohres eine Mischprobe aus jedem Behälter gezogen und bis zur Analyse bei -20°C gelagert. Die Gülle beider Fütterungsvarianten wurde zu zwei Zeitpunkten der Vegetationsperiode auf Kleinparzellen von Maisflächen der Standorte Grub und Finsing in einer Menge von 4 l/m² ausgebracht.

Die güllebehandelten Kleinparzellen der Maisflächen in Grub und Finsing wurden am 19. September vollständig beerntet und der Mais zu Häckselgut zerkleinert. Aliquots des Maishäckselguts wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert und bei -20 °C gelagert.

Die Bodenprobenahme auf den fünf Bt-Mais-Versuchsflächen erfolgte 2007 jeweils vor der Aussaat und nach der Ernte. Es wurden Mischproben aus den Tiefenstufen 0-30 cm und 30-60 cm von den Ackerflächen gezogen. Zusätzlich wurden zur Methodvalidierung im Mindestabstand von 300 m zur jeweiligen Versuchsfläche Bodenproben gezogen, die repräsentativ für den jeweiligen Standort, jedoch vom Bt-Mais-Anbau unbeeinflusst sind. Zum Abschluss des Gülleausbringungsversuchs wurden am 8./9. Oktober auf den güllebehandelten Kleinparzellen der Versuchsflächen in Grub und Finsing Bodenproben in einer Tiefe von 0-30 cm gezogen. Für die proteinchemischen Analysen und den immunologischen Nachweis des Cry1Ab-Proteins wurde gesiebter Feuchtboden bei -20 °C gelagert.

Probenextraktion und Cry1Ab-Protein-Nachweis

Die Extraktion des Cry1Ab-Proteins erfolgte unter Einsatz von für die jeweilige Matrix optimierten Extraktionsverfahren in PBST 0.1 basierten Puffern. Das Extraktionsverhältnis [mg/µl] betrug 1:10 für Boden und Gülle, sowie 1:5 für die Pflanzenproben. Die Gülle- und Maispflanzenproben wurde nach Zugabe von 200 mg MatrixGreen Perlen (Q-BIOgene) und Extraktionspuffer mittels FastPrep® -Apparatur homogenisiert und extrahiert. Die Extraktion der Bodenproben erfolgte über 30 min auf dem Horizontalschüttler bei RT. 50 µl des Überstandes wurde als Probe im ELISA eingesetzt, die Maispflanzenextrakte in einer 200 fachen Verdünnung.

Der Nachweis des Cry1Ab-Proteins in den Extrakten erfolgte mittels ELISA unter Einsatz von am Lehrstuhl für Physiologie der TUM entwickelten polyklonalen Antikörpern, die das Cry1Ab-Protein spezifisch binden (Paul et al., 2008). In dem Sandwich-ELISA-System dienten immunoaffinitätsgereinigte Anti-Cry1Ab-IgG-Antikörper aus Kaninchen als Fangantikörper. Spezifisch gebundenes Cry1Ab-Protein aus dem jeweiligen Extrakt wurde über einen zweiten biotinierten Anti-Cry1Ab- Antikörper, Bindung von Streptavidin-Peroxidase und die anschließende katalytische Umsetzung von TMB-Substrat zum oxidiertem und farbigen Zustand nachgewiesen. Die Absorptionsmessung bei 450 nm erfolgte im Versamax Reader (Molecular Devices). Die quantitative Bestimmung des Cry1Ab-Proteins in den Extrakten wurde mit SoftMaxPro-Software durch Interpolation anhand einer

Kalibrierungskurve im Konzentrationsbereich von 2-1000 pg Cry1Ab-Standard/50µl Extraktionspuffer durchgeführt. Für jede Probenmatrix wurde der Cry1Ab-ELISA nach der EU-Richtlinie 2002/657/EC validiert und die Entscheidungsgrenze CC α bestimmt (Gruber et al., 2008).

Ergebnisse

Lagerungseffekt auf Cry1Ab-Protein in Gülle aus Bt-Mais (MON810)-Fütterung

In der Abbildung 2 sind die im ELISA ermittelten Cry1Ab-Protein-Konzentrationen in der Gülle aus der Kontrollgruppe sowie in der Gülle aus Bt-Mais-Fütterung dargestellt. Alle Gülleproben aus der Kontrollgruppe lagen deutlich unterhalb der Entscheidungsgrenze CC α von 1,2 ng Cry1Ab-Protein pro g Gülle, womit in keiner der Kontroll-Gülleproben Cry1Ab nachgewiesen wurde. In den beiden Lagerungsbehältern mit Gülle aus Bt-Mais-Fütterung wurden als Ausgangsgehalt im Durchschnitt 21 ng Cry1Ab-Protein pro g Gülle bestimmt, was einem Gehalt von 205 ng Cry1Ab-Protein pro g Trockengewicht entspricht. Über den Zeitraum der Lagerung hinweg nahmen die Cry1Ab-Gehalte in beiden Behältern kontinuierlich ab. Nach 25 Wochen waren die Cry1Ab-Protein-Gehalte auf durchschnittlich 51 % des Ausgangsgehaltes abgesunken.

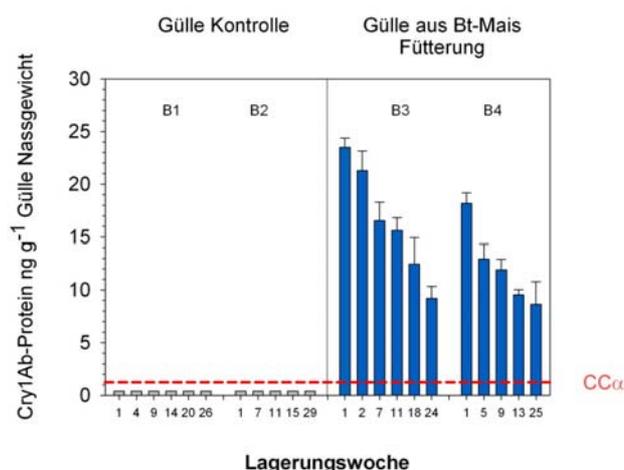


Abbildung 2: Quantifizierung von Cry1Ab-Protein in Gülle Bt-Mais (MON810) gefütterter Rinder. Die Gülleproben wurden in definierten Zeitabständen aus den Güllelagerungstanks entnommen und mittels Cry1Ab-ELISA analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier Bestimmungen. CC α kennzeichnet die Entscheidungsgrenze nach EU-Validierungsrichtlinie 2002/657/EC.

Cry1Ab-Protein in Boden güllebehandelter Maisflächen

Auf den Bt-Mais-Kleinparzellen der Standorte Grub und Finsing wurden bezüglich des Cry1Ab-Protein-Eintrages vier verschiedene Behandlungsvarianten untersucht, da jeweils Bt-Mais und Kontrollmais mit zwei Güllevarianten kombiniert war. Gezeigt sind hier nur Analyseergebnisse von Bodenproben der Kleinparzellen, die mit der isogenen Maissorte Gavott bewirtschaftet wurden. Für diese Varianten wurden in Bodenproben vom Herbst 2007 Cry1Ab-Konzentrationen deutlich unterhalb der Entscheidungsgrenze $CC\alpha$ von 2,0 ng Cry1Ab-Protein pro Gramm Feuchtboden gemessen (Abbildung 3). Damit war 6 Wochen nach der letzten Ausbringung von Gülle aus Bt-Maisfütterung auf keiner der Kleinparzellen Cry1Ab-Protein nachweisbar.

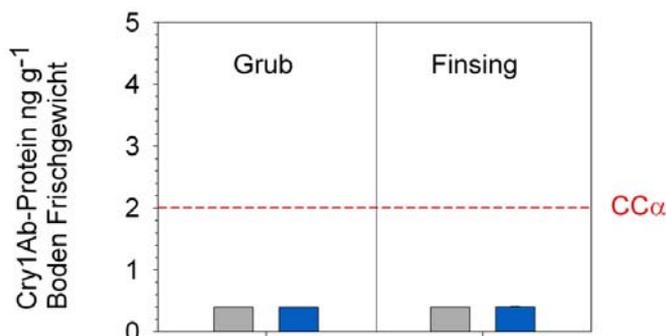


Abbildung 3: Bestimmung von Cry1Ab-Protein-Rückständen aus Gülle Bt-Mais-gefütterter Milchkühe in Ackerboden, dargestellt in Mittelwerten und Standardabweichung aus vier Bestimmungen. $CC\alpha$ kennzeichnet die Entscheidungsgrenze nach EU-Validierungsrichtlinie 2002/657/EC. Balken ohne Standardabweichung repräsentieren Werte unterhalb der analytischen Nachweisgrenze von 0,4 ng Cry1Ab-Protein pro g Boden.

Cry1Ab-Protein in Mais-Erntegut

Die Ergebnisse zur Analyse von Maispflanzen auf Cry1Ab-Protein-Rückstände aus Gülle Bt-Mais-gefütterter Kühe sind in der Abbildung 4 dargestellt.

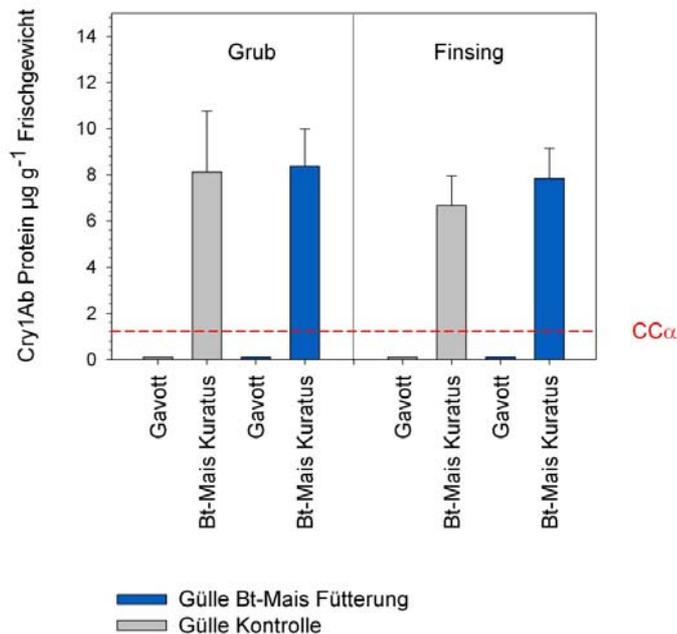


Abbildung 4: Cry1Ab-Gehalte in isogenen (Gavott) und transgenen (Kuratus) Maispflanzen die mit Gülle aus dem Bt-Mais-Langzeitfütterungs-versuch gedüngt wurden. Dargestellt sind die Cry1Ab-Gehalte der Maispflanzen von den Versuchsflächen Grub und Finsing als Mittelwerte und Standardabweichung aus vier Bestimmungen.

Maispflanzen wurden in der Vegetationsperiode zweimal gedüngt und ein Aliquot aus Gesamtpflanzen-Häckselgut zur Analyse herangezogen. Alle untersuchten isogenen Maispflanzenproben der Sorte Gavott ergaben im Cry1Ab-ELISA Messwerte unterhalb $CC\alpha$ von 1,2 ng Cry1Ab-Protein pro Gramm Frischgewicht. Es wurde somit kein immunreaktives Cry1Ab-Protein in mit Gülle aus Bt-Maisfütterung gedüngten Maispflanzen nachgewiesen. Zum Vergleich liegen die Cry1Ab-Proteingehalte in den Bt-Maispflanzen (Kuratus) des Versuches zwischen 6,7 und 8,4 µg Cry1Ab-Protein/g Frischgewicht. Auch bei den transgenen Pflanzen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede im Cry1Ab-Gehalt bei unterschiedlicher Güllebehandlung.

Cry1Ab-Konzentrationen in Böden unter Bt-Mais Daueranbau

Auf den vier Standorten Puch, Baumannshof, NeuhoF und Grub wurde bis 2006 über sieben Jahre hinweg ohne Unterbrechung Bt-Mais angebaut. Für die Bodenproben des Folgejahres 2007 sind die im ELISA gemessenen Cry1Ab-Konzentrationen zum Zeitpunkt vor der Aussaat und nach der Ernte in der Abbildung 5 für Oberboden und

Unterboden zusammengefasst. Aus der Validierung des Cry1Ab-ELISA für Bodenproben errechnet sich ein CC α -Wert von 2,0 ng Cry1Ab-Protein pro g Feuchtboden. Für die Standorte Puch, Baumannshof und Grub liegen alle gemessenen Cry1Ab-Konzentrationen unterhalb der Grenze von CC α . Die nach der Maisernte gezogenen Bodenproben der Standorte Puch und Grub weisen gegenüber den vor der Aussaat genommenen Proben leicht erhöhte Hintergrundwerte unterhalb CC α auf, was sowohl für die Bt-Maisflächen als auch für die Kontrollflächen gilt. Das heißt, dass im Jahr 2007 in keiner der Bodenproben der Versuchsstandorte Puch, Baumannshof und Grub Cry1Ab-Protein messbar war.

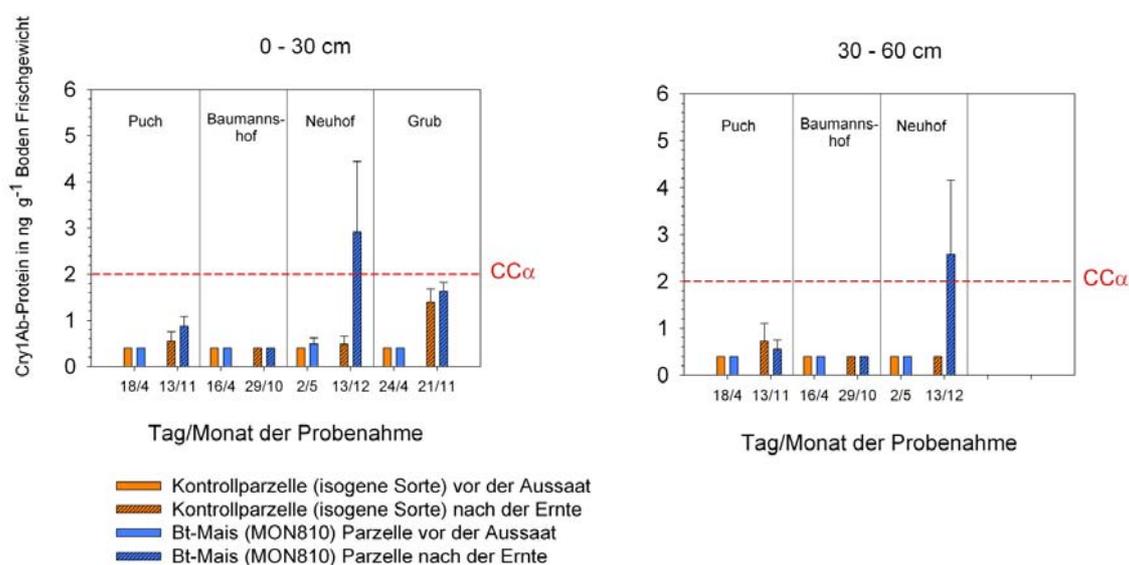


Abbildung 5: Cry1Ab-Protein Konzentrationen in Feinbodenproben des Ober- und Unterbodens aus dem Bt-Mais-Daueranbau Feldversuch im Jahr 2007. CC α kennzeichnet die Entscheidungsgrenze nach EU-Validierungsrichtlinie 2002/657/EC. Messwerte unterhalb CC α zeigen an, dass gemäß Validierung kein Cry1Ab-Protein nachgewiesen wurde

Auf dem Standort NeuhoF wurde zum Zeitpunkt vor der Aussaat 2007 weder auf Bt-Mais- noch auf den Kontrollparzellen Cry1Ab-Protein in Feinboden nachgewiesen. Die Analysen der Bodenproben aus der Probenahme nach der Ernte zeigen signifikante Unterschiede zwischen Bt-Mais- und Kontrollflächen. Während auf den Kontrollflächen die Messwerte Gehalte deutlich unterhalb von CC α liegen, wurden auf den Bt-Maisflächen im Mittel $2,9 \pm 1,5$ ng Cry1Ab/g Boden in der oberen Tiefenstufe und $2,6 \pm 1,6$ ng Cry1Ab/g Boden in der unteren Tiefenstufe bestimmt.

Somit wurde im Versuchsjahr 2007 bei vier untersuchten Flächen nur auf dem Standort Neuhof zum Zeitpunkt sechs Wochen nach der Ernte durch Bt-Mais-Ernterückstände in den Boden eingebrachtes Cry1Ab-Protein nachgewiesen.

Diskussion

Seit der Entwicklung und Zulassung von Bt-Mais (MON810) wurde in zahlreichen Projekten der biologischen Sicherheitsforschung die Wirkung des Bt-Mais-Anbaus auf einzelne Glieder des Agrarökosystems einschließlich des Eintrags von Cry1Ab-Protein über Ernterückstände in den Boden untersucht. Hierbei wurden in den meisten Fällen Versuchsflächen nach weniger als vier Jahren Bt-Mais-Anbau herangezogen (Baumgarte et al., 2005; Wang et al. 2007). Im hier beschriebenen Forschungsvorhaben wurde dahingegen die Frage nach einer Akkumulation des Cry1Ab-Proteins in Boden anhand von Daueranbauflächen mit Bt-Mais-Bewirtschaftung über neun Jahre hinweg bearbeitet, von denen die abschließenden Ergebnisse im Abschlussbericht 2010 veröffentlicht werden. Darüberhinaus wurde als zweiter Eintragspfad von Cry1Ab-Protein in den Boden erstmalig die Ausbringung von Gülle von Milchkühen aus Bt-Mais-Langzeitfütterung (Meyer et al., dieser Tagungsband) in die Untersuchungen mit einbezogen.

