

## HelmholtzZentrum münchen

Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt

MOLECULAR EXPOSOMICS (MEX)

PROF. DR. DR. KARL-WERNER SCHRAMM

Frau Dipl.-Oecotroph. Anna Terschlüsen  
Refrat 314  
Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung  
Deichmanns Aue 29  
53179 Bonn

08.02.2018

### Deckblatt fachlicher Abschlussbericht

#### Zuwendungsempfänger:

Univ.-Prof. Dr. Lothar Rink  
Institut für Immunologie  
Universitätsklinikum  
RWTH-Aachen  
Pauwelsstr. 30  
52074 Aachen

Prof. Dr. Dr. Karl-Werner Schramm  
Molecular Exposomics  
Helmholtz Zentrum München  
Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt  
Ingoldstädter Landstr. 1  
85764 Neuherberg

**Forschungsvorhaben Nr.:** 2813HS021

**Thema:** Anpassung des EROD-Bioassay und Überprüfung der Eignung als Methode für Screeningverfahren zum Nachweis von Dioxinen und dioxinähnlichen Verbindungen

**Laufzeit:** 01.10.2014-31.12.2017

**Berichtszeitraum:** Abschlussbericht 01.10.2014-19.02.2018

## **Fachlicher Abschlussbericht zum Projekt 2813HS021**

### **„Anpassung des EROD-Bioassay und Überprüfung der Eignung als Methode für Screeningverfahren zum Nachweis von Dioxinen und dioxinähnlichen Verbindungen“**

#### **1. Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens**

Ziel des Forschungsantrages war es, einen vereinfachten EROD-Bioassay zu etablieren, der in Aufsichtsbehörden durchgeführt werden kann, in denen keine Expertise und Geräte für eine Zellkultur vorhanden sind. Hierzu sollten die Zellen auf Mikrotiterplatten eingefroren werden, so dass die Mikrotiterplatten direkt für den Bioassay verwendet werden können, ohne dass eine Dauerkultur der Zellen im Labor notwendig ist. Der Bioassay soll damit auf Abruf jederzeit ohne Vorlauf durchgeführt werden können.

Des Weiteren sollte der Bioassay durch das Einfrieren auf den Mikrotiterplatten besser standardisiert werden, so dass nur geringere Schwankungen zwischen Laboren und zu unterschiedlichen Zeiten auftreten. Dies gelingt in erster Linie dadurch, dass die Bedingungen in einer Charge von eingefrorenen Platten absolut identisch sind. Zuzüglich sollte natürlich die Varianz zwischen verschiedenen Chargen minimiert werden.

Letztlich sollte noch die Probenvorbereitung vereinfacht werden.

#### **1.1. Planung und Ablauf des Vorhabens**

Der Bedarf an Nahrungs- und Futtermittel steigt aufgrund der zunehmenden Weltbevölkerung stetig. Gleichzeitig sind die Ansprüche der Bevölkerung, vor allem in den westlichen Industrieländern, an die Qualität der Nahrungsmittel, bei gleichzeitigem Preisdruck, gestiegen. Damit es bei diesen unterschiedlichen Interessenlagen nicht zu Problemen kommt, sind die Anforderungen an die staatlichen Überwachungsstellen und die Messtechniken ebenfalls gestiegen, was letztlich auch zu entsprechenden Richtlinien der Europäischen Union geführt hat. Hierdurch sollen Nahrungs- und Futtermittel auf Kontaminationen untersucht werden, damit diese sich in der Nahrungskette nicht anreichern und somit ein sicherer Verzehr gewährleistet ist.

Da die Vielfalt an Nahrungs- und Futtermittel stetig zunimmt werden deshalb einfache und kostengünstige Screening-Methoden benötigt, die schnell eine Aussage über biologisch-relevante Kontaminationen zulassen. Eine der wesentlichen Kontaminationen ist dabei Dioxin bzw. Dioxin-ähnliche polychlorierte Biphenyle (PCB). Diese Kontaminationen aktivieren das Enzym Cytochrom P450 über den Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR), so dass eine biologische Wirkung des Gemisches gemessen werden kann, anstatt die Konzentration der Einzelkomponenten. Im 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylase (EROD)-Assay wird dies ausgenutzt.

Zur Umsetzung dieser Ziele wurde ein Konsortium von den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Dr. Schramm und Univ.-Prof. Dr. Lothar Rink mit der Firma acCELLerate gebildet.

#### **1.2. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde**

##### **1.2.1. Aktueller Wissensstand zu Dioxinen und dioxin-ähnlichen Substanzen in Lebens- und Futtermitteln**

Aufgrund einer ähnlichen Struktur werden insgesamt 210 chemische Verbindungen unter dem Begriff „Dioxine“ geführt, darunter 75 Dibenzo-p-dioxine (PCDD) und 135 polychlorierte Dibenzofurane (PCDF). Da man auch bei einigen polychlorierten Biphenylen (PCB), und zwar koplanare PCB, mono-ortho-substituierte PCB, und di-ortho-PCB) dioxinähnliche Eigenschaften bezüglich ihrer Toxizität festgestellt hat, findet zur Zeit eine Neubewertung statt. Gegenwärtig werden 29 PCDD/F- und PCB-Kongenerer als relevante Zielverbindungen erfasst (s. Tabelle 1.1)

PCDD, PCDF und dl-PCB sind weit verbreitete toxische Substanzen. Sie sind persistent, hoch giftig und akkumulieren im Fettgewebe, wodurch sie sich in der Nahrungskette anreichern. Regelmäßig werden sie daher auch in Lebens- und Futtermitteln gefunden und stellen als Folge eine Gesundheitsgefährdung für den Menschen dar (Fürst 1988, UBA 2009, Bernard et al. 2002, Chou et al. 2008, Lake et al. 2005, Pelclova et al. 2009, Weber et al. 2008). Es wurden umfassende Höchstwerte für Dioxine und später gemeinsam mit dl-PCB in Lebens- und Futtermitteln durch die Europäische Kommission festgelegt (Verordnung (EU) Nr. 1259/2011 und Verordnung (EU) Nr. 277/2012). Lebens- oder Futtermittel, die diese Höchstwerte überschreiten, dürfen weder unverändert noch vermischt in den Verkehr gebracht werden. Für einen effektiven Schutz der Bevölkerung ist deshalb die Überwachung der Dioxinwerte in Lebens- und Futtermitteln von besonderer Bedeutung.

**Tab. 1.1** Aufstellung der 29 Zielkongenerer, die sich aus 7 Dioxinen, 10 Furanen und 12 dioxinähnlichen PCB zusammensetzt. TEF = Toxic Equivalency Factor, nach WHO (2007).

Kongener	TEF-Wert	Kongener	TEF-Wert
<b>Dibenzo-p-dioxine („PCDD“)</b>		<b>„Dioxinähnliche“ PCB: Non-ortho-PCB + Mono-ortho-PCB</b>	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	<i>Non-ortho PCB</i>	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	PCB 169	0,03
OCDD	0,0003		
<b>Dibenzofurane („PCDF“)</b>		<i>Mono-ortho PCB</i>	
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 105	0,00003
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03	PCB 114	0,00003
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3	PCB 118	0,00003
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 123	0,00003
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,00003
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 157	0,00003
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00003
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 189	0,00003
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0003		

Abkürzungen: „T“ = tetra; „Pe“ = penta; „Hx“ = hexa; „Hp“ = hepta; „O“ = octa; „CDD“ = Chlordibenzodioxin; „CDF“ = Chlorodibenzofuran; „CB“ = Chlorbiphenyl.“

Das giftigste Dioxin ist das im Jahr 1957 entdeckte 2,3,7,8- Tetrachlor-Dibenzo-p-Dioxin (TCDD) (Sandermann et al. 1957) und seit einem Chemieunfall in Seveso (Italien) im Jahr 1976 als „Seveso-Gift“ bekannt ist. Die *International Agency for Research on Cancer (IARC)* stufte es 1997 als krebserzeugend für den Menschen ein. Dioxine haben ein breites Wirkungsspektrum und können u.a. die Haut, das Immun- und Nervensystem, den Hormonhaushalt und die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen.

### 1.2.2. Das TEF/ TEQ-System

Zur Bewertung des Risikos der unterschiedlichen PCDD-, PCDF- und dl-PCB- Verbindungen hat sich das Konzept der Toxizitätsäquivalente (TEQ) der World Health Organization (WHO) durchgesetzt. Dabei werden die bedeutendsten 7 Dioxin- und 10 Furan- und 12 dl- PCB in ihrer toxischen Wirkung mit der des TCDD verglichen.

Laut WHO (2007) ist der Toxizitätsäquivalenzfaktor (TEF) die kongenerspezifische toxische Wirkungsintensität, relativ zur Vergleichssubstanz 2,3,7,8-TCDD. Dessen TEF wird mit eins bewertet. Durch Multiplikation der Kongenerenkonzentration  $C_i$  mit dem jeweils zugehörigen  $TEF_i$  und anschließender Summierung der einzelnen Werte wird der Gesamtwert an Toxizitätsäquivalenten (TEQ) berechnet:

$$TEQ = \sum_{i=1}^n C_i \cdot TEF_i$$

Das TEQ-Konzept basiert auf der Annahme, dass die zusammengefassten Effekte der unterschiedlichen Kongenere konzentrationsadditiv sind und weder signifikante synergistische noch antagonistische Effekte auf der rezeptorvermittelten Signalkette auftreten. Van den Berg und Mitautoren (1998) sehen dieses ebenso wie Safe (1998) durch viele Studien bestätigt.

Dioxinen, Furanen und dioxinähnlichen PCB ist die Bindung an den Ah-Rezeptor und der dadurch ausgelöste Wirkmechanismus gemein. Das dioxinähnliche Potenzial eines Kongeners ist abhängig von der Spezies. Als „Relative Potency“ (REP) wird der Wert des dioxinähnlichen Potenzials bezeichnet, wenn er in nur einer Studie anhand eines Lebewesens bestimmt wurde. Der TEF beruht auf zahlreichen in-vivo und in-vitro-Studien und bildet den Konsens der REPs verschiedener Endpunkte, Spezies, bzw. Zelllinien (Eljarrat & Barceló 2003).

Die Bestimmung der TEFs wurde von verschiedenen Instanzen vorgenommen. So entwickelte die NATO/CCMS (North Atlantic Treaty Organization – Committee on Challenges of Modern Society) den auf ihren festgelegten TEFs beruhenden internationalen TEQ (I-TEQ) (Eljarrat & Barceló 2003). Die World Health Organization (WHO) aktualisierte diese TEFs im Jahre 1997 und veröffentlichte ihre Version als WHO-TEFs (van den Berg et al. 1998).

Zur Aufnahme einer Substanz in das TEF-Schema und damit zur Aufnahme in die Liste der dioxinähnlichen Substanzen müssen folgende Kriterien gegeben sein: eine ähnliche chemische Struktur wie PCDD/F, die Bindung an den AhR, Auslösung von AhR-induzierten biochemischen und

toxischen Reaktionen sowie Persistenz und Bioakkumulation in der Nahrungskette (van den Berg et al. 1998, Eljarrat & Barceló 2003).

Die Verordnung (EG) Nr. 1259/2011 legt für bestimmte Lebensmittel tierischer Herkunft Höchstgehalte für die Summe aus Dioxinen und die Summe aus Dioxinen und dl-PCB fest. Nachfolgend sind beispielhaft einige dieser Höchstgehalte dargestellt (s.Tabelle 1.2).

**Tabelle 1.2:** Einige Höchstgehalte für Dioxine/Furane und dl-PCB nach Verordnung (EU) Nr. 1259/2011

Erzeugnis	Höchstgehalt	
	Summe aus Dioxinen (WHO-PCDD/F-TEQ)	Summe aus Dioxinen und dioxinähnlichen PCB (WHO-PCDD/F-PCB- TEQ)
Hühnereier und Eiprodukte	2,5 pg/g Fett	5,0 pg/g Fett
Fleisch und Fleischerzeugnisse von:		
- Rindern und Schafen	2,5 pg/g Fett	4,0 pg/g Fett
- Geflügel	1,75 pg/g Fett	3,0 pg/g Fett
- Schwein	1,0 pg/g Fett	1,25 pg/g Fett
Rohmilch und Milcherzeugnisse einschl. Butterfett	2,5 pg/g Fett	5,5 pg/g Fett

### 1.2.3. Neuregelung für instrumentelle und bioanalytische Nachweismethoden

In der Neuregelung Analyseverfahren durch die Verordnungen (EU) Nr. 252/2012 und Nr. 278/2012 kommen zwei komplementäre analytische Prinzipien (physikalisch-chemische Methoden und bioanalytische Methoden) zur Anwendung.

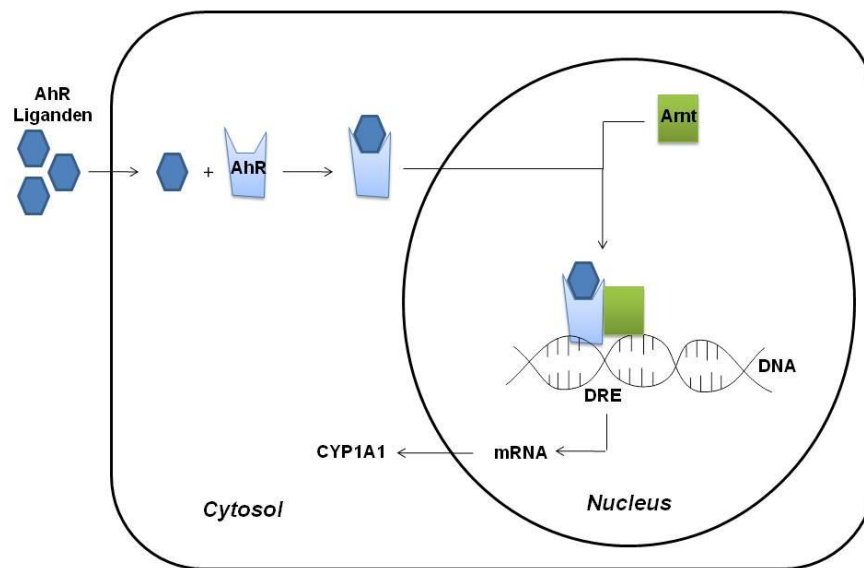
Man unterscheidet **qualitative** Methoden, wie bioanalytische Methoden, die eine ja/nein-Entscheidung, gestützt auf die Überschreitung eines festgelegten Cut-off-Wertes, ermöglichen.

**Semiquantitative** Methoden (bioanalytische und instrumentelle Methoden) liefern einen numerischen Wert, der eine grobe Abschätzung der tatsächlich vorhandenen TEQ-Konzentration ermöglicht.

Zu den **quantitativen** Methoden zählt die instrumentelle Analytik, wie die an Kapillar-Gaschromatographie gekoppelte Massenspektrometrie (HRGC/HRMS), mit der ein Nachweis bis in den Femtogramm-Bereich ( $= 10^{-15}$  g) möglich ist. Aber auch hier gelten die gleichen Anforderungen hinsichtlich Genauigkeit, Messbereich und Präzision wie für die Bestätigungsverfahren. Nachteilig sind jedoch der verhältnismäßig hohe Aufwand dieser Methode und die hohen Kosten.