Alle Cry1Ab-Protein-Analysen erfolgten mit Hilfe eines neuen, im Rahmen der Langzeitfütterungsstudie entwickelten und erfolgreich eingesetzten Cry1Ab-ELISA-Systems, wobei für jede der untersuchten tierischen und pflanzlichen Matrices sowie die Bodenmatrix eine gesonderte Assay-Validierung nach der EU-Richtlinie 2002/657/EC erfolgte. Dies ermöglicht einen direkten Vergleich der erhobenen Daten aus den eng verknüpften Studien. Insbesondere kann das Abbauverhalten des insektiziden Cry1Ab-Proteins von der Maispflanze über Futtermittel, Milchkuh und Gülle bis in den Boden verfolgt werden. Damit kann ein wichtiger Teil zur ökologischen Bewertung des Bt-Mais-Praxisanbaus beigetragen werden, da die Zeiträume und Konzentrationen in denen insektizide Bt-Proteine im Agrarökosystem verfügbar sind, eine entscheidende Rolle für die mögliche toxische Wirkungen spielen.

Die vorangegangenen Analysen von Kotproben aus der Bt-Mais-Langzeitfütterung ergaben für Kot der Bt-Mais-gefütterten Versuchsgruppe Cry1Ab-Protein-Gehalte

von 20 bis zu 110 ng g⁻¹ in Kot. Im Urin wurde kein Cry1Ab-Protein nachgewiesen (Gürtler et al., 2009). In Einklang damit wurden in der vorliegenden Studie zum Zeitpunkt der Einlagerung der aus Kot und Urin gemischten Gülle Konzentrationen von durchschnittlich 21 ng Cry1Ab-Protein g⁻¹ Gülle gefunden. Mit zunehmender Lagerungsdauer war ein kontinuierlicher Abbau des Cry1Ab-Proteins zu verzeichnen. Um eine weitergehende Aussage über die generelle Stabilität des Cry1Ab-Proteins zu treffen ist dessen Abbau im Vergleich zum Abbau anderer Proteine zu betrachten. Hierzu wurden in einer vorläufigen Studie die Cry1Ab-Mengen in der Gülle in Relation zum Gesamtprotein gesetzt und es ergab sich über die gesamte Lagerungsdauer hinweg eine Abnahme von 1,9 µg Cry1Ab-Protein/g Protein auf 0,9 µg Cry1Ab-Protein/g Protein (Gruber et al., in Vorbereitung). Dies ist ein deutlicher Hinweis auf einen bevorzugten Abbau des Cry1Ab-Proteins und zeigt, dass es im Vergleich zu anderen Proteinen keine außergewöhnliche Stabilität aufweist.

Es wird jedoch auch deutlich, dass innerhalb praxisüblicher Lagerungszeiträume kein kompletter Abbau des Cry1Ab-Proteins erfolgt und es somit in den gemessenen geringen Konzentrationen durch Güllendüngung mit in den Boden eingetragen wird.

Im der Versuchsanlage wurde in keiner Bodenprobe der mit Gülle aus Bt-Maisfütterung behandelten Kleinparzellen Cry1Ab-Protein nachgewiesen. Dies entspricht den Erwartungen, dass durch die oberflächliche Verteilung der Gülle auf dem Boden eine rasche physikalische, chemische und mikrobielle Zersetzung des Proteins erfolgt, da diese Prozesse durch das Mikroklima in der obersten Bodenschicht stark begünstigt werden. Auch in den isogenen Maispflanzen auf den mit Cry1Ab-Protein-haltiger Gülle behandelten Kleinparzellen wurde kein Cry1Ab-Protein nachgewiesen, so dass diese bezüglich transgener Rückstände wie isogene Maispflanzen aus konventioneller Güllebehandlung einzustufen sind.

Die in dem transgenen Maispflanzen-Häckselgut ermittelten Cry1Ab-Gehalte zwischen 6,7 und 8,4 µg Cry1Ab-Protein/g Frischgewicht liegen im Bereich der in der Literatur ermittelten Daten (Nguyen et al. 2007). Würden die gesamten Maispflanzen als Häckselgut in den landwirtschaftlichen genutzten Boden eingearbeitet, entspräche dies bei einer mittleren Ernte von 60 t Maisfrischmasse einem mittleren Cry1Ab-Protein-Eintrag von 462 g pro Hektar oder 46 mg pro m². Dies entspräche

bei Einarbeitung des kompletten Häckselguts in die obersten 30 cm und einer Lagerungsdichte des Bodens von $1,5 \text{ g cm}^3$ einem einmaligen maximalen Eintrag von 100 ng Cry1Ab-Protein pro g Boden zuzüglich des im Laufe der Vegetationsperiode über Wurzelexsudation und abgestorbenes Wurzelmaterial in den Boden eingebrachten Cry1Ab-Proteins.

Nach sieben Jahren Bt-Mais-Daueraanbau wurde auf keiner der Versuchsflächen zum Probenahmetermin vor der nächsten Aussaat Cry1Ab-Protein nachgewiesen. In den nach der Maisernte gezogenen Bodenproben wurde von den vier untersuchten Standorten nur auf dem Standort Neuhof Cry1Ab-Protein nachgewiesen. Die Überdauerung des Bt-Proteins im Boden dieser Fläche ist mit den Witterungsverhältnissen im Versuchsjahr 2007 an diesem Standort zu erklären. Lang anhaltende Regenfälle nach der Ernte bewirkten extreme Staunässe in den Böden, die den Abbau der Ernterückstände offensichtlich stark eingeschränkt haben. Somit kann unter klimatischen Sonderbedingungen eine zeitlich beschränkte Überdauerung des Cry1Ab-Proteins im Boden stattfinden. Nach den Analyseergebnissen für das Frühjahr 2007 zu schließen, ist das insektizide Cry1Ab-Protein vor der nächsten Aussaat jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit wieder restlos abgebaut.

Anhand der hier nach sieben Jahren Bt-Mais-Daueraanbau ermittelten Ergebnisse kann somit in Übereinstimmung mit vorangehenden Arbeiten eine Akkumulation des Bt-Proteins in ackerbaulich genutztem Boden unserer Klimazone weitestgehend ausgeschlossen werden.

Danksagung

Wir bedanken uns bei Stefanie Gellan und Kathrin Söldner für die exzellente Organisation und Durchführung der Probenahmen und bei Waltraud Schmid für hervorragende technische Assistenz im Labor.

Referenzen

Baumgarte S. and Tebbe C.C. (2005) Field studies on the environmental fate of the Cry1Ab Bt toxin produced by transgenic maize (MON810) and its effect on the bacterial communities in the maize rhizosphere. *Mol Ecol* **14**, 2539-2551.

Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002/657/EC), *Off J Eur Commun* L221 (2002) 8-33.

Fiorito T.M., Icoz I. and Stotzky G. (2008) Adsorption and binding of the transgenic plant proteins, human serum albumin, β -glucuronidase, and Cry3Bb1, on montmorillonite and kaolinite: Microbial utilization and enzymatic activity of free and clay-bound proteins. *Appl Clay Sci* **39**, 142-150.

Gruber H., Paul V., Meyer H.H.D. and Müller M. (2008) Validation of an enzyme immunoassay for monitoring Cry1Ab toxin in soils planted with Bt-maize (MON810) in a long-term field trial on four South German sites. *J Consumer Protection and Food Safety* **3**, 22-25.

Guertler P., Paul V., Steinke K., Wiedemann S., Preißinger W., Albrecht C., Spiekers H., Schwarz F.J. and Meyer H.H.D. (2009) Long-term feeding of genetically modified maize (MON810) – fate of *cry1Ab* DNA and novel protein during the metabolism of the dairy cow. Manuskript submitted to *Livest Sci*.

Nguyen H.T. and Jehle J.A. (2007) Quantitative analysis of the seasonal and tissue-specific expression of Cry1Ab in transgenic maize MON810. *J Plant Disease Protect* **114**, 82-87.

Steinke K., Paul V., Gürtler P., Preißinger W., Wiedemann S., Albrecht C., Spiekers H., Meyer H.H.D., Schwarz F.J. (2009): Effects of long-term feeding of genetically modified maize (Bt-maize; MON810) to dairy cows on performance and metabolic parameters. *Proc Soc Nutr Physiol* **18**, 110.

Pagel-Wieder S., Niemeyer J., Fischer W.R. and Gessler F. (2007) Effects of physical and chemical properties of soils and adsorption of the insecticidal protein (Cry1Ab) from *Bacillus thuringiensis* at Cry1Ab protein concentrations relevant for experimental field sites. *Soil Biol Biochem* **39**, 3034-3042.

Paul V., Steinke K. and Meyer H.H.D. (2008) Development and validation of a sensitive enzyme immunoassay for surveillance of Cry1Ab toxin in bovine blood plasma of cows fed Bt-maize (MON810). *Anal Chim Acta* **607**, 106-113.

Wang H., Ye Q., Gan J. and Wu L. (2007) Biodegradation of Cry1Ab protein from Bt transgenic rice in aerobic and flooded paddy soils. *J Agric Food Chem* **55**, 1900-1904.

Labor

Laboratory Biorisk Management Standard

CEN Workshop Agreement - CWA 15793

Francisco X. Moreano

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit,

85764 Oberschleißheim

Der Laboratory Biorisk Management Standard, welcher vom Europäischen Komitee für Normung (CEN) herausgegeben wurde, ist ein normatives Dokument, das auf die Integration der Kontrolle von sicherheitsrelevanten Parametern in bestehenden Qualitätsmanagementsystemen eines Betriebes abzielt [1]. Das Dokument gilt noch nicht als offizielle CEN-Norm, es befindet sich vielmehr in der Probephase und trägt den Status eines Conference Workshop Agreements (CWA). Es ist das Ergebnis der Arbeitsgruppe CEN Workshop 31 – Laboratory Biosafety and Biosecurity, in der der Normungsbedarf von interessierten Parteien weltweit diskutiert und zusammengefasst wurde. Aus Deutschland nahmen bei der Ausarbeitung dieses CWA u.a. Vertreter des Bundesministeriums für Arbeit und Soziales teil. Eine vollständige Liste aller mitwirkenden Teilnehmer kann beim CEN Management Centre angefordert werden [2].

Der Normungsbedarf im Bereich der Biosafety und Biosecurity in Europa ergibt sich im Wesentlichen aus der unterschiedlichen Umsetzung der Richtlinien 2000/54/EG über den Schutz der Arbeitnehmer gegen Gefährdung durch biologische Arbeitsstoffe bei der Arbeit und 98/81/EG über die Anwendung genetisch veränderter Mikroorganismen in geschlossenen Systemen in das nationale Recht der einzelnen Mitgliedsstaaten. Der Begriff Biosafety bezieht sich im Allgemeinen auf den Schutz der menschlichen Gesundheit und der Umwelt gegenüber der Exposition mit gefährlichen Erregern. Der Begriff Biosecurity bezieht sich dagegen auf die Sicherung der biologischen Agenzien vor Missbrauch. In Deutschland bestehen verschiedene rechtliche Vorschriften, die sich mit sicherheitsrelevanten Parametern in den Bereichen der Biosafety befassen. Der Bereich der Biosecurity wird dabei nur marginal und nicht explizit behandelt. Zu nennen sind beispielweise die

Biostoffverordnung, die technischen Regeln für Arbeiten mit biologischen Arbeitsstoffen, das Gentechnikgesetz und die Gentechnik-Sicherheitsverordnung.

Eine grundlegende Erkenntnis aus dem CWA 15793 ist, dass die biologische Sicherheit eines Betriebes nicht alleine in dem operativen Bereich behandelt werden kann, wo eine direkte Arbeit mit den biologischen Agenzien stattfindet. Die biologische Sicherheit entsteht vielmehr erst dann, wenn das Zusammenspiel zwischen den operativen Bereichen eines Betriebes auf organisatorischer, technischer und experimenteller Ebene reibungsfrei funktioniert. Somit bietet der Laboratory Biorisk Management Standard einen normativen Rahmen für die Planung, Durchführung, Kontrolle und Optimierung der Zusammenarbeit zwischen diesen Bereichen. Auf diese Weise können Risiken, die sich aus Tätigkeiten mit biologischen Agenzien ergeben, systematisch identifiziert, kontrolliert und behoben werden. Das Biorisk Managementsystem ist so konzipiert, dass es sich in bestehende Managementsysteme (z.B. Qualitätsmanagement) integrieren lässt.

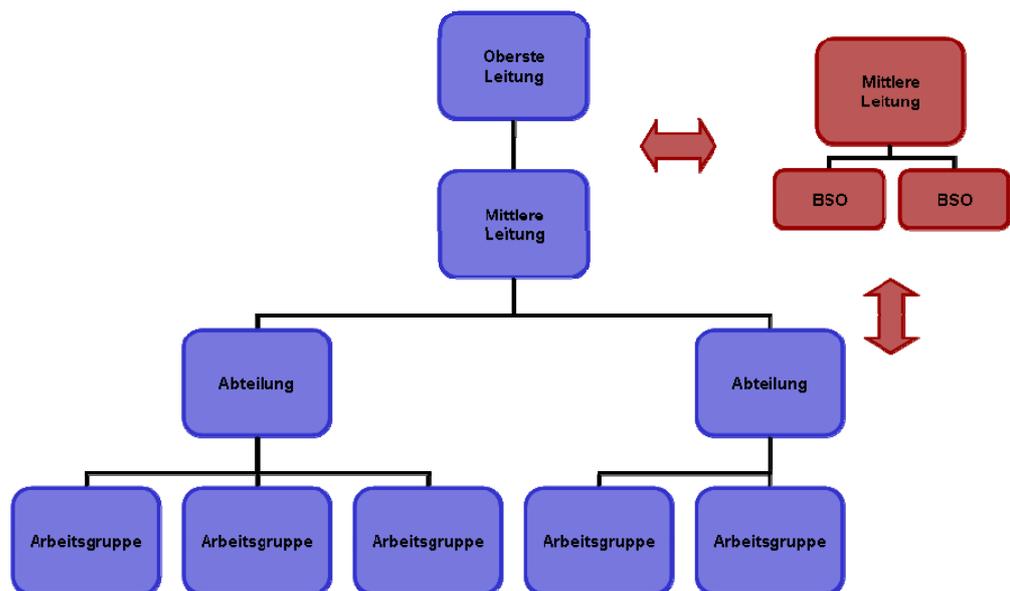
Die Voraussetzungen für ein erfolgreiches Risikomanagement ist die Verpflichtungserklärung der obersten Leitung des Betriebes zur Schaffung von organisatorischen Strukturen mit definierten Verantwortungen und Weisungsbefugnissen und zur Bereitstellung von finanziellen bzw. personellen Mitteln. Dazu gehört das Bestreben nach einer nachhaltigen Verfolgung der definierten Ziele und nach einer kontinuierlichen Optimierung des Risikomanagements. Die Nachhaltigkeit entsteht mit der Durchführung regelmäßiger Unterweisungen, Training und Fortbildungen sowie periodischer interner bzw. externer Audits.

Wie in Abbildung 1A dargestellt, beinhaltet eine auf das Risikomanagement optimierte Unternehmensstruktur eine Stabstelle auf der Ebene des mittleren Managements, die sowohl im direkten Kontakt zu der obersten Leitung als auch zu den organisatorischen, technischen und experimentellen Ebenen des Betriebes steht. Auf diese Weise wird die Expertise in einem sogenannten Biorisk Management Komitee gesammelt, welches über entsprechende Weisungsbefugnisse sowie Befugnisse über finanzielle und personelle Mittel verfügt. Das Komitee besteht aus Biosafety Beauftragten. So sind die betriebsinternen Experten in der Lage, einen

harmonisierten Biorisk Management in dem gesamten Betrieb zu etablieren.

Im Gegensatz dazu, bieten Unternehmensstrukturen, die die Verantwortung für sicherheitsrelevante Fragestellungen konsequent in die unteren operativen Bereiche verlagern, keine Möglichkeit eines harmonisierten Risikomanagements (Abbildung 1B). Die Information, die in den untersten operativen Ebenen gesammelt wird, kann aufgrund von Interessenkonflikten gegebenenfalls die oberste Leitung des Betriebes nicht erreichen. Ohne Weisungsbefugnisse und ohne Gewalt über finanzielle und personelle Mittel haben die unteren operativen Bereiche nur eingeschränkte Möglichkeiten der Behebung von Risiken. Ein weiterer Nachteil ist, dass jede operative Ebene für sich Expertise in dem Bereich des Risikomanagements aufbauen muss. Dies führt neben der unwirtschaftlichen Bindung von Arbeitskräften, zu unterschiedlichen Auffassungen von Gefährdungslagen innerhalb eines Betriebes und verhindert die Kommunikation von Gefahren zwischen den Arbeitsgruppen.