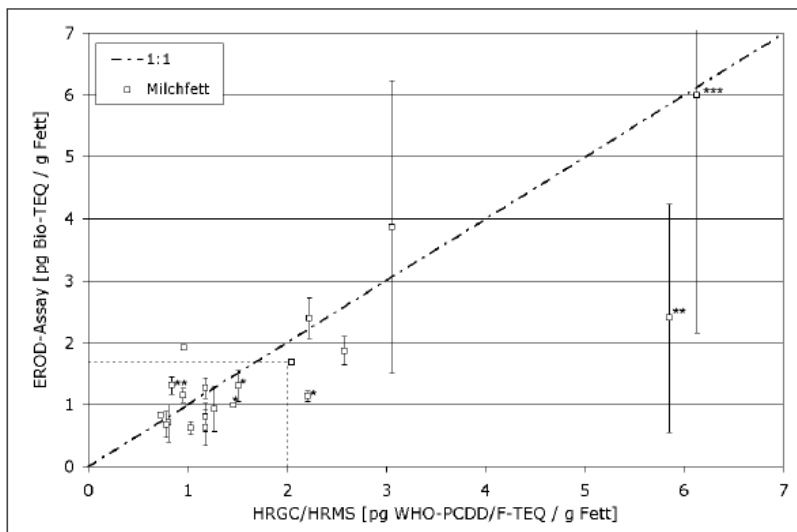
Bioanalytische Testsysteme, wie CALUX- und EROD- Assay, haben sich seit vielen Jahren als schnelle und kostengünstige Screeningtests bewährt und bieten die Möglichkeit, Lebens- und Futtermittel mit hohem Durchsatz zu untersuchen (Li et al. 1999, Behnisch et al. 2002 a,b, Behnisch 2005, BioDetection Systems (BDS) 2009, Lenoir et al. 2012) Sie beruhen auf der Interaktion von Dioxinen und strukturverwandten Stoffen mit dem Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR) (Poland & Knutson, 1982).

Die Ligandenbindung am Rezeptor ist somit nicht substanz- sondern strukturspezifisch. Nach erfolgter Rezeptorbindung wird die Aktivierung und Transferierung des Substrat-Rezeptor-Komplexes in den Zellkern bewirkt, wo er an das „Arnt“-Protein (engl.: Ah receptor nuclear translocator) bindet. Das so entstandene Heterodimer bindet an spezifische DNA-Sequenzen, den sogenannten „Dioxine Responsive Elements“ (engl.; DRE) und stimuliert die Expression der AhR-Zielgene, wie dem Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1) (Giesy et al. 2002), s. Abb.1.1 Insbesondere in Kombination mit geeigneten Probenaufbereitungsverfahren, wie etwa einfachen säulenchromatographischen Methoden (Keiter et al. 2008), kann der bioanalytische Nachweis zusätzlich zu der instrumentellen Analytik, d.h. als deren kostengünstige Ergänzung, für ein umfassendes Vor-Screening größerer Probenmengen eingesetzt werden (Hecker & Hollert 2009).



**Abb. 1.1:** Liganden-aktivierter Signaltransduktionsweg des Arylhydrocarbon-Rezeptors und Mechanismus der Induktion von CYP1A1. AhR: Arylhydrocarbon-Rezeptor; Arnt: Ah receptor nuclear translocator; DRE: Dioxin Responsive Elements; CYP1A1: Cytochrom P450 1A1 (Wobst et al. 2012a).

Auf Basis des Vor-Screenings kann bei einer solchen Konzeption entschieden werden, ob eine Belastung mit persistenten dioxinähnlichen Schadstoffen vorliegt, die dann mit der instrumentellen Analytik bestätigt und näher identifiziert werden muss. Das Ergebnis einer bioanalytischen Methode wird nie exakt den Werten der instrumentellen Analytik entsprechen, da ein anderes Messprinzip zugrunde liegt. Thiem et al. (2006) konnten die Tauglichkeit des EROD- Assays als Screeningverfahren zum Dioxinnachweis in Milch nachweisen. So betrug der mittlere Quotient der Wiederfindung beim EROD-Assay im Vergleich zu HRGC/HRMS 1,1. (s. Abb.1.2).



**Abb. 1.2:** Vergleich EROD-Assay und instrumentelle Analytik bei gefriergetrocknetem Milchfett, 1 pg Bio TEQ = 1 pg WHO- PCDD/F- TEQ , \* Ergebnis der negativen Probe im EROD Assay (nach Thiem et al. 2006).

#### 1.2.4. Neuregelung der Analyseverfahren zur Detektion von Dioxinen, Furanen und dl PCB für Screeningverfahren

Die Überprüfung von Screeningverfahren erfolgt nach der Vorgabe der neuen Qualitätskriterien, festgelegt in den Verordnungen (EU) Nr. 252/2012 und Nr. 278/ 2012. Die nachfolgenden Neuerungen wurden am 19. Oktober 2012 anlässlich des BfR-Workshops „Wirkungsbezogene Analytik in der Lebensmittelüberwachung“ in Berlin vom Leiter des European Union Reference Laboratory for Dioxins and PCBs in Feed and Food“ (Freiburg), Herrn Dr. Hädrich, vorgestellt und wurden bei der Konzeption des Projekts genutzt.

## 2. Material und Methoden

Über die Laufzeit des Projektes wurden zunächst die Bedingungen des Bioassays, die Einfriermethode und die Probenaufbereitung optimiert. Dies ist entsprechend in den Zwischenberichten beschrieben worden. Nach den Austestungen hat sich ein EROD-Bioassay mit der H4IIE-Hepatomzelllinie als optimal herausgestellt und wurde an ein serumfreies Medium angepasst. Die Zelllinie kann bei allen internationalen Zellbanken abgerufen werden.

Der im Folgenden dargestellte kryokonservierte Mikrotiterplatten EROD-Bioassay stellt die finale Version des entwickelten Bioassays dar, der die Qualitätsansprüche gemäß EU-Richtlinien erfüllt und auf verschiedenen biologischen Proben (Tabelle 1) evaluiert wurde.

### Probenvorbereitung

100ml flüssige Proben (z.B. Muttermilch) wurden mit 8ml gesättigtem Kaliumoxalat versetzt und stark geschüttelt. Anschließend wurden zur Extraktion 80ml Ethanol, 40ml Diethylether, 60ml n-Pentan

hinzugegeben. Danach wurde nochmals 2-mal 60ml n-Pentan extrahiert. Abschließend wurde mit 100ml destilliertem Wasser gewaschen und mit Natriumsulfat dehydriert.

40g der Feststoffproben wurden mit Hydromatrixmaterial gemischt und auf einem ASE300 extrahiert mit zwei Zyklen von 10 Minuten bei 120°C und 120 Bar. Als Extraktionsmittel dient ein Gemisch aus n-Hexan/Aceton (3:1, V/V).

Zum Schluss wurden die Proben auf einem Rotationsverdampfer auf 2-3ml bei 450mBar und 60°C eingengt.

Zum Vorreinigen (clean-up) wurden folgende Komponenten in eine Säule gegeben: 10g aktiviertes Silica-Gel, 20g sulfatiertes Silica-Gel (44% Schwefelsäure, W/V), 40g inaktiviertes Silica-Gel (4% Wasser, W/V) und 10g wasserfreies Natriumsulfat. Die konzentrierten Extrakte wurden mit einem Gemisch aus n-Hexan/Dichlormethan (100:1, V/V) eluiert und mit dem Rotationsverdampfer auf 2-3ml bei 550mBar und 60°C eingengt. In Abhängigkeit vom Fettgehalt der Probe wurde das Vorreinigen gemäß der Standardprozedur des Europäischen Referenzlabors für Dioxine bei einem Fettgehalt von mehr als 0,5%/g Probe angepasst.

Für den Bioassay wurden die Extrakte abschließend unter Vorlage von Dimethylsulfoxid (DMSO) unter einem Stickstoffstrom abgedampft und die Vorlage anschließend final auf 500µl DMSO/Isopropanol (4:1, V/V) eingestellt.

Durch diese Form der Probenaufbereitung sind die Proben steril und können direkt auf die Zellen aufgetragen werden. Außerdem werden viele zytotoxische Bestandteile nicht in den Proben konzentriert. Es verbleiben persistente und lipophile Verbindungen im Testextrakt für die Mikrotiterplatten.

#### *Vorbereitung der Mikrotiterplatten*

H4IIEC/T3 Rattenhepatomazellen wurden in exponentieller Wachstumsphase geerntet. Dazu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und dann mit Accutase für 3 Minuten von den Platten verdaut. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (4 Minuten bei 80 x g) und in NFM-G2 (Serum-freies Einfriermedium von acCELLerate) aufgenommen. Die Zellzahl wurde auf  $3 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und 10µl Zellsuspension je Loch auf eine 96-Lochplatte ausgesät. Die Platten wurden dann unter geringem Vakuum in eine Folie verpackt und bei -80°C eingefroren. Materialeffekte der Mikrotiterplatten wurden nicht beobachtet.

#### *EROD-Bioassay*

Für die Versuche wurde der EROD-Bioassay mit den eingefrorenen Zellen als auch mit H4IIEC/T3 Rattenhepatomazellen aus der Dauerkultur durchgeführt. Im Gegensatz zu den eingefrorenen Zellen (Zelldichte 30.000 Zellen/Loch) wurden bei den Dauerkulturzellen nur 10.000 Zellen pro Loch ausgesät. Der EROD-Bioassay wurde dabei auf eine Serumersatzlösung (Panexin, PAN Biotech) umgestellt, damit Dioxineinträge aus dem Kälberserum und Schwankungen in den Serumchargen ausgeschlossen wurden, so dass die Experimente in unterschiedlichen Laboren einheitliche Bedingungen haben. Das Kulturmedium DMEM (Dulbeccos's Modified Eagle's Medium (DMEM,



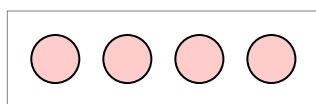
Sigma) mit 1g/L Glucose, Natriumcarbonat (3.7g/L) und Natriumpyruvat (1mM) wurde mit 2mM L-Glutamin, 50 Einheiten/mL Penicillin/Streptomycin und 10% Panexin versetzt.

Die Dauerkulturzellen wurden mit 100µL/Loch ausgesät und die kryokonservierten Platten wurden zunächst direkt in den Inkubator bei 37°C gestellt und dann nach 20 Minuten mit 90µL Kulturmedium versetzt, so dass beide Ansätze mit 100µL Endvolumen liefen. Danach wurden die Standards und Proben in Kulturmedium aufgenommen und 100µL der Proben in Kulturmedium zu den Löchern gegeben und für 72 Stunden inkubiert. Dann wurde das Medium entfernt und 100µL Reaktionslösung/Loch (8µL 7-Ethoxyresorufin, 10µL Dicumarol ad 100µL PBS) hinzugegeben und 30 Minuten inkubiert. Abschließend wurde die Reaktion mit 75µL Ethanol/Loch gestoppt und 10 Minuten geschüttelt (Titrimax). Das entstandene Resorufin wurde auf einen Fluoreszenz-Reader quantifiziert (Absorptionswellenlänge 535nm/Emissionswellenlänge 590nm). Zur Normalisierung wurde die Proteinkonzentration pro Loch mittels der Pierce Protein-Assay Methode bestimmt.

### Auswertung

Das bioanalytische Verfahren der Auswertung der Rohdaten aus einer 96-Loch-Platte wird nachfolgend kurz skizziert.

2,3,7,8-TCDD Standard-, Blindwert- und Extraktdata nach dem EROD-assay

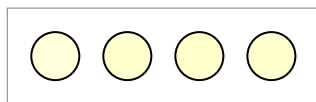


vierfach Messungen



Mittelwert ( $\mu$ ) von den drei von vier Rohdaten mit den niedrigsten Standardabweichungen (SD):  
 $\mu \pm SD$ . Voraussetzung: Variationskoeffizient,  $VK \leq 15\%$ .

Proteindaten nach dem Pierce-assay



Mittelwert ( $\mu_p$ ) von den drei von vier Rohdaten mit den niedrigsten Standardabweichung ( $SD_p$ ):  
 $\mu_p \pm SD_p$  Voraussetzungen:  $VK (\%) = SD/\mu \times 100 \leq 15\%$ , 100% > Zelldichte > 70% im 96-well Loch und guter Zustand der Zellen (mikroskopische Kontrolle und Zytotoxizität).

Die Proteinwerte wurden aus einer linearen Regression (acht BCA-Standards,  $R^2 \geq 0.985$ ) berechnet.

Die proteinspezifischen EROD-Werte werden durch Division der blindwertkorrigierten Fluoreszenzmittelwerte durch den Mittelwert der entsprechenden Proteinwerte erhalten. Die proteinspezifischen EROD-Werte der 2,3,7,8-TCDD-Standards werden für die Berechnung der Dose-Response Funktion benutzt und dienen als Response-Werte.

Die Dose-Response Kurve besteht aus acht 2,3,7,8-TCDD-Standards. Die Qualität der Kurvenanpassung wird durch Minimierung der Summe der Abweichungsquadrate:  $(Response_{wert} - Vorausberechnete_{wert})^2$  erhalten. Es wird keine Gewichtung der Minimierung der

Summe durchgeführt. Die 4 Parameter der Dose-Response Kurve (A: niedrigste Asymptote, B: Steigung der Kurve, C:EC<sub>50</sub> und D: höchste Asymptote) sind dann nach dieser Vorgehensweise erhalten und dokumentiert.

Die grafische Darstellung der experimentellen und berechneten Kurve dient zur zusätzlichen visuellen Kontrolle.

Die Response-Werte der Probenextrakte ergeben die 2,3,7,8-TCDD-Konzentration aus der optimierten 4-parametrischen Standardfunktion. Ergebnisse die sich oberhalb der EC<sub>80</sub> befinden, werden verworfen und eine darauf angepasste neue Verdünnungsreihe der Extrakte wird analysiert. Response-Werte unterhalb des Response-Wertes des niedrigsten Standards werden als LOD berichtet. Referenzproben zur Qualitätskontrolle werden intern dargestellt oder extern hinzugezogen und dokumentiert.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.2. Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse**

Zur Evaluierung des EROD-Bioassays mit kryokonservierten Zellen wurden Proben unterschiedlicher Zusammensetzung zum einen mit Dauerkulturzellen und gefrorenen Zellen gemessen und zum anderen unabhängig in 2 Laboren bestimmt. Des Weiteren wurden die Tests mehrfach mit Zellen aus unterschiedlichen Einfrierchargen wiederholt. So konnten für den Test die Intra- und Interassayvarianz bestimmt werden und somit die Erfüllung der Ansprüche an Testqualitäten gemäß EU-Richtlinien (Nr. 644/2017) evaluiert werden. Über Standardreihen wurde zudem die untere Nachweisgrenze („limit of detection“ LOD) bestimmt.

Die Ergebnisse der unabhängigen Messungen in den beiden Laboren der unterschiedlichen Proben sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Aus den Ergebnissen ergibt sich bei konservativer Berechnung über alle Probenmaterialien eine LOD von 0,1 BEQ pg/g Probe (BEQ = bioanalytisches Äquivalent), womit die Voraussetzungen für die Lebens- und Futtermittelanalyse gemäß EU-Richtlinien gegeben ist (EU Nr. 1259/2011, EU Nr. 277/2012, EU Nr. 1067/2013). Richtlinienkonform wurde ebenfalls die Nachweisgrenze für die quantitative Bestimmung („limit of quantification“ LOQ) ermittelt. Diese lag in beiden Laboren im Mittel bei 0,26 ±0,07 BEQ pg/g Probe bei hoher Reproduzierbarkeit, und war damit übereinstimmend mit dem Ergebnis der chemischen Analyse von 0,3 WHO<sub>2005</sub>-TEQ pg/g Probe (TEQ = toxisches Äquivalent). Somit kann den LOQ ebenfalls auf 0,3 BEQ pg/g Probe festgelegt werden.

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse über die Lagerungsdauer der kryokonservierten Mikrotiterplatten bei -80°C lag innerhalb von 4 Monaten bei Abweichungen unter 15% und entspricht somit den offiziellen Qualitätsanforderungen. Erst Lagerungsdauern von über 4 Monaten führen zum Verlust der Sensitivität (Abbildung 3.1). Es muss dabei betont werden, dass zu Gunsten der Anwenderfreundlichkeit im Hinblick auf nicht spezialisierte Kontrolllabore die Lagerung in einem handelsüblichen -80°C Gefrierschrank gewählt wurde, anstatt der üblichen Lagerung von gefrorenen Zellen unter flüssigem Stickstoff bei -196°C.