1A



1B

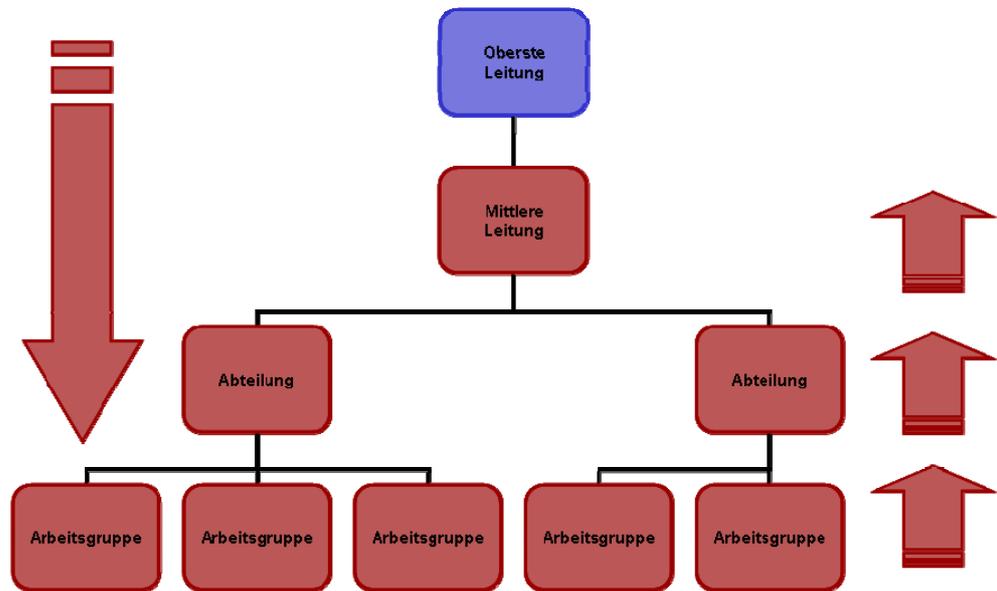


Abbildung 1: Eignung von Unternehmensstrukturen für das Risikomanagement. 1A: Eine auf das Risikomanagement optimierte Unternehmensstruktur beinhaltet eine Stabstelle auf der Ebene des mittleren Managements, die sowohl im direkten Kontakt zu der obersten Leitung als auch zu den organisatorischen, technischen und experimentellen Ebenen des Betriebes steht. Das Biosrisk Management Komitee verfügt über entsprechende Weisungsbefugnisse sowie Befugnisse über finanzielle und personelle Mittel. 1B: Bei strikt hierarchischen Unternehmensstrukturen können Informationen, die in den untersten operativen Ebenen gesammelt werden, aufgrund von Interessenkonflikten gegebenenfalls die oberste Leitung des Betriebes nicht erreichen.

Die Kontrolle und Optimierung des Risikomanagements basiert auf der routinemäßigen Erhebung und dem Vergleich des Ist-Zustandes im Betrieb mit dem von dem Standard vorgegebenen Soll-Zustand. Hierzu enthält der Standard eine Reihe an Vorschriften im Bezug auf organisatorische, technische und experimentelle Sicherheitsmaßnahmen, wie z.B. das Vorhandensein einer Inventur der biologischen Agenzien, Inaktivierung und Entsorgung von Abfällen und Abwässern, Wartung und Instandhaltung von Geräten, Vorhandensein von Notfallplänen, u.s.w. Ziel des Standards ist des Weiteren, dass der Betrieb allen nationalen Regelungen gerecht wird.

Die normativen Vorschriften des Laboratory Biosrisk Management Standards sollen im Rahmen eines vom Bayerischen Staatministerium für Umwelt und Gesundheit geförderten Forschungsprojektes im S3-Labor des Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit etabliert und auf ihre praktische Durchführbarkeit hin getestet werden. Zu diesem Zweck soll, wie vom CWA 15793

gefordert, eine erste Erhebung der bereits etablierten Sicherheitsmaßnahmen vorgenommen werden. Diese Erhebung wird als Basis für einen Vergleich mit dem im CWA 15793 beschriebenen Soll-Zustand dienen. Die in diesem Vergleich festgestellten Abweichungen und fehlenden Regelungen sollen auf der Ebene der Sachgebietsleitung besprochen und beseitigt werden.

Die Erfahrungen aus diesem Projekt werden in einem Netzwerk an interessierten Instituten zur Diskussion gestellt. In diesem Netzwerk nehmen Vertreter der medizinischen Hochschule Hannover, des Friedrich-Loeffler-Institutes und des Institutes für Viruskrankheiten und Immunprophylaxe (Schweiz) teil.

Referenzen

[1] Laboratory Biorisk Management Standard, CEN Workshop Agreement - CWA 15793, Europäisches Komitee für Normung, Februar 2008

[2] Europäisches Komitee für Normung, CEN Management Centre, persönliche Mitteilung

Das Interdisziplinäre Expertennetzwerk Biologische Gefahrenlagen Bundesdeutsches Labornetzwerk zur Diagnostik hochkontagiöser Krankheiten

Ulrich Busch, Pia Zimmermann, Regina Konrad, Andreas Sing

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit,

85764 Oberschleißheim

Einleitung

Das Interdisziplinäre Expertennetzwerk Biologische Gefahrenlagen (1) wurde 2003 vom Bundesamt für Bevölkerungsschutz und Katastrophenhilfe (2) gemeinsam mit dem Robert Koch-Institut (3) gegründet. Dabei handelt es sich hauptsächlich um eine Kommunikationsplattform, in der aktuelle Themen von Vertretern aus Gesundheitsdienst, Feuerwehr, Polizei, Hilfsorganisationen und weiteren Institutionen diskutiert werden. Im fachlichen Austausch sollen Lösungsansätze für Probleme bei biologischen Gefahrenlagen gefunden und weitergegeben werden. Daneben wurden verschiedene Arbeitsgruppen etabliert, die sich mit Lageerkundung und mobiler Detektion, Schutzausrüstung, Dekontamination, medizinischer Versorgung u.a. beschäftigen. Die im Rahmen des Forschungsprojektes „Mobile Schnelldetektion von kampfstofftauglichen Krankheitserregern, Teilprojekt Testentwicklung“ (4) entwickelten molekularbiologischen Nachweisverfahren sollen im Rahmen eines Labornetzwerkes dezentral etabliert werden (5).

Bundesamt für Bevölkerungsschutz und Katastrophenhilfe (BBK)

Als Folge der Anschläge in den USA am 11. September 2001 und nach der Flutkatastrophe 2002 in Ostdeutschland wurde ein gemeinsames Krisenmanagement zwischen Bund (Zivilschutzaufgaben des Bundes lagen bisher im militärischen

Bereich) und den Ländern (zuständig für „friedensmäßige“ Katastrophen- und Gefahrensituationen, z.B. Pandemien, Terroranschläge und große Industrieunfälle) abgestimmt. Dabei wurden dem Bund 2002 von den Ländern Kompetenzen übertragen und eine neue Strategie entwickelt, die vor allem ein gemeinsames Krisenmanagement durch Bund und Länder bei außergewöhnlichen, national bedeutsamen Gefahren- und Schadenslagen fordert, bei dem alle Staatsebenen zusammenarbeiten müssen.

Der zivile Bevölkerungsschutz soll neben Polizei, Feuerwehr und Bundeswehr als vierte Säule verankert werden. Dazu wurde ein neues Bundesamt für Bevölkerungsschutz und Katastrophenhilfe (BBK) errichtet, das am 1. Mai 2004 seine Arbeit aufgenommen hat. Eine zentrale Aufgabe des BBK ist es, alle Bereiche der Zivilen Sicherheitsvorsorge zu einem wirksamen Schutzsystem für die Bevölkerung und ihre Lebensgrundlagen zu verknüpfen. Das BBK als Fachbehörde des Bundesministeriums des Innern (BMI) berät und unterstützt auch die anderen Bundes- und Landesbehörden bei der Erfüllung ihrer Aufgaben.

Interdisziplinäres Expertennetzwerk Biologische Gefahrenlagen

In den USA wurden 2001 biologische Substanzen bei Anschlägen mit Milzbrandsporen vorsätzlich freigesetzt. Durch die SARS -Epidemie in 2002 und 2003, die Bekämpfung der Vogelgrippe H5N1 und durch die Ausrufung der Pandemie-Warnstufe 6 im Jahre 2009 anlässlich der Ausbreitung der Neuen Influenza H1N1 sind unbekannte oder neuauftretende Krankheitserreger in den Fokus einer breiten öffentlichen Wahrnehmung geraten. Die Diagnostik und die Bewältigung dieser außergewöhnlichen biologischen Gefahrenlagen setzen eine intensive Zusammenarbeit aller beteiligten Fachdisziplinen voraus. Mit der Bildung des Expertennetzwerkes Biologische Gefahren wurde ein solches Netzwerk geschaffen (6). Im Rahmen des Netzwerkes wurden zwei Handbücher zum Thema Biologische Gefahren publiziert (7-8).

Forschungsprojekt: Mobile Schnelldetektion

Im Rahmen des Forschungsvorhabens „Mobile Schnelldetektion von kampfstofftauglichen Krankheitserregern zur Optimierung der Gefahrenabwehr durch

die Sicherheitsbehörden: Teilprojekt Testentwicklung“ sind molekulare Nachweisverfahren zur Detektion von Erregern etabliert worden, die im Fall eines bioterroristischen oder kriminellen Anschlags vorsätzlich freigesetzt werden können. Der Aufbau und eine Evaluation dieser Teste fand am Bernhard-Nocht-Institut in Hamburg statt. Dabei wurden Testverfahren für insgesamt 12 verschiedene Erreger etabliert, u.a. *Bacillus anthracis*, Aviäres Influenza A Virus (H5N1), Lassavirus und Pockenviren. Das Projekt wurde 2007 abgeschlossen. Als Weiterführung des o. g. Forschungsvorhabens wurde deshalb die Bildung eines Labornetzwerks angeregt. Im Rahmen eines Ringversuches soll die individuelle Leistung der Labore dezentral evaluiert werden.

Forschungsprojekt: Dezentrale Evaluierung von molekularen Nachweismethoden und Bildung eines Labornetzwerks

Die im Bernhard-Nocht-Institut in Hamburg entwickelten Analyseverfahren sollen im Rahmen des Labornetzwerkes für weitere Diagnostikeinrichtungen verfügbar gemacht und an verschiedenen Laborstandorten in Deutschland etabliert werden. Hierzu wird im Rahmen einer externen Qualitätskontrolle ein Ringversuch zur Evaluierung der Nachweisverfahren durchgeführt, an dem neun verschiedene Testlabore beteiligt sind.

Zur Sicherstellung einer gleich bleibenden Qualität der Reagenzien wird eine industrielle Herstellung und Lagerung der Oligonukleotide angestrebt. Die synthetisierten Oligonukleotide werden zentral eingelagert und können für den Ringversuch und bei Bedarf in einer biologischen Schadenslage exklusiv von den beteiligten Laboren angefordert werden.

Dadurch soll gewährleistet werden, dass im Bedarfsfall die Teste an verschiedenen Laborstandorten nach standardisierten Verfahren auf hohem Qualitätsniveau durchgeführt werden können. Dies würde maßgeblich zur schnellen und zuverlässigen Diagnostik beitragen, wenn insbesondere im Falle einer außergewöhnlichen Gefahrenlage ein Massenfall von Proben zu erwarten ist. Der Transfer und die Implementierung der im o. g. Forschungsvorhaben entwickelten Testverfahren ist prinzipiell in jedes Basislabor möglich, das molekular diagnostische Untersuchungen durchführt. Da mit entsprechenden Referenzmaterialien bzw.

Organismen der Risikogruppe 3 gearbeitet wird, ist dafür allerdings das Vorhandensein eines Labors der Sicherheitsstufe 3 (BSL3) erforderlich.

Das Arbeitsprogramm besteht aus 5 Phasen:

Phase 1

Verteilung der Protokolle und Referenzmaterial

Phase 2

Etablierung der Testsysteme an den einzelnen Laborstandorten

Phase 3

Herstellung der Ringversuchsproben (RV)

Phase 4

Verteilung der RV Proben

Phase 5

Auswertung

Bei der Durchführung der Ringversuche werden zunächst 10 -12 Labore des öffentlichen Gesundheitsdienstes, des Veterinäruntersuchungsdienstes, sowie der Bundeswehr einbezogen, die über eine hohe Expertise auf dem Feld der molekularen Erregerdiagnostik verfügen und gleichzeitig Aufgaben im Rahmen des öffentlichen Gesundheitswesens übernehmen. Dieses Labornetzwerk kann zukünftig durch zusätzliche Labore erweitert werden.

Folgende Labore haben sich zum Expertennetzwerk zusammengeschlossen:

- Institut für Virologie, Universität Marburg
- Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München
- Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL), Oberschleißheim
- Zentrum für Biologische Sicherheit (ZBS), Robert Koch-Institut, Berlin
- Bernhard Nocht-Institut, Hamburg
- Landesgesundheitsamt, Stuttgart
- Landesgesundheitsamt, Hannover
- Bundesinstitut für Viruserkrankungen der Tiere, Insel Riems
- Bundeswehr, Munster
- Institut für Virologie, Universität Bonn

Ausblick

Nach Implementierung der molekularbiologischen Methoden und Durchführung eines Ringversuches sind am LGL die Voraussetzungen geschaffen worden um in außergewöhnlichen biologischen Lagen unverzüglich und flexibel mit einem hohen Qualitätsstandard „bioterroristisch“ relevante Mikroorganismen nachzuweisen. Durch die enge Verzahnung innerhalb des Expertennetzwerkes ist das LGL in der Lage, schnell und zuverlässig für neuauftretende Infektionen, entsprechende Nachweisverfahren zu entwickeln und zu validieren, was sich bereits am Beispiel der „Neuen Influenza“ gezeigt hat.

Danksagung

Das Projekt wurde durch das BBK gefördert.

Referenzen

- (1) www.bevoelkerungsschutz.de
- (2) www.bbk.bund.de
- (3) www.rki.de
- (4) Forschungsprojekt BBK Nr. 167
(http://www.bbk.bund.de/cIn_027/nn_403144/DE/02__Themen/07__Forschung/02__Forschungsvorhaben/02__lfdFV/01__BeschreibungFV/Beschreibung_20Lang_20167.html__nnn=true)
- (5) Forschungsprojekt BBK Nr. 359
(http://www.bbk.bund.de/cIn_027/nn_403144/DE/02__Themen/07__Forschung/02__Forschungsvorhaben/02__lfdFV/01__BeschreibungFV/Beschreibung__Lang__359.html__nnn=true)
- (6) Forum Expertennetzwerk
http://www.bevoelkerungsschutz.de/cIn_090/nn_1723610/DE/05__Forum/forum__node.html?__nnn=true
- (7) Biologische Gefahren I - Handbuch zum Bevölkerungsschutz: Herausgeber: Bundesamt für Bevölkerungsschutz und Katastrophenhilfe, Bonn, Robert Koch-Institut, Berlin (3. Auflage; 2007)
http://www.bevoelkerungsschutz.de/cIn_090/SharedDocs/InterneLinks/Handbuch/3_Auflage.templateId=raw,property=publicationFile.pdf/3_Auflage.pdf
- (8) Biologische Gefahren II - Entscheidungshilfen zu medizinisch angemessenen Vorgehensweisen in einer B-Gefahrenlage Herausgeber: Bundesamt für Bevölkerungsschutz und Katastrophenhilfe, Bonn, Robert Koch-Institut, Berlin (3. Auflage 2007)
http://www.bevoelkerungsschutz.de/cIn_090/SharedDocs/InterneLinks/Handbuch/Med_Versorgung.templateId=raw,property=publicationFile.pdf/Med_Versorgung.pdf

Nicht zugelassene GVO – eine Herausforderung für die amtliche Überwachung

Sven Pecoraro

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit,

85764 Oberschleißheim

Rechtliches

Für in der EU nicht zugelassenen GVO gilt eine so genannte Nulltoleranz. Nach Artikel 4 Absatz 2 der Verordnung (EG) 1829/2003 *über genetisch veränderte Lebensmittel und Futtermittel* darf niemand: *einen zur Verwendung als Lebensmittel bestimmten GVO oder ein in Artikel 3 Absatz 1 genanntes Lebensmittel in Verkehr bringen, wenn der Organismus oder das Lebensmittel nicht über eine gemäß diesem Abschnitt erteilte Zulassung verfügt und die entsprechenden Zulassungsvoraussetzungen erfüllt.* Dies bedeutet für die amtliche Überwachung, dass ein Lebensmittel nicht verkehrsfähig ist, wenn analytisch ein nicht zugelassener GVO darin gefunden wird. Dies gilt unabhängig von der gefundenen Menge an GVO (= Nulltoleranz).

Fälle von nicht zugelassenen Lebens- und Futtermitteln

In der Vergangenheit hat sich jedoch wiederholt gezeigt, dass dennoch nicht zugelassene GVO (UGM) auf den Markt gelangt sind. So wurde 2004 vom LGL als erstem Labor in Europa ein nicht zugelassener GVO nachgewiesen. Diese virusresistente Papayalinie wurde offensichtlich bei der Ernte auf Hawaii mit konventioneller Ware vermischt. 2005 wurde bekannt, dass gentechnisch veränderter (gv) Mais (Bt 10) von Syngenta, offensichtlich aufgrund einer firmeninternen Verwechslung, in den Handel gelangte. In 2006 wurden verschiedene nicht zugelassene Reislinien aus den USA und Asien (LL 601, LL 62, Bt 63) auf dem Europäischen Markt festgestellt. 2008 wurde die Maislinie DAS-59132-8 (Event 32) gefunden. 2009 wurde die Maislinie MON88017 in Futtermitteln, sowie Leinsamen

FP967 (Handelsname: CDC Triffid) nachgewiesen.

In solchen Fällen erfolgt jeweils eine Meldung über das Europäische Schnellwarnsystem (Rapid Alert System for Food and Feed, RASFF, <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal>) an alle Mitgliedstaaten und die betroffenen Waren werden aus dem Handel genommen.

Begriffe und Definitionen

GVO = Gentechnisch veränderter Organismus **wie** Pflanzen, Tiere, Bakterien, Viren

Richtlinie 2001/18/EG über die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Organismen in die Umwelt und zur Aufhebung der Richtlinie 90/220/EWG („Freisetzungsrictlinie“)

Artikel 2 Absatz 1: „**Organismus**“: jede biologische Einheit, die fähig ist, sich zu vermehren oder genetisches Material zu übertragen (Viren, Bakterien, Pflanzen, Tiere)

Artikel 2 Absatz 2: „**genetisch veränderter Organismus (GVO)**“: ein Organismus mit Ausnahme des Menschen, dessen genetisches Material so verändert worden ist, wie es auf natürliche Weise durch Kreuzen und/oder natürliche Rekombination nicht möglich ist.