Die Übereinstimmung der beiden Labore für die insgesamt 31 unterschiedlichen Proben zeigte dabei einen Korrelationskoeffizienten von  $R^2 = 0.89$  und damit eine hohe unabhängige Reproduzierbarkeit der LOD und LOQ (Abbildung 3.2).

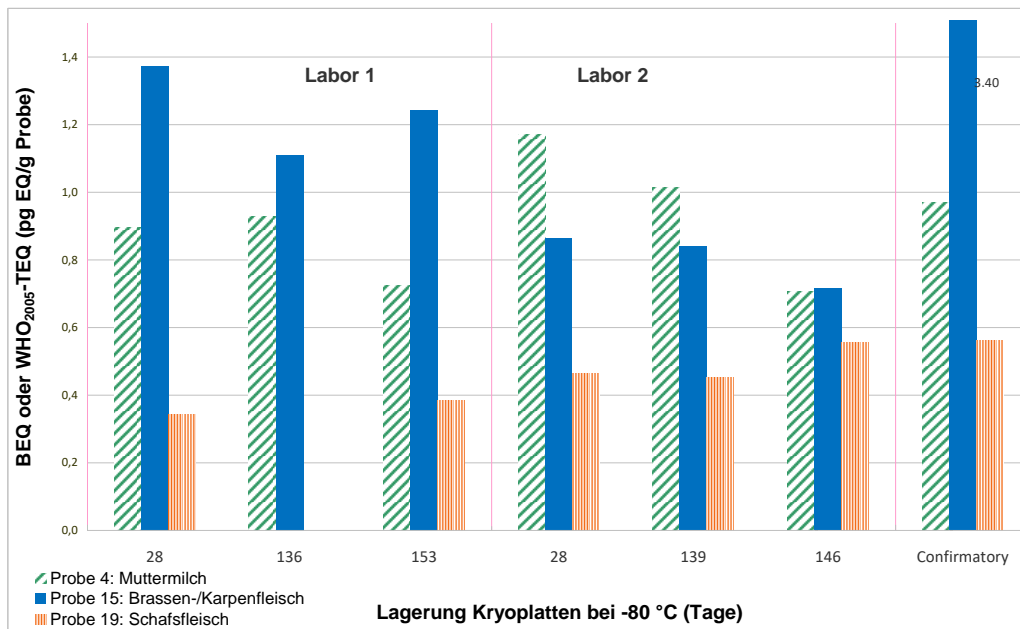


Abbildung 3.1: EROD Ergebnisse (pg BEQ/g Probe) für 3 Proben über die Lagerungsdauer (in Tagen) in zwei unabhängigen Laboren bei -80 °C. Die Ergebnisse wurden über die chemische Analyse bestätigt (pg WHO<sub>2005</sub>-TEQ/g Probe).

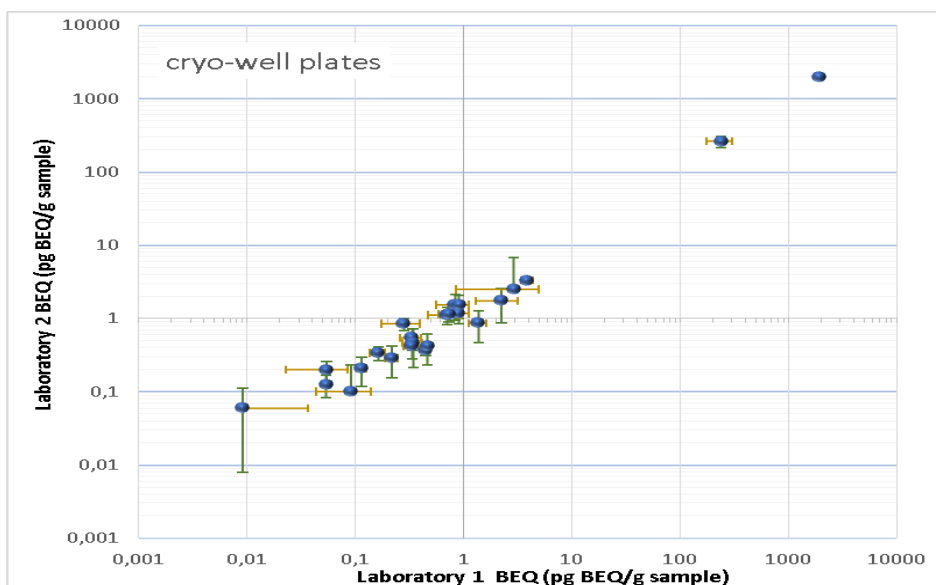


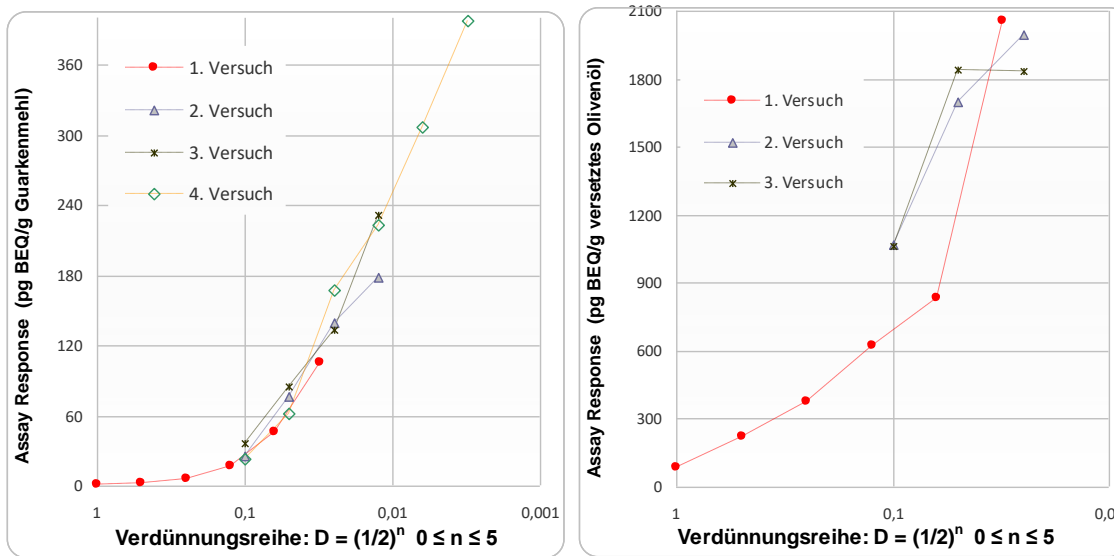
Abbildung 3.2: Übereinstimmung der bioanalytischen Äquivalente (BEQ pg/g Probe) in 31 Proben die in je 3 Replikaten (n=3) in zwei Laboren unabhängig gemessen wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SD) (n=3).

**Tabelle 3.1: EROD Bioassay Ergebnisse (pg BEQ/g Probe) anhand von kryokonservierten Mikrotiterplatten (n=3) und permanent kultivierten Zellen. HRGC/HRMS Ergebnisse als Summe von PCDD/F und Dioxin-ähnlichen PCB (pg WHO<sub>2005</sub>-TEQ/g Probe) sind dargestellt. n.d.: nicht detektierbar.**

Nr.	Matrix	EROD Bioassay mit kryokonservierten Mikrotiterplatten BEQ (pg/g Probe)		Analytisches Ergebnis	EROD Bioassay mit Dauerkulturzellen
Probe	Art des Probenmaterials	Durchschnitt Labor 1 ± SD	Durchschnitt Labor 2 ± SD	WHO <sub>2005</sub> -TEQ (pg/g Probe)	BEQ (pg/g Probe)
1	Lachsfleisch	3.86 ± 0.44	3.30 ± 0.24	8.01	6.57
2	Brassen-/Karpfenfleisch	0.84 ± 0.28	1.53 ± 0.59	3.60	3.89
3	Hühnereier	0.70 ± 0.23	1.11 ± 0.30	0.68	2.67
4	Muttermilch	0.90 ± 0.23	1.17 ± 0.34	0.97	2.01
5	Muttermilch	0.05 ± 0.03	0.20 ± 0.06	0.13	n.d.
6	Rinderleber	0.45 ± 0.04	0.24 ± 0.19	0.56	< 0.20
7	Rinderleber	0.19 ± 0.01	0.31 ± 0.05	0.30	0.40
8	Rinderleber	0.16 ± 0.03	0.34 ± 0.07	0.27	< 0.20
9	Leerwert von Nr. 1, 2 und 10 bis 15	n.d.	n.d.	-	n.d.
10	Guarkernmehl	0.09 ± 0.05	0.10*	0.08	n.d.
11	Guarkernmehl	239 ± 64	263 ± 46	71	122
12	Brassen-/Karpfenfleisch	2.24 ± 0.94	1.73 ± 0.86	4.32	2.43
13	Rindfleisch	0.03*	0.06 ± 0.05	0.08	1.60
14	Rindfleisch	0.05*	0.13 ± 0.04	0.06	1.05
15	Brassen-/Karpfenfleisch	1.37 ± 0.25	0.86 ± 0.40	3.40	2.78
16	Hühnereier	0.33 ± 0.07	0.54 ± 0.18	0.89	2.30
17	Hühnereier	0.46 ± 0.02	0.42 ± 0.19	0.86	2.35
18	Schafsleber	0.22 ± 0.03	0.29 ± 0.13	0.43	0.75
19	Schafsleber	0.34 ± 0.07	0.46 ± 0.25	0.56	1.17
20	Leerwert von Nr. 6,7,8, 21 und 22	n.d.	n.d.	-	n.d.
21	Schafsfleisch	0.90 ± 0.09	1.53 ± 0.54	1.42	1.62
22	Schafsfleisch	0.73 ± 0.15	1.14 ± 0.26	1.04	0.71
23	Leerwert von Nr. 24	n.d.	n.d.	-	n.d.
24	Muscheln	0.28 ± 0.11	0.85 ± 0.16	0.66	1.63
25	Leerwert von Nr. 4 und 5	n.d.	n.d.	-	n.d.
26	Leerwert von Nr. 27 und 28	n.d.	n.d.	-	n.d.
27	Robbenöl	2.90 ± 2.05	2.29*	2.30	10.8
28	Olivenöl versetzt mit TCDD	1949 ± 110	1965 ± 115	1249	1338
29	Leerwert von Nr. 30	n.d.	n.d.	-	n.d.
30	Geflügel Testmaterial	0.33 ± 0.05	0.41 ± 0.12	0.21	n.d.
31	Leerwert von Nr. 3 und 16 bis 19	n.d.	n.d.	-	n.d.

Fußnote: \* Probe nur einmal innerhalb von 3 Wiederholungen nachgewiesen.

Eine Limitation der Methode ergibt sich bei Proben, in denen zu viel Dioxin ist (Abbildung 3.3) bzw. bei Proben, die antagonistische bzw. zytotoxische Substanzen enthalten (Tabelle 3.2). Die zu stark belasteten Proben kann man durch eine Titrationsreihe valide ausschließen, während antagonistische bzw. zytotoxische Substanzen ein generelles Problem für Bioassays sind. Dieses Problem könnte jedoch durch den zusätzlichen Einsatz der Proben in dotierter Form, d.h. nach Zusatz einer definierten Menge von Dioxin, umgangen werden, da so falsch negative bzw. falsch zu niedrige Werte identifiziert werden können.



**Abbildung 3.3: Titrationsreihe zur Ermittlung der bioanalytischen Äquivalente (BEQ pg/g) in Guarkernmehl (links) und Olivenöl (rechts) welches mit TCDD (2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-Dioxin) in bekannter Konzentration versetzt wurde.**

**Tabelle 3.2: Nachweisgrenze, Übereinstimmung, Streuung (RSD<sub>r</sub>), und Reproduzierbarkeit (RSD<sub>R</sub>) der Probenanalyse in 2 Laboren.**

Nr.	Matrix	Fettgehalt	Maximalwert (ML) TEQ <sup>2</sup>	Nachweisgrenze TEQ	Übereinstimmung: BEQ- und TEQ-Wert der Probe beide ≤ oder > Nachweisgrenze		HRGC/HRMS WHO <sub>2005</sub> -TEQ	Streuung RSD <sub>r</sub> (%)	Streuung RSD <sub>r</sub> (%)	Reproduzierbarkeit RSD <sub>R</sub> (%)
Probe	Art des Probenmaterials	(%)	pg/g w.w. oder fat	2/3 of ML	Labor 1	Labor 2	(pg/g Probe)	Labor 1	Labor 2	Zwischen den Laboren
1	Lachsfleisch	6.20	6.5 w.w.	4.3	Falsch positiv	Falsch positiv	8.01	11%	7%	11%
2	Brassen-/Karpfenfleisch	2.90	6.5 w.w.	4.3	-	-	3.60	33%	38%	42%
3	Hühnereier	8.30	5.0 fat	3.3	-	-	0.68	33%	27%	32%
4	Muttermilch	4.51	5.5 fat	3.7	-	-	0.97	26%	29%	19%
5	Muttermilch	3.55	5.5 fat	3.7	-	-	0.13	58%	30%	81%
6	Rinderleber	unbekannt	0.5 w.w.	0.33	-	-	0.56	10%	16%	13%
7	Rinderleber	unbekannt	0.5 w.w.	0.33	-	-	0.30	3%	17%	41%
8	Rinderleber	unbekannt	0.5 w.w.	0.33	-	-	0.27	16%	22%	49%
9	Leerwert von Nr. 1, 2 und 10 bis 15	0			-	-	-	-	-	-
10	Guarkernmehl	0	1.5 w.w.	1.0	-	-	0.08	52%	0%	7%
11	Guarkernmehl	0	1.5 w.w.	1.0	-	-	71	27%	17%	7%
12	Brassen-/Karpfenfleisch	2.00	6.5 w.w.	4.3	-	Falsch negativ	4.32	42%	50%	18%
13	Rindfleisch	0.90 <sup>1</sup>	0.08 w.w.	0.05	Falsch positiv	-	0.08	***	87%	-
14	Rindfleisch	2.20	4.0 fat	2.7	Falsch positiv	-	0.06	***	34%	57%
15	Brassen-/Karpfenfleisch	2.30	6.5 w.w.	4.3	-	Falsch negativ	3.40	18%	46%	32%
16	Hühnereier	8.20	5.0 fat	3.3	-	-	0.89	22%	33%	34%
17	Hühnereier	8.40	5.0 fat	3.3	-	-	0.86	4%	45%	7%
18	Schafsleber	3.70	2.0 w.w.	1.3	Falsch negativ	Falsch negativ	0.43	13%	46%	19%
19	Schafsleber	5.90	2.0 w.w.	1.3	Falsch negativ	Falsch negativ	0.56	20%	54%	21%
20	Leerwert von Nr. 6,7,8, 21 und 22	0			-	-	-	-	-	-
21	Schafsfleisch	33.7	4.0 fat	2.67	-	-	1.42	10%	35%	36%
22	Schafsfleisch	37.7	4.0 fat	2.67	-	Falsch negativ	1.04	21%	23%	31%
23	Leerwert von Nr. 24	0			-	-	-	-	-	-
24	Muscheln	unbekannt	6.5 w.w.	4.3	-	-	0.66	39%	18%	71%
25	Leerwert von Nr. 4 und 5	0			-	-	-	-	-	-
26	Leerwert von Nr. 27 und 28	0			-	-	-	-	-	-
27	Robbenöl	100	2.5 fat	1.7	-	-	2.30	71%	173%	12%
28	Olivenöl versetzt mit TCDD	100	1.25 fat	0.8	-	-	1249	6%	6%	1%
29	Leerwert von Nr. 30	0			-	-	-	-	-	-
30	Geflügel Testmaterial	8.80	3.0 fat	2.0	-	-	0.21	16%	32%	15%
31	Leerwert von Nr. 3 und 16 bis 19	0			-	-	-	-	-	-

**Fußnote:** w.w. = Nassgewicht, fat = Fett, <sup>1</sup> Proben mit Fettgehalt < 2 % wurden mit der Nachweisgrenze in Nassgewicht angegeben, in der Annahme von 2 % Fettgehalt (gemäß EU Nr.