GVP = Gentechnisch veränderte Pflanze

Event = Bestimmte gentechnisch veränderte Pflanzenlinie

z.B. Reis LL 62

Stacked event = Stack = Kreuzung aus GVP:

z.B. MON 863 x MON 810 x NK603 ist eine GVP, die aus den drei einzelnen GVPs MON 863, MON810 und NK603 durch Kreuzungen hervorgegangen ist.

Zulassungen

In Europa sind zurzeit (Stand 11/2009) 31 Events zugelassen. Im Einzelnen sind fünfzehn Baumwoll-, sechs Mais-, drei Soja-, drei Raps-, eine Zuckerrübelinie sowie drei Nelkenlinien zugelassen. Weltweit sind ca. 30 gv Kulturpflanzen

(Pflanzenspezies): z.B. Alfalfa, Aubergine, Baumwolle, Blumenkohl, Bohne, Chili, Erdnuss, Lein/Flachs, Kartoffel, Kohl, Kürbis, Mais, Nelke, Okra, Papaya, Paprika, Pflaume, Raps, Reis, Rose, Senf, Soja, Tabak, Tomate, Weizen, Zuckerrübe. Zugelassene Events (inkl. Stacks) gibt es etwa 150. Nicht zugelassene Events mit relativ weit fortgeschrittenem Entwicklungs- bzw. Zulassungsstatus gibt es etwa 90.

Nicht zugelassene GVO am Beispiel Leinsamen FP967 (CDC Triffid)

Leinsamen (Flachs), auch Leinpflanze (*Linum usitatissimum*), ist eine traditionelle Faser- und Ölpflanze und eine der ältesten Kulturpflanzen. Als Lebensmittel ist Leinsamen (Flachs) z.B. in Samen, Müsli, Backmischungen und als Leinöl relevant.

Kanada ist weltweit der größte Produzent von Leinsaat bzw. Flachs. Rund 40 % der gesamten Weltleinsaaterzeugung stammt aus Kanada. China, die USA und Indien produzieren zusammen ebenfalls etwa 40 %.

2006 betrug die Einfuhr in die EU etwa 600.000 t, davon stammten ca. 400.000 t aus Kanada (66 %). Deutschland bezieht pro Jahr etwa 100.000 t Leinsaat, überwiegend aus Kanada. Weiterhin produziert auch die EU kleine Mengen an Leinsaat. Hier vor allem Deutschland, Großbritannien und Frankreich.

Die Einfuhr in die EU betrug 2006 insgesamt etwa 600.000 t, davon stammten ca. 400.000 t aus Kanada (ca. 66 %). Deutschland bezieht pro Jahr etwa 100.000 t Leinsaat, überwiegend aus Kanada. In Kanada (USA) ist herbizidresistenter gv-Flachs FP967 (Handelsname: CDC Triffid) für den Anbau (1996) sowie als Futtermittel (1996) und als Lebensmittel (1998) zugelassen. In Kanada wurde die Sortenzulassung CDC Triffid-Flachs 2001 wieder zurückgezogen. Seitdem ist dessen Anbau untersagt.

2001 habe 40 kanadische Landwirte etwa 5.400 t Leinsaat produziert. Diese wurden jedoch nach aktuellen Angaben des Canadian Biotechnology Action Network (www.cban.ca) noch im gleichen Jahr vernichtet, als CDC Triffid vom Markt genommen wurde.

Quellen der Verunreinigungen sind bisher nicht bekannt.

Denkbar aber nicht bestätigt sind z.B.

- Auskreuzungen
- Kontamination des Saatguts

Europäisches Schnellwarnsystem (RASFF)

Es ergingen zu (oder Verdacht auf) Leinsamen FP 967-haltigen insgesamt folgende Erstmeldungen (Stand 27.11.09):

Europa: 77 Meldungen → davon 71 Meldungen zu Lebensmitteln und 6 Meldungen zu Futtermitteln

Deutschland: 40 Erstmeldungen wurden von DE eingestellt

Bayern: 3 Erstmeldungen und 3 Folgemeldungen wurden bisher von Bayern erstellt (20.11.)

Nachweis nicht zugelassener GVO

Der Nachweis von nicht zugelassenen GVO durch die Behörden ist methodisch von Fall zu Fall unterschiedlich.

- Screening nach genetischen Elementen oder Konstrukten, die aus der Fachliteratur (z.B. www.agbios.com, BATS Report) bekannt sind (z.B. Leinsamen FP 967, Papaya 55-1/63-1).
- Die EU erhält Kenntnis über in der EU nicht zugelassenen GVO und fordert vom Verursacher die entsprechenden Nachweismethoden (z.B. LL 601).
- Private Labore stellen im Einzelfall Verfahren zur Verfügung.
- Überwachungslabore setzen selbst entwickelte Verfahren ein (z.B. Mais Bt 63, Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt/BVL; Reis KMD1, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit).

In diesen Prozess sind typischerweise das CRL-GMFF (<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu>) und das ENGL (<http://engl.jrc.europa.eu>) involviert, insbesondere dann, wenn es um die Verifizierung/Validierung von Methoden und die Beschaffung und das Verteilen von Referenzmaterialien geht.

Europäische Leitlinien

Die ENGL Arbeitsgruppe über nicht zugelassenen GVO (WG UGM) befasst sich grundsätzlich mit folgenden Schwerpunkten:

Feststellung von Erfordernissen und offenen Fragen zum Nachweis von nicht zugelassenen GVO (UGM) und Ermittlung des *Status quo* bezüglich verfügbarer Nachweismethoden.

Entwicklung von Leitlinien für ein harmonisiertes Vorgehen beim Nachweis, der Ergebnisinterpretation und Ergebnismitteilung von UGM.

Der Leitlinienentwurf behandelt im Detail nachfolgende Aspekte:

- I. Hintergrundinformation
 - Einteilung der GVO anhand der verfügbaren Informationen über ihre genetische Struktur
- II. Nachweis nicht zugelassener GVO
 - Praktische Leitlinien für die Analyse
- III. Interpretation und Mitteilung von Analyseergebnissen
 - Allgemeine Überlegungen zur QS
 - Nachweisbarkeit: z.B. LOD, Probengröße
 - Interpretation der Ergebnisse mit modernen Techniken (Software, Bioinformatik, Datenbanken)
 - Ergebnismitteilung
- IV. Anhänge
 - Verfügbare Nachweisttechnologien und deren Anwendung
 - Verfügbarkeit von Referenzmaterial

Die GVO wurden im Leitlinienentwurf die GVO anhand der verfügbaren Informationen über ihre molekulare Struktur eingeteilt:

Gruppe 1: Über den GVO liegen detaillierte Kenntnisse vor.

- Alle GVOs die nach Art. 7 und 19 der VO 1829/2003 zugelassen sind
- GVOs, die einmal zugelassen waren, aber keine Neuzulassung besitzen (Art. 8 und 20 der VO 1829/2003)
- GVOs, für die im Rahmen des EU Zulassungsverfahrens dem CRL und der EFSA ein umfassendes Dossier vorliegt (siehe Art. 7 und 19 der VO 1829/2003)
- In bestimmten Fällen können Informationen aus nicht angenommenen Zulassungsanträgen, Peer Review Veröffentlichungen, Patentschriften oder direkt vom Antragsteller oder eines Drittlandes vorliegen

Gruppe 2: Der GVO wurde mit einem genetischen Konstrukt transformiert, das auch in zugelassenen GVOs vorkommt.

- GVOs, die mit dem gleichen Konstrukt transformiert wurden, aber unterschiedlichen rechtlichen Status besitzen: z.B. Mais DAS-59122-7 ist zugelassen, DAS-59132-8 (E-32) ist nicht zugelassen. Die DNA Sequenz des UGM Konstruktes ist das gleiche wie das eines zugelassenen GVO, was den Nachweis (Screening) erleichtert. Aufgrund unterschiedlicher Insertionsstellen im Genom, wird eine eigene eventspezifische Methode für den Nachweis des UGM benötigt.
- Kreuzungen (Stacked events), bei denen nur die non-stacked Elternlinien zugelassen sind. Wenn eine (non-stacked) Elternlinie eines stacked GVO zugelassen ist, dann ist die Sequenz mindestens eines genetischen Konstrukts bzw. Inserts bekannt

Gruppe 3: Der GVO wurde mit einer neuen Kombination an genetischen Elementen transformiert, von denen mindestens ein Element auch in zugelassenen GVOs vorkommt.

- GVOs, die mit z.B. p35S, ctp2-cp4-epsps, cryIAb, pat, bar, pnos, tnos, t35S, nptII transformiert wurden und für das eine validierte Screening Methode verfügbar ist.

Gruppe 4: Der GVO wurde ausschließlich mit neuen / unbekannten genetischen Elementen transformiert.

- GVOs, die ausschließlich mit neuen und damit unbekannten genetischen Elementen transformiert wurden, sind mit den allgemein verwendeten Methoden nicht nachweisbar.
- Eine Möglichkeit Informationen über einen solchen GVO zu erhalten ist z.B. ein allgemeiner Test auf Vektorsequenzen.

Als grundlegende Strategie zum Screening auf zugelassene und nicht zugelassene GVO ist das so genannte Matrix-Verfahren von entscheidender Bedeutung. Dabei wird durch das Testen einer Kombination von genetischen Elementen ein Profil erstellt anhand dessen eine Zuordnung oder keine Zuordnung (bei nicht zugelassenen GVO) zu zugelassenen GVO erfolgen kann. Das Matrix-Verfahren stellt demnach kein Paradigmenwechsel in der GVO-Analytik dar und implementiert bereits vorhandene Screeningverfahren und -strategien.

Die Arbeit des Nationalen Referenzlaboratoriums für gentechnisch veränderte Organismen am Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit

Joachim Mankertz

**Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), Referat
503: Biologische Untersuchungen, Antibiotikaresistenz, Nationales
Referenzlabor für GVO, Postfach 110260, 10832 Berlin**

E-Mail : joachim.mankertz@bvl.bund.de

Tel. : +49 (0) 308412-2050

Fax: +49 (0) 308412-2300

Zusammenfassung

Die Verordnung (EG) Nr. 882/2004 des europäischen Parlaments und des Rates trifft Regelungen zu den amtlichen Kontrollen zur Überprüfung der Einhaltung des Lebensmittel- und Futtermittelrechts. Die Verordnung sieht die Errichtung von Referenzlaboratorien auf europäischer und nationaler Ebene vor. Die Nationalen Referenzlaboratorien stellen eine Schaltstelle zwischen den EU-Referenzlaboratorien und den amtlichen Untersuchungseinrichtungen der Mitgliedstaaten dar. Im Jahr 2007 wurden dem Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) die Aufgaben eines Nationalen Referenzlaboratoriums für gentechnisch veränderte Organismen (NRL GVO) übertragen.

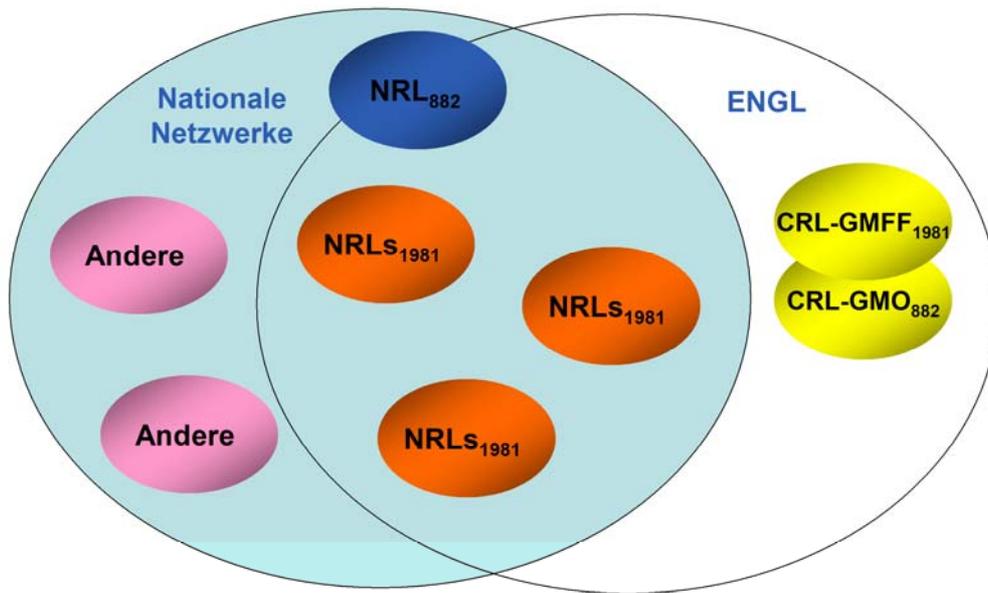


Abbildung 1: Nationale und europäische Netzwerke in der GVO Analytik

Auf europäischer Ebene arbeitet das NRL GVO mit dem zuständigen Referenzlaboratorium der europäischen Gemeinschaft zusammen und ist Mitglied im European Network of GMO Laboratories (ENGL). Eine zentrale Aufgabe auf nationaler Ebene ist die Unterstützung und Koordinierung der amtlichen Kontrolllaboratorien, die für die Überprüfung der Einhaltung des Lebensmittel- und Futtermittelrechts zuständig sind. Ein Schwerpunkt ist die Harmonisierung von Nachweisverfahren für gentechnisch veränderte Lebens- und Futtermittel. Dazu etabliert das NRL GVO durch das Gemeinschaftsreferenzlabor validierte Nachweisverfahren und beteiligt sich an der Entwicklung und Validierung neuer Untersuchungsmethoden zur Analytik gentechnisch veränderter Lebens- und Futtermittel. Das NRL GVO unterstützt die Qualitätssicherung, indem es Referenzmaterialien beschafft und den Kontrolllaboratorien zur Verfügung stellt.

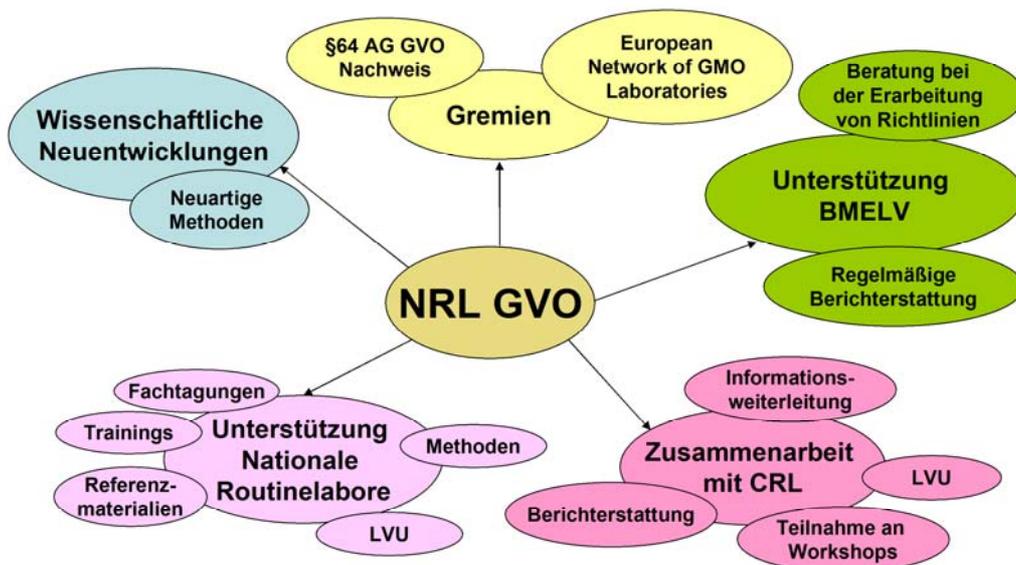


Abbildung 2: Aufgabengebiete des NRL GVO

Eine IT-gestützte Kommunikationsplattform soll den Informationsaustausch der zuständigen Laboratorien fördern und Fachleuten einen schnellen Zugang zu neuen Erkenntnissen und Verfahren im Bereich der GVO Analytik ermöglichen. Die IT-Plattform ist im behördeninternen „Fachinformationssystem Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (FIS-VL)“ eingerichtet worden.

Analytik I

Überwachung von gentechnischen Arbeiten in geschlossenen Systemen: Nachweis von viralen Kontaminationen

Christine Aurnhammer

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit,

85764 Oberschleißheim

Adenovirus Typ 5 wird in Gentechnik-Laboratorien Bayerns zu Zwecken des Gentransfers, der Gentherapie, Vakzine-Forschungen und Grundlagenforschung eingesetzt. In der praktischen Anwendung überzeugt es aufgrund seiner hohen Transduktionseffizienz *in vitro* sowie *in vivo*, durch sein breites Infektionsspektrum, den Zellzyklus-unabhängigen Infektionsverlauf und durch seine einfache Vermehrbarkeit. Seit seinem ersten Einsatz in den 90er Jahren im Rahmen von Gentransfer-Experimenten wurden Adenoviren weiterentwickelt. Mittlerweile existieren drei Generationen, welche durch gezielte Deletionen der E1-, E2- und/oder E3-Gene erzeugt wurden. Das E1-Gen ist für eine produktive Infektion humaner Zellen essentiell und wird für die Transformation infizierter Zellen benötigt. E2-Gene spielen eine wesentliche Rolle bei der Replikation und E3-Proteine sind an der Modulation der Immunantwort durch den Wirt beteiligt. Durch Modifikation von E1- und E3-Genen werden Adenoviren attenuiert und können nur noch in humanen Helferzellen replizieren. Unter Verwendung von Helferzelllinien bzw. Helferviren können wieder replikationskompetente Viren erzeugt werden.