1259/2011). <sup>2</sup>: Maximale Obergrenzen basieren auf den Regularien (EC) Nr 1259/2011, 1881/2006 und EC Nr 1067/2013 für Leber Proben. \*\*\*: Nur ein Nachweis in drei Replikaten.

Die kompletten detaillierten Daten sind vom Konsortium zur Veröffentlichung eingereicht und werden so der Allgemeinheit frei zur Verfügung gestellt. Der Bioassay in der beschriebenen Form wird nicht patentiert und es bestehen keine Schutzrechte, so dass er für Wissenschaft und Aufsichtsbehörden kostenfrei zur Verfügung steht. Die beteiligte Firma acCELLerate wird den Bioassay aber zusätzlich für Labore anbieten, die nicht die Kapazität haben, die Mikrotiterplatten selbst herzustellen.

### **3.3. Voraussichtlicher Nutzen und Verwendbarkeit der Ergebnisse**

#### **Nutzen und Verwendbarkeit**

Der entwickelte Bioassay mit kryokonservierten Mikrotiterplatten ist voll einsatzbereit. Jede Aufsichtsbehörde, auch ohne Zellkulturlabor, kann diesen Bioassay sofort verwenden. Dadurch ist ein flächendeckender Einsatz eines biologischen Nachweisverfahrens für Dioxine gegeben.

#### **Kosten**

Die Kosten durch den Bioassay mit kryokonservierten Mikrotiterplatten sind wesentlich geringer als die Vorhaltung einer dauerhaften Zellkultur und entsprechenden Personal. Der Bioassay mit kryokonservierten Mikrotiterplatten kann von jeder labortechnischen Assistenz (z.B. BTA, CTA, MTA oder PTA) ohne spezielle Schulung nach Anleitung durchgeführt werden.

Die Materialkosten für die Herstellung der kryokonservierten Mikrotiterplatten sind ca. 25€ pro Platte in Eigenherstellung und ca. 50€ versandfertig, vakuumverpackt und eingefroren, wenn man diese in einem größeren Maßstab herstellt. Diese Kosten beinhalten Kulturmedium, Chemikalien, Plastikmaterial und Verpackung. Nicht einberechnet sind dabei die Personalkosten von ebenfalls ca. 50€. Somit wäre dies ein günstiger Screeningassay mit ca. 50Cent pro Probe Fixkosten (ohne Personal) bei Eigenherstellung.

Die Firma acCELLerate würde den Assay für ca. 230€/Mikrotiterplatte und entsprechenden Nachlässen bei größeren Mengen anbieten, womit für kleinere Labore ohne Selbsterstellung immer noch ein vertretbarer Testpreis von 4,60€ pro Probe entsteht.

Für die Testdurchführung fallen nur geringe Kosten von 3,50 pro Platte (ca. 7Ct/Probe bei voller Belegung und Doppelbestimmung) an Materialkosten an. Die Personalkosten belaufen sich auf ca. 30€, wobei während dieser Zeit mehrere Platten bearbeitet werden können, der Test also bei größerem Probenaufkommen günstiger wird.

Ein wesentlich größerer Kostenfaktor ist die Probenvorbereitung in der vereinfachten Form. Diese kostet zwar ca. 35€ pro Probe an Materialkosten, beträgt damit aber nur ca. 75% der Kosten, die für die Vorbereitung der chemischen Analyse anfallen würden. Die Personalkosten belaufen sich auf ca. 65€, wobei auch diese sich durch die gleichzeitige Bearbeitung mehrerer Proben verringern würden.

Im Rahmen der Versuchsdurchführung kamen in den Laboren noch ca. 30% Overhead (Aufschlag für Stellengemeinkosten und Verwaltungsgemeinkosten) hinzu.

Bei einer Plattenbelegung von 40 Proben (Doppelbestimmung je Probe plus Standardreihe) wäre man damit bei Gesamtkosten von ca. 24€/Probe bei Eigenherstellung bzw. ca. 30€/Probe bei Zukauf der fertigen Mikrotiterplatten. Mit diesen Kosten hätte man aber eine Gesamtaussage über die biologische Gefährdung, die bei der chemischen Analyse erst durch die Bestimmung vieler Einzelkomponenten zu ermitteln wäre und somit um ein Vielfaches höher.

#### 4. Zusammenfassung

Wie geplant konnten wir einen kryokonservierten EROD-Bioassay entwickeln, der auf vorgefertigten Mikrotiterplatten an die Endverbraucher ausgeliefert werden kann. Diese Mikrotiterplatten können dann direkt und ohne ein spezielles Zellkulturlabor für den Dioxinnachweis eingesetzt werden. Die Nachweisgrenzen LOD = 0,1 BEQ pg/g Probe und LOQ 0,3 BEQ pg/g Probe entsprechen dabei den Vorgaben der EU, genauso wie die Intra- und Interassayvarianz von unter 15%. Mit einer Lagerungsdauer von bis zu 4 Monaten bei -80°C ist der Bioassay auch im Haltbarkeitsbereich der gängigen vorgefertigten Enzymassays für die Routinediagnostik.

Somit erfüllt der Test die Anforderungen der COMMISSION REGULATION (EU) 2017/644 vom 05. April 2017.

Alle Details zum kryokonservierten Mikrotiterplatten EROD-Bioassay sind zur Veröffentlichung eingereicht und somit ohne Kosten und Schutzrechte für die Allgemeinheit frei verfügbar.

#### 5. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; ggf. mit Hinweisen auf weiterführende Fragestellungen

Im Projektantrag wurden 3 Projektziele formuliert:

1. Entwicklung und Validierung des Kryo-EROD-Assays
2. Optimierung der Probenvorbereitung
3. Validierung und Qualitätskontrolle des EROD- und Kry-EROD-Assays

Ziel des Projektes	Erreichte Ergebnisse am Ende des Projektes	Projektziel erfüllt
Entwicklung und Validierung des Kryo-EROD-Assays	Es wurde ein EROD-Bioassay auf kryokonservierten Mikrotiterplatten entwickelt und validiert, der den Anforderungen der COMMISSION REGULATION (EU) 2017/644 vom 05. April 2017 entspricht	JA, vollkommen, aber verbesserungsfähig, siehe Ausblick 1
Optimierung der Probenvorbereitung	Die Probenvorbereitung wurde optimiert und vereinfacht	JA, vollkommen, aber verbesserungsfähig, siehe Ausblick 2
Validierung und Qualitätskontrolle des EROD- und Kry-EROD-Assays	Der entwickelte EROD-Bioassay auf kryokonservierten Mikrotiterplatten wurde in zwei Laboren unabhängig validiert und einer Langzeitqualitätskontrolle unterzogen. Hieraus wurden eine Intra- und Interassayvarianz berechnet. Diese Varianz erfüllt die von der EU geforderten Qualitätsrichtlinien für Bioassays. Die Qualitätskontrolle schließt einen Abgleich mit dem chemischen Nachweis von Dioxinen ein. Des Weiteren wurde der Assay auf allen relevanten und verfügbaren	JA, vollkommen



	Proben getestet und validiert ( verschiedene Fischarten, verschiedene Fleischsorten, Hühnereier, Guarkernmehl, Muscheln, Robbenöl und Muttermilch). Für alle Proben war der Test geeignet.	
--	--	--

## Ausblick

Der jetzt etablierte Bioassay hat noch zwei Schwachstellen, zum einen das nicht rein synthetische bzw. pflanzliche Medium, zur Vermeidung von Dioxineinträgen und zum anderen das Problem mit Kontaminationen.