Adenovirus Typ 5 (Ad5) zeigt zwar nicht wie andere Adenovirus-Typen ein onkogenes Potenzial, kann aber zur Ausbildung von Gastroenteridien und zu Pharyngitis führen. Adenoviren gehören zu den unbehüllten Viren und zeichnen sich durch eine hohe Stabilität gegenüber chemischen (alkoholische Desinfektionsmittel) und physikalischen Einwirkungen aus und tolerieren extreme pH-Werte, weshalb einfache Desinfektions- und Dekontaminationsverfahren unwirksam sind. Das stabile ikosaedrische Kapsid der 70 – 90 nm großen Viren und die Abwesenheit einer

empfindlichen Hülle führen darüber hinaus zu einer lang anhaltenden Infektiösität außerhalb des Wirtskörpers. Zudem vermag es, Ratten- und Hamsterzellen *in vitro* zu transformieren (ZKBS; Az.: 6790-10-28).

Probenahme und Analytik

In Bayern obliegt die analytische Überwachung von gentechnischen Arbeiten und Anlagen dem Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL). Damit ist es verpflichtet, im Rahmen von Begehungen die Gefährdung der Rechtsgüter durch Kontaminationen in bzw. außerhalb von Gentechnik-Laboratorien zu untersuchen. Mit dieser Methode soll ermöglicht werden, adenovirale Kontaminationen auf Oberflächen in gentechnischen Anlagen zu untersuchen.

Von einem Nachweisverfahren von Oberflächenkontaminationen müssen folgende Anforderungen erfüllt werden:

- Die Probenahmetechnik soll eine möglichst hohe Wiederfindung gewährleisten.
- Für eine Untersuchung auf Infektions- und Vermehrungsfähigkeit soll das Abwischmedium auf Kulturzellen übertragen werden.
- Als Zelllinien sollen sowohl konventionelle Zelllinien als auch Helferzelllinien verwendet werden, um gentechnisch veränderte Viren nachzuweisen.
- Für die Untersuchungsmethode soll eine Nachweisgrenze festgelegt werden.

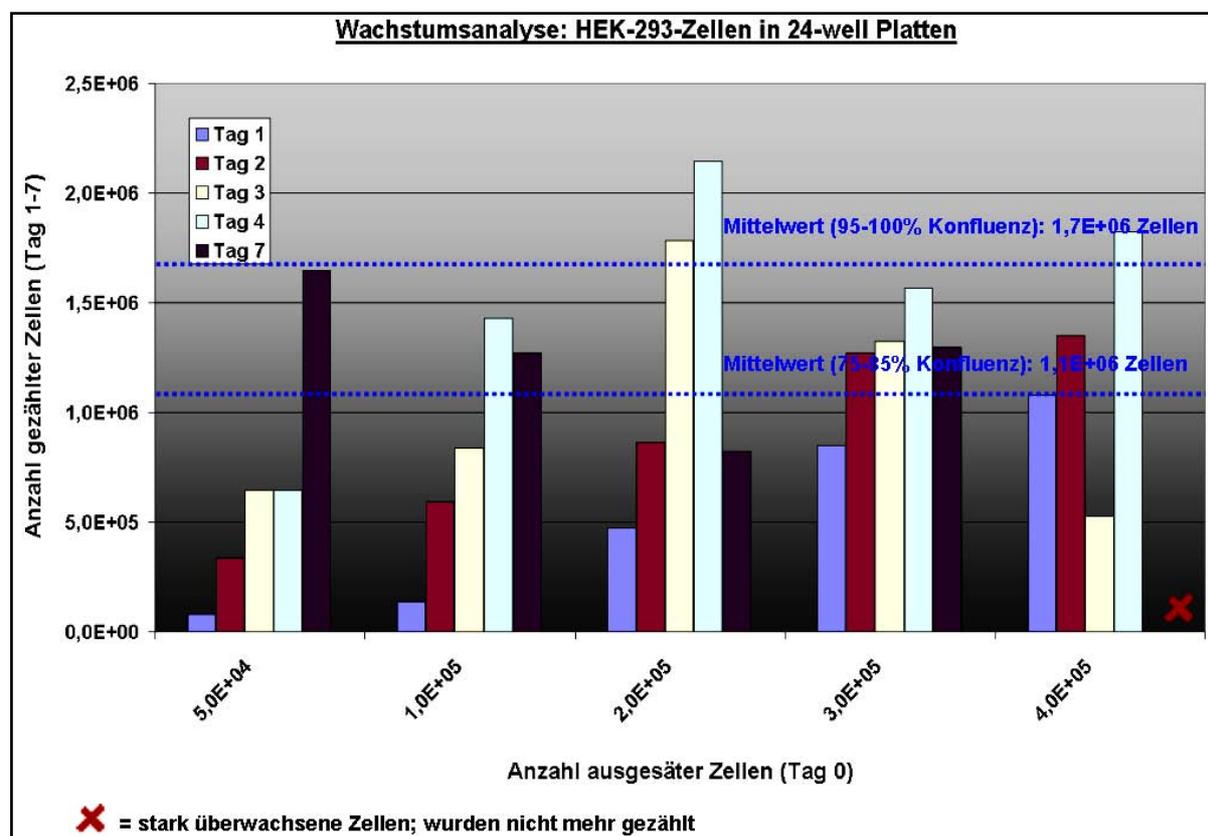
Zu Beginn der Arbeit wurden Zellkulturtechniken und die für das Projekt benötigten Zelllinien HEK-293 (human embryonic kidney cells) und HELA (human cervix carcinoma cells) etabliert. Zu diesen Techniken zählen die Vorgehensweisen beim Auftauen, Rekultivieren (Splitten), In-Kultur-Haltung, Beurteilen der zellulären Vitalität sowie das Anlegen eines Vorrates von Kulturzell-Aliquots in Flüssigstickstoff.

Es wurden zudem Wachstumsanalysen in 75 cm²-Kulturflaschen, 24-well Platten sowie in 96-well Platten (für TCID₅₀-Wert Bestimmungen; hier nicht gezeigt) durchgeführt, wobei die Anzahl auszusäender Zellzahlen und die Konfluenz nach unterschiedlichen Tagen bestimmt wurde.

Im Rahmen dieser Methode werden für die Routineuntersuchungen der

Abwischproben Zellen in 24-well-Platten vorbereitet. Für die Durchführung von Infektionsexperimenten mit Abwischproben über den Zeitraum von 12 Tagen hat sich eine Konfluenz der Zellen bei Infektion von 75 - 85 % als geeignet erwiesen.

Ferner wurde es nach diesen Analysen als empfehlenswert erachtet, die Zellen 1 oder 2 Tage vor Infektion auszusäen. Für das Aussäen der Kulturzellen in 24-well-Platten wurden die zu verwendenden Zellzahlen pro Zelllinie ermittelt werden (Bild 1). Zu geringfügigen Abweichungen kann es bei der Verwendung eines neuen Zell-Aliquots oder aufgrund einer hohen Passagen-Zahl kommen. Daher sollten diese Zahlen vor der Verwendung eines neu aufgetauten Zell-Aliquots überprüft werden und die Zelllinien nicht mehr als 40 Passagen nach dem Auftauen in Kultur gehalten werden.



| Tage vor Infektion | HeLa | HEK-293 |
|--------------------|----------|---------|
| 1 | 1,5x10e5 | 4x10e5 |
| 2 | 1,2x10e5 | 3x10e5 |

Abbildung 1: Etablierung von Zelllinien in 24-well-Platten; Beispiel HEK-293-Zellen. n(Ansätze) = 3, Balken geben Mittelwerte gezählter Zellzahlen an. In der Tabelle sind die ermittelten Zellzahlen angegeben, welche für das Aussäen der beiden Kulturzelllinien im Rahmen der Begehungsvorbereitung eingesetzt werden sollen.

Eine qualitative Methode zum Nachweis von adenoviralen Oberflächenkontaminationen wurde durch die Kombination dieser zellbiologischen Methoden und real time-PCR Analysen etabliert. Dadurch können nicht nur auf DNA-Ebene qualitative Aussagen über das Vorhandensein von Adenoviren getroffen, sondern auch die Replikationsfähigkeit der Viren nachgewiesen werden.

Dafür werden Kulturzellen mit Abwischproben über einen Zeitraum von 12 Tagen inkubiert. Von dem Infektionsmedium werden zu unterschiedlichen Tagen nach Infektion (d0, d9 und d12) Aliquots entnommen, eine Nukleinsäureextraktion durchgeführt und mittels real time-PCR die Anzahl der nachweisbaren adenoviralen Genomkopien (*fiber-Gen*) bestimmt. Als real time-PCR Verfahren wurde die entsprechende UAM-Methode (2005) [1, 2] angewendet. Ein Absinken des Ct-Wertes belegt allgemein das Vorhandensein replikativer Adenoviren in der Abwischprobe. Sollte es zu einem Sinken des Ct-Wertes alleine in der Helfer-Zelllinie HEK-293 kommen, weist dies auf replikationskompetente Adenoviren hin, welche eine gentechnische Veränderung im E1-Genlokus aufweisen. Gleichbleibende oder steigende Ct-Werte weisen auf vorhandene DNA-Kontaminationen hin, wobei die Nukleinsäuren im Laufe der Inkubation degradieren, was zu einem Anstieg des Ct-Wertes führt.

Um die Nachweisgrenze des Verfahrens zu verbessern, wurden zwei unterschiedliche Tupfersysteme (Nylon-beflockte Tupfer und Wattestäbchen) miteinander verglichen, wobei sich die Wiedergewinnung adenoviralen Materials im Fall der Nylon-beflockten Tupfer um ca. eine Zehnerpotenz besser erwies.

Die Grundlage für die Validierung des gesamten Prozesses der Entnahme von Abwischproben, der Infektion von Kulturzellen mit dem Abwischmaterial und der Auswertungsanalysen waren die *AOAC International Qualitative and Quantitative Guidelines for Methode Validation (1999)* [3].

Als Nachweisgrenze für die Methode konnten 1×10^5 adenovirale Genomkopien ermittelt werden.

Die Entwicklung der Infektionsansätze kann parallel lichtmikroskopisch verfolgt werden, wobei im Fall infizierter Zellen zytopathische Effekte (morphologische Veränderungen) auftreten:

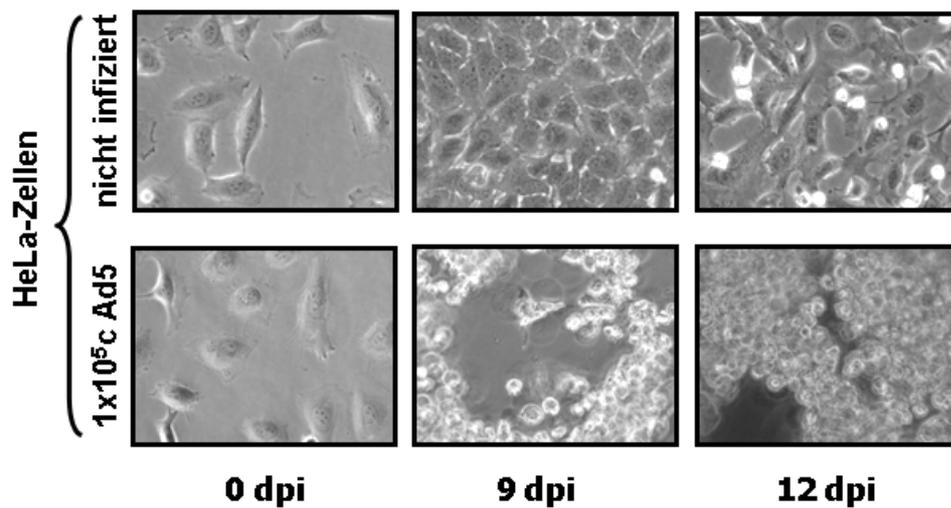


Abbildung 2: Lichtmikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen nach Inokulation mit adenoviralen Abwischproben. Im Vergleich zur Inokulation mit Abwischproben ohne adenovirales Material sind nach Infektion mit replikationskompetenten Adenoviren am Tag 9 bzw. Tag 12 zytopathische Effekte erkennbar. Die Verwendung der Helferzelllinie HEK-293 ermöglicht zudem den Nachweis von GV-Ad5 mit einer gentechnischen Veränderung im E1-Genlocus

Die Methode wurde im Rahmen der Untersuchung von Begehungsproben zur Kontrolle von Oberflächenkontaminationen mit Ad5-Viren angewendet. Folgende Vorgehensweise wurde für die Durchführung von Begehungen etabliert:

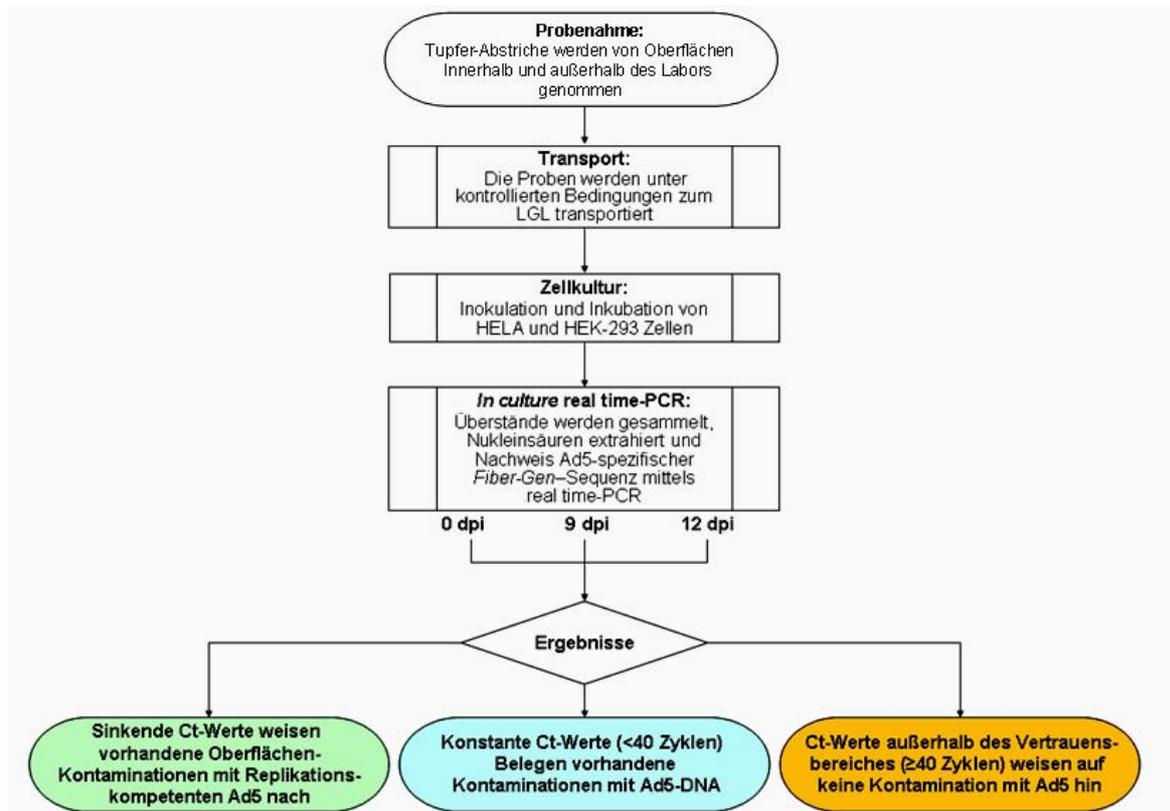


Abbildung 3: Vorgehensweise bei der Durchführung von Begehungen gentechnischer Anlagen zur Überprüfung adenoviraler Oberflächenkontaminationen. Der Plan berücksichtigt die Bedingungen während der Probenahme, des Probentransportes und der anschließenden Analyse.

Bei der Durchführung von Begehungen erwiesen sich folgende Probenahmeorte als besonders relevant für die Abwischprobenahme:

- Zentrifugentrommel
- Zentrifugeneinsätze
- Mikroskop
- Bedienelemente an Sicherheitswerkbänken
- Türgriffe von Inkubatoren bzw. Kühlschränken
- Labortüre (innen und außen)

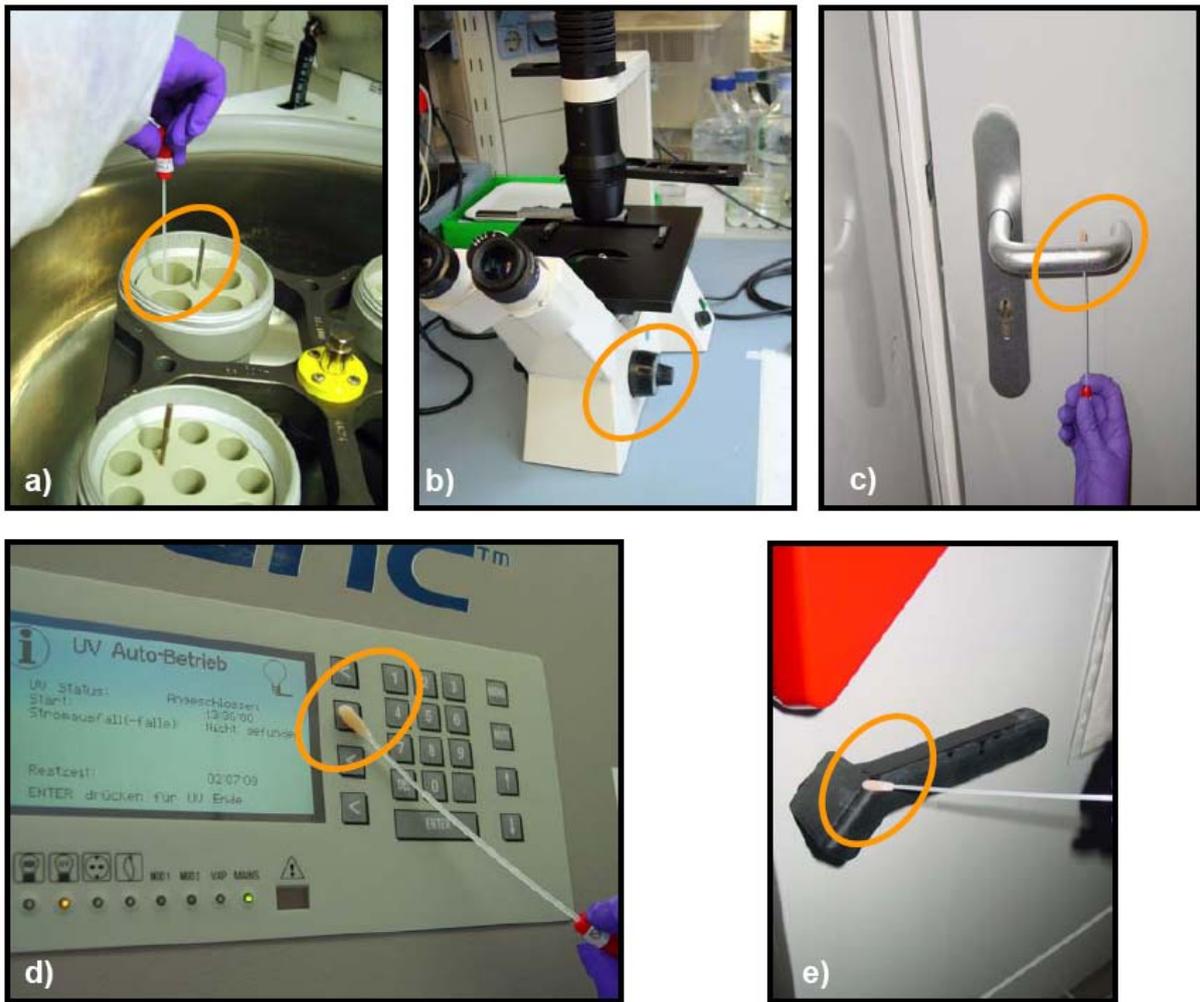


Abbildung 4: Bildliche Dokumentation während der Probenahme. Beispiel von Zentrifugen-einsätzen (a), Mikroskop-Drehregler (b), Labor-Türgriff (c), Bedienelemente an Sicherheitswerkbanken (d) und Inkubator-Türgriffen (e).

Im Rahmen von Begehungen konnten in 8,33 % der Abwischproben Kontaminationen mit replikationskompetenten Adenoviren (Ad5) festgestellt werden. Hiervon erwiesen sich alle als im E1-Genlocus gentechnisch veränderte Adenoviren (Ad5), da sie selektiv in HEK-293-Zellen replizierten.

Danksagung

Dieses Vorhaben wurde durch das StMUG gefördert.

Referenzen

- [1] Quantitativer Nachweis von Adenovirus DNA mittels Real Time PCR
Unterausschuss Methodenentwicklung (Februar 2005)
- [2] Holland P.M., Abramson R.D., Watson R. and Gelfand D.H. (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 357-362.
- [3] AOAC INTERNATIONAL Qualitative and Quantitative Microbiology Guidelines for Methods Validation. *Journal of AOAC International* Vol. 82, No. 2, 1999

Überwachung gentechnischer Arbeiten in geschlossenen Systemen: Prüfung der Reinheit und Identität

Claudia Wex, Francisco X. Moreano

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit,

85764 Oberschleißheim

Die Erzeugung und Verwendung gentechnisch veränderter Organismen (GVO) in geschlossenen Systemen unterliegen seit 1990 den europarechtlichen Richtlinien 90/219/EWG und 98/81/EG. Diese verpflichten die Mitgliedsstaaten, durch nationale Gesetzgebungen dafür Sorge zu tragen, dass die menschliche Gesundheit und die Umwelt vor schädlichen Auswirkungen gentechnischer Verfahren geschützt werden. In Deutschland wurde dieser Verpflichtung im selben Jahr durch Erlass des Gentechnikgesetzes (GenTG) und ergänzender Verordnungen nachgekommen. Das Gentechnikrecht definiert die Erzeugung und Verwendung (einschließlich Lagerung, Transport und Inaktivierung) von GVO als gentechnische Arbeiten. Diese werden in Abhängigkeit vom Gefährdungspotential für Mensch und Umwelt in 4 Sicherheitsstufen unterteilt. Vor der Aufnahme gentechnischer Arbeiten ist deren Risiko nach dem Stand der Wissenschaft zu bewerten und der Stufe 1 (kein Risiko), 2 (geringes Risiko), 3 (mäßiges Risiko) oder 4 (hohes Risiko) zuzuordnen.

Grundsätzlich sind gentechnische Arbeiten nur in gentechnischen Anlagen (geschlossene Systeme) zulässig. Dabei werden wiederum vier Systemtypen unterschieden: Laborbereich, Produktionsbereich, Gewächshäuser und Tierhaltungsräume. Entsprechend der ermittelten Sicherheitsstufe der gentechnischen Arbeit hat der Anlagenbetreiber systemtyp- und sicherheitsstufenspezifische Maßnahmen anzuwenden, welche in der Gentechnik-Sicherheitsverordnung (GenTSV) und ihren Anhängen geregelt werden. Dort finden sich detaillierte Auflistungen der erforderlichen technischen, organisatorischen und analytischen Sicherheitsmaßnahmen.

Die Errichtung und der Betrieb gentechnischer Anlagen sowie die Durchführung gentechnischer Arbeiten unterliegen der behördlichen Kontrolle. Als Instrumente der präventiven Kontrolle hat der Gesetzgeber dem Anlagenbetreiber Genehmigungs-, Anmelde-, Anzeige- und Mitteilungspflichten auferlegt. Gemäß §25 GenTG sind außerdem die Bundesländer verpflichtet, Behördenstrukturen zu schaffen, die neben den gentechnikrechtlichen Zulassungsverfahren auch die Überwachung der Anlagen und Arbeiten durchführen. In Bayern obliegt die analytische Überwachung von gentechnischen Arbeiten und Anlagen dem Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL). Am LGL wurden analytische Strategien entwickelt und molekularbiologische Nachweisverfahren im Rahmen der Überwachungstätigkeit etabliert, um die Einhaltung der gesetzlich geforderten Sicherheitsmaßnahmen analytisch zu erfassen. Insbesondere wurden Strategien entwickelt um folgende sicherheitsrelevante Parameter zu untersuchen:

- Überprüfung von Sicherheit und Hygiene am Arbeitsplatz (primäre Einschließung)
- Überprüfung der Wirksamkeit von Einschließungsmaßnahmen (sekundäre Einschließung)
- Überprüfung der gentechnischen Arbeiten auf Konformität mit den Zulassungsbedingungen und Aufzeichnungsdokumenten

Überprüfung von Sicherheit und Hygiene am Arbeitsplatz (primäre Einschließung)

Um einerseits die Einhaltung der gesetzlichen Forderung des §8 Abs.2 GenTSV hinsichtlich der Minimierung der Exposition der Beschäftigten und der Umwelt gegenüber der GVO und andererseits die Wirksamkeit der in der Betriebsanweisung und im Hygieneplan festgelegten Maßnahmen kontrollieren zu können, sind die Arbeitsbereiche, in denen mit GVO umgegangen wird, durch geeignete Nachweisverfahren auf das Vorkommen von GVO zu überprüfen. Hierbei handelt es sich um Arbeitsoberflächen (Sicherheitserkbänke, Inkubatoren, Zentrifugen) und Oberflächen der Arbeitsumgebung (Armaturen, Türgriffe), die beprobt werden. Je nachdem welche Organismen nachgewiesen werden sollen bzw. um welche Oberflächen es sich handelt, kommen Abklatsch- bzw. Abstrichprobennahme zum

Einsatz. Grundlage für die experimentelle Untersuchung sind die Antrags- bzw. Aufzeichnungsunterlagen.

Das Ziel dieser Untersuchungen ist es Kontaminationen mit lebensfähigem GVO am Arbeitsplatz zu erkennen, damit die gesetzlich geforderte Minimierung der Exposition von Mensch und Umwelt gewährleistet ist.

Überprüfung der Wirksamkeit von Einschließungsmaßnahmen (sekundäre Einschließung)

Gemäß GenTSV Anhang III Nr. 19 ist erforderlichenfalls außerhalb der primären physikalischen Einschließung auf das Vorhandensein lebensfähiger, in der Anwendung eingesetzter Organismen zu prüfen. Die primäre Einschließung (engl.: primary containment) umfasst eine der biologischen Gefährdung entsprechende Kombination von Sicherheitsmaßnahmen bestehend aus physikalischen Barrieren (z.B. aerosoldichte Zentrifugenröhrchen) und/oder technischen Einrichtungen (z.B. mikrobiologische Sicherheitswerkbank), die einen direkten Kontakt zwischen GVO und dem Menschen bzw. seiner Arbeitsumgebung minimieren oder verhindern. Das Prüfen außerhalb der primären physikalischen Einschließung beinhaltet ebenso die sekundäre Einschließung (engl.: secondary containment). Diese umfasst eine der biologischen Gefährdung entsprechende Kombination von baulichen (z.B. Abdichtung von Fenster, Böden, u.s.w.), organisatorischen (z.B. Zutrittseinschränkung) und technischen (z.B. Abluft-, Abwasser- und Abfallbehandlung) Sicherheitsmaßnahmen, die ein unbeabsichtigtes Entweichen von GVO in die Umwelt minimieren oder verhindern. Darüber hinaus sieht die GenTSV (§13) vor, dass GVO, Abfall sowie Abwässer die mit GVO kontaminiert wurden, so behandelt werden müssen, dass die GVO sicher inaktiviert sind. Die Inaktivierung wird in der Regel durch eine thermische Behandlung, beispielsweise, Autoklavierung bei 121 Grad für die Dauer von 20 min erfüllt. Es werden daher autoklavierte Bioindikatoren in verschiedenen Matrices und Abwässer experimentell auf deren Inaktivierung hin kontrolliert. Darüber hinaus werden außerhalb der Laboratorien Oberflächen, beispielsweise, Türklinken auf das Vorhandensein lebensfähiger GVO hin überprüft. Grundlage für die experimentelle Untersuchung sind die Antrags- bzw. Aufzeichnungsunterlagen.

Das Ziel dieser Untersuchungen ist es die Wirksamkeit von Einschließungsmaßnahmen zu kontrollieren um eine unbeabsichtigte Freisetzung bzw. Entweichung von vermehrungsfähigen GVO in die Umwelt zu erkennen.

Überprüfung der gentechnischen Arbeiten auf Konformität mit den Zulassungsbedingungen und Aufzeichnungsdokumenten

Gemäß §8 GenTG, setzt die Durchführung von gentechnischen Arbeiten in geschlossenen Systemen eine Genehmigung, eine Anzeige oder Anmeldung des geplanten gentechnischen Vorhabens bei der zuständigen Landesbehörde voraus. Für alle gentechnischen Arbeiten müssen die Organismen auf ihre Identität und Reinheit überprüft werden, wenn dies für die Beurteilung des Gefährdungspotenzials notwendig ist (Anhang III, Stufe I, Nr. 11, GenTSV).

Darüber hinaus müssen die vom Betreiber der gentechnischen Anlage einzureichenden Antragsdokumente im Fall von Arbeiten der Sicherheitsstufe 2 und höher sowohl eine detaillierte Beschreibung der vorgesehenen gentechnischen Arbeiten, entsprechende Risikobewertungen als auch Beschreibungen der verfügbaren Techniken zur Erfassung, Identifizierung und Überwachung der gentechnisch veränderten Organismen beinhalten (§§10 und 12 GenTG). Mit dem Beginn der gentechnischen Arbeit bestehen für die Betreiber von gentechnischen Anlagen gemäß der Gentechnik-Aufzeichnungsverordnung (GenTAufzV) zusätzliche Aufzeichnungs- und Aufbewahrungspflichten mit denen weitere Dokumente entstehen, die eine detaillierte Auskunft über die durchgeführten Tätigkeiten geben. Die in den behördlichen Bescheiden und in den Antrags- und Aufzeichnungsdokumenten erfassten Daten, welche sich insbesondere als Referenz für die Durchführung einer Konformitätsprüfung eignen, sind die Angaben über Eigenschaften bzw. Identität und Reinheit von:

- a) Spender- und Empfängerorganismen,
- b) übertragenen Nukleinsäuren,
- c) Vektor-Systemen, ggf. Eigenschaften der biologischen Sicherheitsmaßnahme
- d) gentechnisch veränderten Organismen

Das Ziel dieser Untersuchungen ist die Erkennung von Umständen (z.B. Kontaminationen von Sicherheitsstämmen oder Referenzstämmen), die ein Problem

für die Qualität und Sicherheit der gentechnischen Arbeiten darstellen und zu der Durchführung von nicht zugelassenen gentechnischen Arbeiten führen (Abb.1).

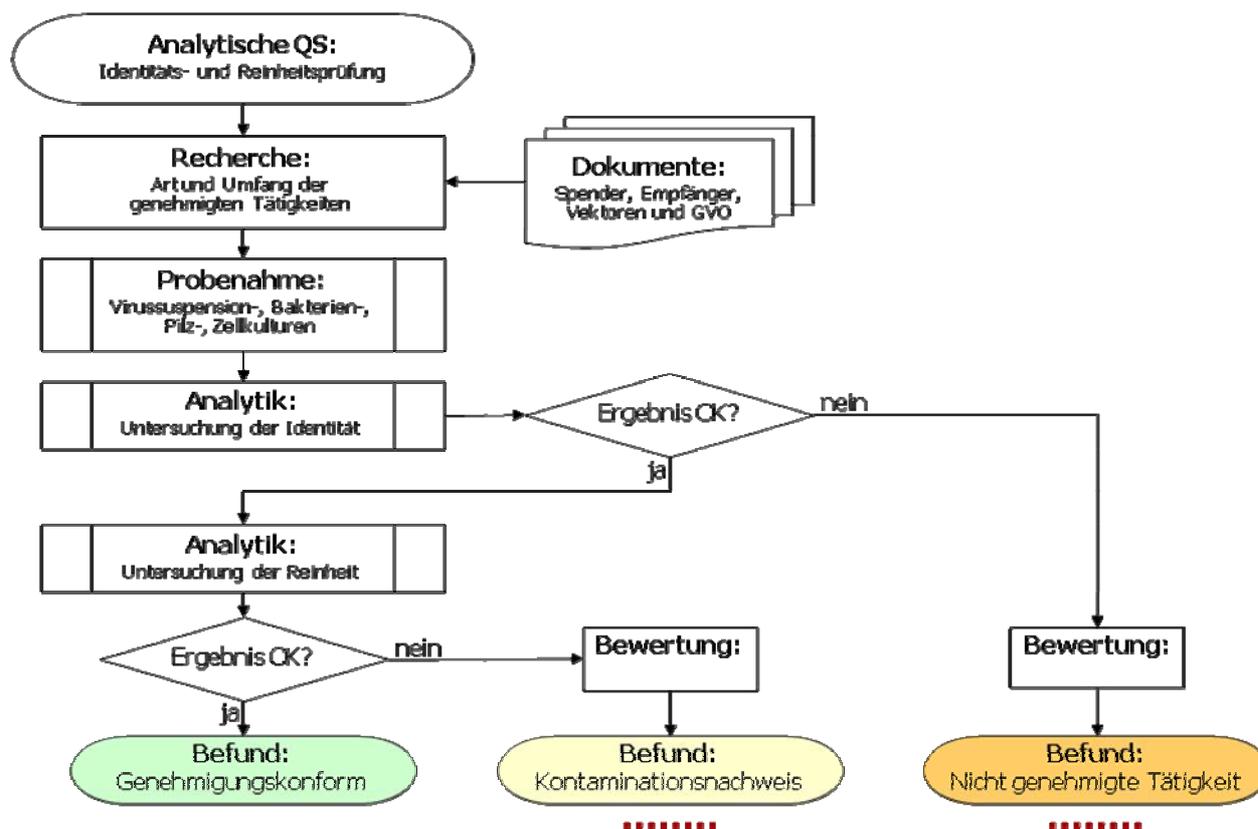


Abbildung 1: Überprüfung von experimentellen Arbeiten auf Konformität mit Zulassungsbedingungen und Aufzeichnungsdokumenten. Als Referenz für die Konformitätsprüfung dienen die in den behördlichen Bescheiden, den Antrags- und Aufzeichnungsdokumenten erfassten Daten über Eigenschaften, Identität und Reinheit der eingesetzten Organismen und der übertragenen Nukleinsäuren. Die Interpretation der Untersuchungsergebnisse erlaubt die Erkennung von Identitäts- oder Kontaminationsproblemen, welche die Qualität und Sicherheit der gentechnischen Arbeiten beeinflussen und zu der Durchführung von nicht zugelassenen gentechnischen Arbeiten führen können.

Konformitätsprüfung von gentechnischen Arbeiten mit den Zulassungsbedingungen und Aufzeichnungsdokumenten: Prüfung von Identität und Reinheit

Es ist sowohl aus der Literatur als auch aus den Befunden renommierter Stammsammlungen bekannt, dass es regelmäßig zu viralen und oder bakteriellen Kontaminationen von Zellkulturen kommt. Bisherige Daten zeigen, dass Zellkulturen bakteriell, beispielsweise mit Mykoplasmen, verunreinigt sein und oder Kontaminationen mit fremden Zelllinien aufweisen können [1-3]. In verschiedenen

Fällen wurden kontaminierte Zellkulturen zur Produktion von medizinischen Präparaten verwendet. Diese Präparate enthielten je nach Kontamination des verwendeten Organismus Viren bzw. virale Nukleinsäuren, wie z.B., Squirrel Monkey Retrovirus (SMRV) in Interferonpräparaten [4] und Simian cytomegalovirus (SCMV) in Poliovirusimpfstoff [5]. Im Februar 2007 wies die Zentrale Kommission für Biologische Sicherheit (ZKBS) in ihrer Stellungnahme auf das vermehrte Auftreten von Kontaminationen in Zellkulturbeständen mit SMRV hin und identifizierte den Austausch von Zellkulturen zwischen Laboren als eine Quelle der Verbreitung von Kontaminationen. Aber auch innerhalb eines Laboratoriums kann eine unsachgemäßer Arbeitsweise bzw. die Missachtung der guten Laborpraxis zum Auftreten von kontaminierten Zellkulturen und den daraus resultierenden gentechnisch veränderten Organismen führen. In diesen Fällen entsprechen sowohl die Empfänger als auch die daraus resultierenden gentechnisch veränderten Organismen nicht mehr der beantragten bzw. genehmigten gentechnischen Arbeit und der Risikobewertung. Insbesondere bei niedrigen Sicherheitsstufen (S1) sind die vorherrschenden Sicherheitsbedingungen nicht für die unkontrollierte gentechnische Veränderung der Zellkulturen ausreichend. Daher wurden vier Nachweisverfahren im Rahmen der gentechnischen Überwachung etabliert, um die Reinheit und Identität von Zellkulturen zu überprüfen.

a.) Identifizierung humaner Zelllinien mittels STR (Promega, Power Plex 1.2) Häufig wird neben der Karyotypisierung auch der genetische Fingerabdruck zur Authentifizierung von Zelllinien angewendet. Diese Technik wurde ursprünglich in der Forensischen Medizin zur Identifizierung von Individuen eingesetzt. Alec Jeffreys entdeckte 1985 kurze sich wiederholende Sequenzeinheiten in den nicht codierenden DNA-Abschnitten (Introns) von Genen, die ein spezifisches, einzigartiges Muster für jeden Menschen individuell ergeben. Diese Technik fand im Laufe der Jahre auch Anwendung in der Identifizierung von Zelllinien [6], dabei werden häufig STR (short tandem repeat) Loci als polymorphe Marker verwendet. STR's beinhalten eine Abfolge von 2 bis 10 Basenpaaren, die sich 10- bis 1000-mal wiederholen. Die führenden Stammsammlungen (DSMZ, ATCC) nutzen anhand des Power Plex 1.2 Systems (Fa. Promega) acht STR loci und das Amelogenin-Gen als Geschlechtsmarker um Zelllinien zu identifizieren. Die individuellen STR loci der

einzelnen humanen Zelllinien wurden von den Stammsammlungen anhand von Datenbanken zusammengefasst und dienen als Referenz für die Untersuchung der Authentizität von humanen Zelllinien. Daher wurde das Power Plex 1.2 System zur Identifizierung und zum Nachweis intraspezifischer Kontamination von humanen Zelllinien etabliert und validiert.

b.) Identifizierung von Zelllinien verschiedener Spezies mittels PCR-Verfahren
Es gibt bereits verschiedene veröffentlichte PCR-Verfahren mit deren Hilfe interspezifische Kontaminationen in Zellkulturen nachgewiesen werden können [7, 8]. In einer Veröffentlichung wird als Speziesmarker ein Genabschnitt des Cytochrome C Oxidase Gens das hochkonserviert in allen Säugetieren vorkommt aber über interspezifische, variable Sequenzabschnitte verfügt, benutzt [8]. Um interspezifische Kontaminationen in Zellkultur nachweisen zu können, wurde diese speziesspezifische PCR etabliert. Die PCR wurde bereits in einer Simplex-Reaktion durchgeführt und wird nun in einer Multiplex- Reaktion validiert.

c.) Nachweis von Mykoplasmen/Acholeplasmen in Zellkulturen mittels PCR
In verschiedenen Veröffentlichungen sind bereits PCR-Verfahren zum Nachweis von Mykoplasmen- und Acholeplasmen publiziert worden [9, 10]. Auf der Basis der 16S rRNA-Sequenz wurde ein PCR System entwickelt um sowohl Mykoplasmen als auch Acholeplasmen in Zellkulturen nachweisen zu können. Die 16S rRNA Sequenz ist ebenso wie das Cytochrome C Oxidase Gen hochkonserviert und verfügt über interspezifische variable Sequenzabschnitte, die charakteristisch für Mykoplasmen bzw. Acholeplasmen sind. Mit diesem PCR-Verfahren [9] können die häufigsten Arten von Mykoplasmen bzw. Acholeplasmenkontaminaten in Zellkulturen nachgewiesen werden. Diese Methode wurde bereits validiert und wird in der Routineüberwachung eingesetzt.

d.) Nachweis von SMRV in Zellkulturen mittels PCR und RT-PCR
Kontaminationen von Zellkulturbeständen mit SMRV stellen ein Problem für die Sicherheit und Qualität von zellbiologischen Arbeiten dar. Das als Organismus der Risikogruppe 2 eingestufte Virus wurde bisher in Zelllinien aus Mensch, Affe, Hamster und Maus nachgewiesen [11]. Die am LGL validierte Methode basiert auf dem Nachweis eines im Wirtsgenom persistierenden Genabschnittes des Provirus

mittels PCR-Analyse. Die Amplifizierung findet unter Anwendung der von der ZKBS empfohlenen Primer für die Detektion eines SMRVspezifischen Fragmentes des *gag*-Gens statt. Eine RT-PCR Analyse wird im Falle positiver PCR-Ergebnisse als Bestätigungsreaktion durchgeführt. Diese Methode wird bereits in der Routineüberwachung eingesetzt.

Zusammenfassend konnten am LGL für die Prüfung von Reinheit und Identität vier Methoden etabliert werden. Zwei dieser Methoden, nämlich die STR-Analyse und die Speziespezifische PCR, dienen sowohl dem Nachweis der Identität als auch der Reinheit von Zelllinien und befinden sich in der Validierung. Für die Reinheitsprüfung konnten zwei weitere PCR-Systeme am LGL validiert werden um die häufigsten Mykoplasmenarten und SMRV Kontaminationen in Zelllinien nachweisen zu können. Diese beiden Methoden werden bereits in der amtlichen Analytik verwendet.

Danksagung

Dieses Vorhaben wurde durch das StMUG gefördert.

Referenzen

- 1) Drexler HG, Uphoff CC, Dirks WG, MacLeod RA (2002): Mix-ups and mycoplasma: the enemies within. *Leuk Res.* 26(4):329-33.
- 2) Drexler HG, Dirks WG, Matuso Y, MacLeod RA (2003): False leukemia-lymphoma cell lines: an update on over 500 cell lines. *Leukemia.* 17(2):416-26.
- 3) Lacroix M. (2008): Persistent use of "false" cell lines. *Int J Cancer.* 122(1):1-4
- 4) Pienkowska M, Seth A (1998): Detection of squirrel monkey retroviral sequences in interferon samples. *J Hepatol.* 28(3):396-403
- 5) Baylis SA, Shah N, Jenkins A, Berry NJ, Minor PD (2002): Simian cytomegalovirus and contamination of oral poliovirus vaccines. *Biologicals* 31(1):63-73
- 6) Gilbert DA, Reid YA, Gail MH, Pee D, White C, Hay RJ, O'Brien SJ (1990): Application of DNA fingerprints for cell-line individualization. *Am J Hum Genet.* 47(3):499-514.
- 7) Ono K, Satoh M, Yoshida T, Ozawa Y, Kohara A, Takeuchi M, Mizusawa H, Sawada H (2007): Species identification of animal cells by nested PCR targeted to

mitochondrial DNA. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 43(5-6):168-75.

8) Cooper JK, Sykes G, King S, Cottrill K, Ivanova NV, Hanner R, Ikonomi P (2007): Species identification in cell culture: a two-pronged molecular approach. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 43(10):344-51.

9) Uphoff CC, and Drexler HG (2001): Comparative PCR Analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal* 38: 79-85

10) Tang J, Hu M, Lee S, Roblin R (2000): A polymerase chain reaction method for detection mycoplasma / acholeplasma contaminants in cell culture. *J Microbio Methods* 39: 121-126

11) Popovic M, Kalyanaraman VS, Reitz MS, Sarngadharan MG (1982) Identification of the RPMI 8226 retrovirus and its dissemination as a significant contaminant of some widely used human and marmoset cell lines. *Int J Cancer* 30:93-99

Chipbasiertes Durchfluss-PCR-System für die mobile vollständige Nukleinsäureanalytik von biologischen Gefahrstoffen

Angela Marques, Pia Zimmermann und Andreas Sing

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit,

85674 Oberschleißheim

Zusammenfassung

Spätestens durch die Anschläge mit Milzbrandsporen 2001 in den USA zeigte sich, welche gravierenden Auswirkungen ein außergewöhnliches, durch biologische Ursachen hervorgerufenes Ereignis haben kann. Selbst wenn, wie bei diesen Milzbrandbriefen, nur wenige Menschen betroffen waren, bewirken gerade bioterroristische Angriffe große Verunsicherung und Angst in der gesamten Bevölkerung. Auch die infolge dieser Ereignisse weltweit versandten Hoax-Briefe verursachten große Probleme. Daher ist die Entwicklung von Detektionssystemen, welche bioterroristisch relevante Erreger in kurzer Zeit identifizieren können, erforderlich. Das Ziel des BMBF (Bundesministerium für Bildung und Forschung)-finanzierten Verbund-Projektes ist die Entwicklung eines mobilen Nukleinsäurebasierten Analysesystems. Dieses Lab-on-a-Chip System soll Vor-Ort-Extraktion, -Amplifikation sowie Detektion der Erreger auf einem einzigen Chip integrieren. Aufgabe des LGL ist es, für relevante Probenmatrices Extraktionsprotokolle für den Chip zu entwickeln. So wurden verschiedene kommerzielle und publizierte Extraktionsprotokolle mit bakteriellen Suspensionen, gespiktem Blut und Tupfern getestet. Das „QIAamp mini kit“ erwies sich als das empfindlichste Extraktionssystem, und so wurde die Silica-Säule erfolgreich durch die Magnetic Silicat Beads ersetzt, da sich diese in den Chip integrieren lassen. Ebenso wurden Tupfer verschiedener Hersteller auf ihre Eignung für die Probennahme getestet.

Erfolgreiche Extraktionssysteme wurden ebenfalls auf dem vorhandenen Chip-Prototyp verwendet. Bisher zeigte sich, dass allein die DNA-Extraktion aus Bakteriensuspensionen auf dem Chip vergleichbare Ergebnisse zur Extraktion ohne Chip lieferte. Dagegen ergab die Erreger-Extraktion aus künstlich infiziertem Blut auf dem Chip eine Verschlechterung um den Faktor 100. Weitere Untersuchungen sind durchzuführen.

Einleitung:

Die biologische Kriegsführung, definiert als die Verwendung von Mikroorganismen in der offensiven Kriegsführung, ist seit dem Mittelalter dokumentiert worden. Viele der auserwählten mikroorganischen Erreger wurden in der vergangenen Zeit durch verschiedene Länder zur Kriegsführung vorbereitet und manipuliert (1). Das US Büro für Seuchenkontrolle und -prävention (CDC) hat mögliche bioterroristischrelevante Erreger in drei Kategorien eingestuft: A (bakterielle Krankheitserreger wie *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis* und Viren wie *Variola major*, Ebolavirus und Lassavirus), B (bakterielle Krankheitserreger wie *Brucella spp.*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei* und *Coxiella burnetii*), C (Erreger, die neu auftauchende Krankheitserreger mit einschließen, die für Massenverseuchungen eingesetzt werden könnten). Die Unterscheidung erfolgt auf der Grundlage der Fähigkeit der Erreger, Krankheiten zu verursachen, die leicht von Mensch zu Mensch verbreitet oder übertragen werden können. Erreger, die zu hohen Sterblichkeitsraten führen können, die Potenzial für einen totalen Zusammenbruch des öffentlichen Gesundheitswesens aufweisen. Erreger, die zu Panik und sozialen Ausschreitungen führen können und die spezielle Anforderungen an das öffentliche Gesundheitswesen stellen, sich auf deren Einsatz vorzubereiten (2). Aufgrund der Notwendigkeit, Mikroorganismen zu erkennen, die für bioterroristische Anschläge benutzt werden könnten, wurden zunehmend empfindlichere und schnellere-meist Laborgebundene Nachweismethoden entwickelt. Der Bedarf nach solchen empfindlichen Methoden wird auch dadurch dringender, da die Kultivierung einiger dieser Organismen einige Tage dauern kann, bzw. nicht möglich ist. Daher ist das Ziel unseres Projektes, ein miniaturisiertes System für die mobile Nukleinsäureanalyse zu entwickeln, welches Vor-Ort-Extraktion, -Amplifikation sowie

Detektion in einem kleinen, robusten und einfach zu bedienenden System in wenigen Minuten möglich macht. Dies geschieht in Zusammenarbeit mit folgenden weiteren Verbundpartnern: Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, TIB MOLBIOL GmbH, Clemens GmbH, Sensovation und Microfluidic ChipShop GmbH. Die Arbeitspakete des Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) in diesem Projekt sind: i) Protokollentwicklung für die relevanten Proben, ii) Bewertung des neuen Systems bzgl. funktioneller, diagnostischer und anwenderbezogener Aspekte und iii) Akzeptanz und Auswirkung der Nutzung des neuen Lab-on-a-Chip Systems.

Material und Methoden

Verwendete Bakterien

B. pseudomallei, *Y. enterocolitica* und *Escherichia. coli*, mit *fliC* Gen im Voraus umgewandelt, wurden über Nacht auf der Blutagarplatte bei 37°C inkubiert. Aus dem Kulturmaterial wurden Bakteriensuspensionen mit steriler 0,9% Kochsalz-Lösung hergestellt und diese in einer logarithmischen Reihe verdünnt. Jeweils 100µl von dieser Suspension wurden ausplattiert und die Koloniebildende Einheit (KBE) wurde bestimmt.

Extraktion

Bakterienkulturen

Aus der *B. pseudomallei*-Suspension wurde DNA mit den 7 folgenden kommerziellen Extraktionskits QIAamp Mini Kit (Art. 51104, Qiagen), Easy-DNA Kit (Art. K1800-01, Invitrogen), High Pure PCR Template Preparation Kit (Art. 11796828001, Roche), ChargeSwitch gDNA Mini Bacteria Kit (Art. CS11301, Invitrogen), Bilatest Genomic DNA Kit 100 (Art. 110202, Bilatec), Ultraclean Microbial DNA Kit (Art. 12224-50, Mo Bio) und geneMag-DNA Bacteria (Art 3101-100, Chemicell) extrahiert. Jeder Extraktionsansatz wurde mit drei Replikaten durchgeführt.

Blut mit Bakterien gespikt

Jeweils 100 µl Blut für jeden Extraktionsansatz wurden mit 100µl der Bakterien-Verdünnungsreihe (*B. pseudomallei* und *Y. enterocolitica*) gespikt. Die Gesamt-DNA wurde nach folgenden Protokollen extrahiert: Bilatest Genomic DNA Kit 100,

Ultraclean BloodSpin Kit (Art. 1220-50, Mo Bio), High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche), Easy-DNA Kit (Invitrogen), QIAamp DNA Blood Mini Kit (Art. 51104, Qiagen), FlexiGene DNA Kit (Art. 51204, Qiagen), NucleoSpin Blood Kit (Art. 74951.50, Macherey-Nagel), NucleoSpin QuickPure Blood Kit (Art. 740569.50, Macherey-Nagel) und geneMAG-DNA 100 (Chemicell). Jeder Extraktionsansatz wurde als 3-fach-Ansatz durchgeführt.

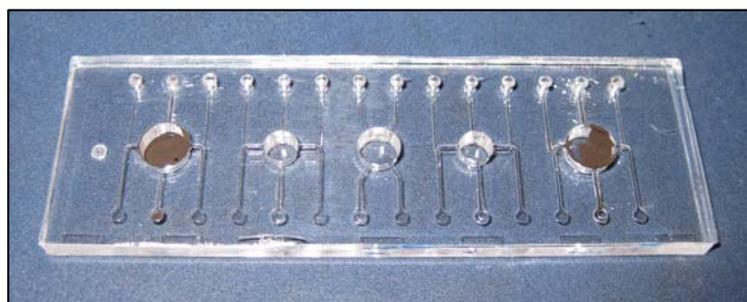
Gespikte Tupfer

Trockene und befeuchtete Tupfer: Baumwolle-Tupfer (Art. 70 610, Biomerieux), Virocult (Art. MW950, Medical Wire & Equipment), Chlamydia Transwab (Art. MW933, Medical Wire & Equipment), Mastswab (Art. MD540, Mast Diagnostica), Beflockter Tupfer regulär mit flüssigem Amies-Medium (Art. 80480CE, Copan), UTM kit (Art 359C, Copan) und Nylon beflockter Tupfer (Art 552C, MicroRheologics) wurden für Spiking-Experimente und DNA-Isolierung unter Verwendung des QIAamp DNA mini Kit entsprechend des Herstellerprotokoll eingesetzt, jedoch unter Verwendung von Magnetic-silica-beads (40µl, Art. PR-MAG00001-01, Mobitec). Jeder Extraktionsansatz wurde mit zwei oder drei Replikaten durchgeführt.

Auf dem Chip (Bakterienkulturen und Blut mit Bakterien gespikt)

Um die DNA-Extraktion unter Verwendung des QIAamp - Magnetic Beads im Reaktionsgefäß mit der im Chip zu vergleichen, wurde *E. coli*-DNA extrahiert und mittels real-time PCR (*fliC* Gen) getestet. Dazu wurde Bakteriensuspension und gespiktes Blut verwendet.

Abbildung 1 zeigt einen Chip, der für die DNA-Extraktion benutzt wurde. Jede bakterielle Verdünnung wurde im Doppelansatz unter Verwendung der zwei größeren Kammern und mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe ausgeführt. Die nach



der Extraktion verbleibenden Magnetic Beads sind zu erkennen.

Abbildung 1: Mikrochip für DNA-Extraktion unter Verwendung

Magnetic Beads.

Real-time PCR Amplifikation

Für den Nachweis von *Y. enterocolitica*-DNA wurde ein Taqman-Sonden-System verwendet (3). Für den (relativ-) quantitativen Nachweis von *B. pseudomallei*-DNA wurde ein Taqman-System von Dr. Herbert Tomaso verwendet. Diese PCR wurde am Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr evaluiert, jedoch nicht veröffentlicht. Das Zielgen dieser PCR ist Flagellin C. Eine Reaktion hat das Gesamtvolumen 20 µl; Endkonzentrationen: 1x ABI TaqMan® Mix, 0.45µM je Primer (Burk flic forw und rev), 0.0125µM Taqman Sonde (Burk flic TM), sowie 2 µl DNA-Template enthält. Die Thermocycler-bedingungen waren wie folgt: 10min bei 95° C, gefolgt von 45 Zyklen von 15s bei 95°C und 1min bei 60°C. Die Amplifikation für beide Nachweissysteme wurde auf MX3000p Real-time PCR System (Stratagene) und für die *Burkholderia*-PCR zusätzlich mit weißen PCR-Platten durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

Vergleich von sieben Extraktionskits für die Aufreinigung aus bakteriellen Suspensionen (im Eppendorf-Reaktionsgefäß)

Um die Effizienz der Aufreinigung zu beurteilen, wurden die gewonnenen DNA-Extrakte mit Hilfe der oben genannten real-time PCRs quantitativ getestet. Tabelle 1 zeigt die Nachweisgrenzen der Bakteriensuspensionsextraktion (*B. pseudomallei*). Die Extraktion mit dem QIAamp Mini Kit erzielte das beste Ergebnis, gefolgt von Ultraclean Microbial DNA Kit, High Pure, Bilatest Genomic DNA und dem GeneMag-DNA Bacteria Kit.

Tabelle 1: Nachweisgrenzen der Nukleinsäure-Extraktion von *B. pseudomallei*-Bakteriensuspension (fliC Gen)

| Extraktion Methoden (a) | Firma | Aufreinigungs- prinzip | Detektionsgrenze (KBE/µl) (b) |
|---|------------|---------------------------|----------------------------------|
| QIAamp Mini Kit | Qiagen | Säule | 12 |
| Easy-DNA Kit | Invitrogen | Fällung | 243 |
| High Pure PCR Template Preparation Kit | Roche | Säule | 100 |
| ChargeSwitch gDNA Mini Bacteria Kit | Invitrogen | Magnetic Beads | 500 |
| Bilatest Genomic DNA Kit 100 | Bilatec | Magnetic Beads | 100 |
| Ultraclean Microbial DNA Kit | Mobio | Säule | 78 |
| GeneMag-DNA Bacteria Kit | Chemicell | Magnetic Beads | 101 |

(a) Die Extraktion der Bakteriensuspensionen wurde als Verdünnungsreihe von 10^{-4} bis 10^{-7} und im 3-fach-Ansatz durchgeführt. (b) Jeder Extrakt wurde in der real-time PCR mit 3 Replikaten getestet. Die Nachweisgrenze wurde von der höchsten Verdünnung bestimmt, in welcher noch alle 9 Replikate ein positives Ergebnis lieferten.

Vergleich von neun DNA-Extraktionskits zum Nachweis von *B. pseudomallei* in gespiktem Blut (im Eppendorf-Reaktionsgefäß)

Einige bioterroristisch relevante Erreger, wie *B. anthracis*, *Y. pestis* und *B. pseudomallei* (4) können im Laufe der Infektion im Blut nachgewiesen werden, und daher ist eine optimale DNA-Aufreinigung für die nachfolgende Nukleinsäure-basierte Untersuchung notwendig. Etliche Kits sind zur direkten DNA-Isolierung aus Blut bereits auf dem Markt, aber nur wenige zeigten sich für die Lyse von Bakterien in gespiktem Blut geeignet. Insbesondere die niedrige Konzentration der Krankheitserreger und das Vorhandensein von PCR-hemmenden Stoffen im Blut sind wichtige Herausforderungen, vor die man bei der Untersuchung von Blutproben gestellt wird. Zunächst wurden in dieser Arbeit 10 im Handel erhältliche Kits zur Extraktion von bakterieller DNA aus Blut getestet, in denen die unterschiedlichen Verfahren der Extraktion (Säule, Fällung und magnetische Beads) angewendet werden.

Tabelle 2 zeigt die erhaltenen Nachweisgrenzen: Die Ergebnisse von Ultraclean Blood DNA Kit, und QIAamp DNA Blood Mini Kit waren identisch und am effizientesten (50.5 CFU/µl). Das GeneMAG-DNA Kit zeigte die schlechtesten Detektionsergebnisse, auch die Verwendung des LysisBuffer 101 verbesserte die Extraktion nicht.

Tabelle 2: Nachweisgrenzen *B. pseudomallei* in gespiktem Blut

| Extraction Methoden (a) | Firma | Aufreinigungs- prinzip | Detektionsgrenze (KBE/ μ l) (b) |
|---|--------------------|---------------------------|--|
| Bilatest Genomic DNA Kit | Bilatec | Magnetic Beads | 101 |
| Ultraclean Blood DNA Kit | Mobio | Microbeads/Säule | 50,5 |
| High Pure PCR Template Preparation Kit | Roche | Säule | 50,5 |
| Easy-DNA Kit | Invitrogen | Fällung | 101 |
| QIAamp DNA Blood Mini Kit | Qiagen | Säule | 50,5 |
| FlexiGene DNA Kit | Qiagen | Säule | 101 |
| Nucleospin Blood Kit | Macherey- Nagel | Säule | 176 |
| Nucleospin QuickPure Blood Kit | Macherey- Nagel | Säule | 176 |
| GeneMAG-DNA Bacteria Kit | Chemicell | Magnetic Beads | 1760 |
| GeneMAG-DNA LysisBuffer 101 | Chemicell | Magnetic Beads | 21850 |

(a) Blut wurde mit der Bakteriensuspension in einer Verdünnungsreihe von 10^{-4} bis 10^{-7} gespikt und im 3-fach-Ansatz durchgeführt. (b) Jedes Extrakt wurde in der real-time PCR mit 3 Replikaten getestet. Die Nachweisgrenze wurde von der höchsten Verdünnung bestimmt, in welcher noch alle 9 Replikate ein positives Ergebnis lieferten.

Vergleich von sieben Tupfern gespikt mit *B. pseudomallei* für die Eignung als Probennahme-Hilfsmittel (im Eppendorf-Reaktionsgefäß)

Im Falle bioterroristischer Anschläge werden die Proben normalerweise mit Hilfe von Tupfern oder Gazeauflagen von ABC-Schutz-Zügen, der Feuerwehr und der Polizei genommen, und anschließend zur Untersuchung in geeignete Labore gebracht. Zusätzlich wurden im Jahre 2001, nach absichtlicher Verbreitung von Milzbrandsporen, Nasentupfer für die Untersuchung aller potentiell gefährdeten Personen eingesetzt (5).

In diesem Versuch wurden trockene und angefeuchtete Tupfer, die mit *B. pseudomallei* gespikt waren, für ihre Eignung zur Probennahme und anschließende Extraktion getestet. Das QIAamp DNA Mini Kit wurde zur DNA-Extraktion aus gespikten Tupfern verwendet, da es sich in unseren Untersuchungen (siehe Tabelle 1 und Tabelle 2) sowohl für DNA-Extraktion aus Bakteriensuspensionen als aus gespikten Blut als das empfindlichste Kit gezeigt hatte. Da Magnetic Beads im Vergleich zur Extraktion mit Silica-Säulen vergleichbare Ergebnisse lieferten, sie sich jedoch leichter in den geplanten Chip integrieren lassen, wurden Magnetic Silica Beads (MoBiTec) anstatt der Säule in dieses Kit eingesetzt.

Tabelle 3 zeigt die real-time PCR Nachweisgrenzen von mit *B. pseudomallei* gespikten Tupfer. Zwei getrocknete und vier befeuchtete Tupfer wiesen 11, 15 oder 100 KBE/ μ l als Nachweisgrenze auf. Ein beflockter Tupfer mit flüssigem Amies-Mittel zeigte sogar bei geringeren Bakterienverdünnungen kein Detektionssignal, was am Vorhandensein von Holzkohle und Agar bei diesen Tupfer liegen könnte.

Tabelle 3: Vergleich von sieben *B. pseudomallei* gespikten Tupfern unter Verwendung der QIAamp-magnetischen Beads als DNA-Extraktionsmethode.

| Tupfer (a) | Anbieter | Detektionsgrenze (KBE/μl) (b) |
|--|--------------------------|---|
| Baumwolle Tupfer | Biomerieux | 11 |
| Virocult | Medical Wire & Equipment | 150 |
| Chlamydia Transwab | Medical Wire & Equipment | 15 |
| Mastswab | Mast Diagnostica | 15 |
| Beflockter Tupfer regulär mit flüssigem Amies-Medium | Copan | Neg |
| UTM kit | Copan | 150 |
| Nylon beflockter Tupfer | MicroRheologics | 15 |

(a) Die Tupfer wurden mit der Bakteriensuspension in einer Verdünnungsreihe von 10^{-4} bis 10^{-7} gespikt und im 2-fach-Ansatz durchgeführt. (b) Jeder Extrakt wurde in der real-time PCR mit zwei Replikaten getestet. Die Nachweisgrenze wurde von der höchsten Verdünnung bestimmt, in welcher noch alle 4 Replikate ein positives Ergebnis lieferten.

Vergleich der Extraktion auf dem Chip im Vergleich zum Reaktionsgefäß mit dem entwickelten QIAamp-Magnetic Bead Protokolls

Abbildung 2 zeigt die real-time PCR der aus der Bakteriensuspension (A und B) bzw. dem gespikten Blut (C und D) extrahierten DNA, wobei die Extraktion im Reaktionsgefäß (A und C) und im Chip (B und D) durchgeführt wurde. Das QIAamp-Magnetic Beads-Protokoll im Reaktionsgefäß (2A) zeigte sich als genauso empfindlich wie das QIAamp DNA-Mini Kit, welches eine Silikagel-Säule verwendete (Tabelle 1). Zusätzlich war das QIAamp-Magnetic Beads-Protokoll im Chip gerade 1 \log_{10} weniger empfindlich als im Reaktionsgefäß (Abbildung 2B). Andererseits wurde im Chip 2 \log_{10} weniger DNA aus gespiktem Blut extrahiert (Abbildung 2D) als im Reaktionsgefäß (Abbildung 2C). Es wurde das gleiche Volumen Waschpuffer für beide Fächer auf dem Chip benutzt (Abbildung 1).

Allerdings scheint es die größte Herausforderung im Chip zu sein, natürliche Blutinhaltsstoffe wie Hämoglobin herauszuwaschen, welche die PCR-Reaktion hemmen (6).

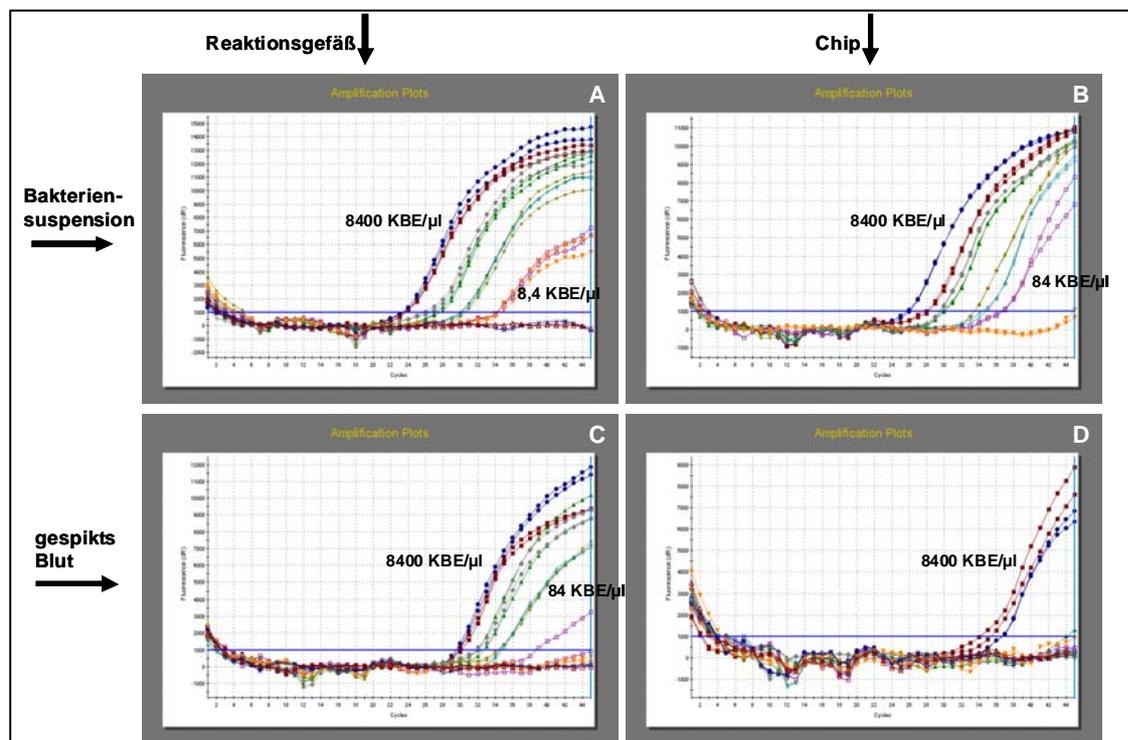


Abbildung 2: Real-time PCR von *E. Coli*-FliC DNA extrahiert mit QIAamp-Magnetic Beads. DNA wurde mit QIAamp-Magnetic Beads im Reaktionsgefäß (A und C) oder im Chip (B und D) aus der Bakteriensuspension (A und B) oder gespiktem Blut extrahiert (C und D).

Auswertung der Extraktion von Tupfern gespikt mit *Y. enterocolitica* im Chip

Zwei verschiedene Tupfer, aus Baumwolle (Biomerieux) und Nylon (Copan), wurden mit *Y. enterocolitica* gespikt und die DNA wurde unter Verwendung des QIAamp-MB-Protokolls im Chip und im Reaktionsgefäß isoliert. Die Nachweisgrenze, die mit real-time-PCR für beide gespikte Tupfer festgestellt wurde, war vergleichbar mit der im Reaktionsgefäß (Daten nicht angezeigt). Da es sich noch um einen Prototyp handelt und noch provisorische Befüllhilfen verwendet werden, kommt es immer wieder zu Leckagen und Kontamination der Umgebung. Um Kontaminationen des Labors mit DNA von bioterroristisch relevanten S3-Erregern zu verhindern, werden S2-Erreger wie *Y. enterocolitica* für die Experimente im Chip benutzt.

Zurzeit werden neue DNA-Extraktionsexperimente zur Reduzierung der Lysezeit im Reaktionsgefäß und dann im Chip durchgeführt. Desweiteren wird daran gearbeitet

die Lyse zu vereinfachen, z.B. indem Puffer ersetzt oder weg gelassen werden. Bisher ist die Extraktion im Chip 3-5-mal langsamer als in einem Reaktionsgefäß. Außerdem werden weitere Untersuchungen mit gespiktem Blut durchgeführt, unter anderem mit verringertem Blutvolumen.

Das Projekt (FKZ:13N9559) wird durch das BMBF gefördert im Rahmen des Programms der Bundesregierung "Forschung für die zivile Sicherheit" als Teil der Hightech Strategie.

Referenzen

- 1) Jones, SW, Dobson, ME, Francesconi, SC, Schoske, R and Crawford, R. (2005) DNA assays for detection, identification, and individualization of select agent microorganisms. *Croat Med J.* 46(4):522-9
- 2) Wallin A, Luksiene Z, Zagminas K. and Surkiene G. (2007) Public health and bioterrorism: renewed threat of anthrax and smallpox. *Medicina (Kaunas).*43(4):278-84
- 3) Lambertz ST, Nilsson C, Hallanvuo S, Lindblad M. 2008. Real-time PCR method for detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food. *Appl Environ Microbiol.* 74(19):6060-7.
- 4) Selvapandiyan A, Stabler K, Ansari NA, Kerby S, Riemenschneider J, Salotra P, Duncan R, Nakhasi HL.2005. A novel semiquantitative fluorescence-based multiplex polymerase chain reaction assay for rapid simultaneous detection of bacterial and parasitic pathogens from blood. *J Mol Diagn.* 7(2):268-75.
- 5) Kiratisin P, Fukuda CD, Wong A, Stock F, Preuss JC, Ediger L, Brahmabhatt TN, Fischer SH, Fedorko DP, Witebsky FG, Gill VJ. 2002. Large-scale screening of nasal swabs for *Bacillus anthracis*: descriptive summary and discussion of the National Institutes of Health's experience. *J Clin Microbiol.* 40(8):3012-6.
- 6) Valasek MA, Repa JJ. 2005. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ.* 29(3):151-9.