Für diese beiden Problemfelder würden wir gern folgende Lösungen durch unseren Verbund vorschlagen und in einem Anschlussprojekt in Angriff nehmen:

1. Etablierung des Assays in Protein-freiem oder Serum-freien Medien ohne tierische Proteinkomponenten. Dies setzt wiederum erhebliche Anforderungen und Anpassungen bei der Einfrierprozedur voraus. Zudem darf die Empfindlichkeit des Assays nicht unter der Veränderung des Mediums leiden. Im besten Fall kann aber die Nachweisgrenze sogar weiter gesenkt werden, da die pflanzlichen Proteine weniger Lipide enthalten.
2. Für die störenden Kontaminationen gibt es zwei Lösungsmöglichkeiten. Zum Einen kann die Aufbereitung der Proben so verändert werden, dass Dioxine und PCBs getrennt werden, so dass diese separat gemessen werden können. Zum anderen können im Assay Referenzproben mitgeführt werden, um die inhibierende Wirkung des Untersuchungsmaterials zu untersuchen. Dazu müssten Anpassungswerte bestimmt werden, damit später bei Vorliegen von inhibierenden Kontaminationen, auf die Wirkkonzentration von Dioxinen umgerechnet werden kann.

## 6. Literatur

1. Behnisch P.A. (2005) Rapid methods for dioxins in food and feed. In: van Amerongen A., Barug D., Lau-waars M. (Hrsg.): Rapid methods for biological and chemical contaminants in food and feed. Wageningen: Academic Publishers.
2. Behnisch PA, Hosoe K, Shiozaki K, Kiryu T, Komatsu K, Schramm KW, Sakai S. (2002a) Melting and incineration plants of municipal waste. Chemical and biochemical diagnosis of thermal processing samples (emission, residues). Environ Sci Pollut Res Int 9(5), 337-44.
3. Behnisch, P.A., Hosoe K., Brouwer A., Sakai S. (2002b) Screening of dioxin-like toxicity equivalents for various matrices with wildlife and re-combinant rat hepatoma H4IIE cells. TOXICOL SCI 69, 125–130.
4. Bernard A, Broeckaert F, De Poorter G, De Cock A, Hermans C, Saegerman C, Houins G (2002): The Belgian PCB/Dioxin Incident: Analysis of the Food Chain Contamination and Health Risk Evaluation. Environmental Research 88, 1-18
5. BioDetection Systems (BDS) (2009) CALUX- Switch on the light. <http://www.biodetectionsystems.com/1/hoofd/2.php>
6. Chou IC, Lee WJ, Wang LC, Chang-Chien GP, Lee WS, Lee H (2008): Validation of the CALUX bioassay as a screening and semi-quantitative method for PCDD/F levels in cow's milk. Journal of Hazardous Materials 154, 1166-1172
7. DGQ – Deutsche Gesellschaft für Qualität e.V. (2008) FMEA - Fehlermöglichkeits- und Einflussanalyse. Berlin: Beuth.
8. Eljarrat E., Barceló D. (2003) Priority lists for persistent organic pollutants and emerging contaminants based on their relative toxic potency in environmental samples. TRENDS ANAL CHEM 22 (10), 655–665.

9. Fürst P. (1998) Dioxine in Lebensmitteln. In: Oehme M. (Hrsg.): Handbuch Dioxine. Quellen, Vorkommen, Analytik. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
10. Giesy J.P., Hilscherova K., Jones P.D., Kannan K., Machala M. (2002) Cell bioassays for detection of aryl hydrocarbon (AhR) and estrogen receptor (ER) mediated activity in environmental samples. MAR POLLUT BULL 45 (1-12), 3–16.
11. Gizzi G, Hoogenboom LA, Von Holst C, Rose M, Anklam E (2005) Determination of dioxins (PCDDs/PCDFs) and PCBs in food and feed using the DR CALUX bioassay: results of an international validation study. Food Addit Contam 22(5), 472-481
12. Goerlich R (2011) Wirkungsbezogene Analytik -Schnelles Dioxin-Screening mit dem EROD-Bioassay soll Kosten senken. FoodLab 1(2), 32-34
13. Hädrich J, Kotz A, Wahl K, Malisch R (2012) Die Anwendung von Bioassays im Rahmen der Dioxin EU-Gesetzgebung.<http://www.bfr.bund.de/cm/343/die-anwendung-von-bioassays-im-rahmen-der-dioxin-eu-gesetzgebung.pdf>
14. Han D, Nagy SR, Denison MS (2004) Comparison of recombinant cell bioassays for the detection of Ah receptor agonists. Biofactors 20(1),11-22
15. Hanberg A, Stahlberg M., Georgellis A., Wit C, de Ahlborg U.G. (1991) Swedish dioxin survey: evaluation of the H4IIE Bioassay for screening environmental samples of dioxin-like enzyme induction. PHARMACOL TOXICOL 69, 442–449.
16. Hecker M, Hollert H (2009): Effect-directed analysis (EDA) in aquatic ecotoxicology: state of the art and future challenges. Environ Sci Pollut Res Int 16, 607-13
17. Herterich R, Schröder S (2011) Screeningverfahren für Dioxin- und Furankontrollen. Nachrichten aus der Chemie 59 (5),547-549.
18. Keiter S, Grund S, van Bavel B, Hagberg J, Engwall M, Kammann U, Klempt M, Manz W, Olsman H, Braunbeck T, Hollert H (2008): Activities and identification of aryl hydrocarbon receptor agonists in sediments from the Danube river. Anal Bioanal Chem 390, 2009-19
19. Kommission der Europäischen Gemeinschaften KOM (2001) 593, vom 24.10.2001, Strategie der Gemeinschaft für Dioxine, Furane und polychlorierte Biphenyle.
20. Kotz A, Hädrich J, Wahl K, Malisch R (2012) Screening- und Bestätigungsverfahren in der Dioxin- PCB-Analytik. <http://www.dioxin-test.de/pdfs/AKotz.pdf>
21. Lake IR, Foxall CD, Lovett AA, Fernandes A, Dowding A, White S, Rose M (2005): Effects of river flooding on PCDD/F and PCB levels in cows' milk, soil, and grass. Environ. Sci. Technol. 39, 9033-9038
22. Lee L.E.J., Clemons J.H., Bechtel D.G., Caldwell S.J., Han K.B., Pasitschniakarts M., Mosser D.D. & Bols N.C. (1993): Development and Characterization of a Rainbow-Trout Liver-Cell Line Expressing Cytochrome P450-Dependent Monooxygenase Activity. Cell Biology and Toxicology (9), 279-294.
23. Lenoir D, Klobasa O, Pandelova M, Henkelmann B, Schramm KW (2012) Laboratory studies on formation and minimisation of polychlorinated dibenzodioxins and -furans (PCDD/F) in secondary aluminium process. Chemosphere 87(9),998-1002
24. Li W, Wu WZ, Barbara RB, Schramm KW, Kettrup A (1999) A new enzyme immunoassay for PCDD/F TEQ screening in environmental samples: comparison to micro-EROD assay and to chemical analysis. Chemosphere 38(14):3313-8.
25. Pelclova D, Fenclova Z, Urban P, Ridzon P, Preiss J, Kupka K, Malik J, Dubska Z, Navratil T (2009): Chronic health impairment due to 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin exposure. Neuro Endocrinol Lett 30, 219-224
26. Poland A., Knutson J.C. (1982) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: Examination of the mechanism of toxicity. ANNU REV PHARMACOL 22, 517–554.
27. Safe S. (1998) Hazard and Risk Assessment of Chemical Mixtures Using the Toxic Equivalency. ENVIRON HEALTH PERSP 106 (4), 1051–1058.
28. Sandermann W., Stockmann H., Casten R. (1957) Über die Pyrolyse des Pentachlorphenols. ANAL BIOCHEM 90 (5), 690–692.
29. Thiem I., Böhmler G., Borowski U. (2006) Nachweis von Dioxinen und dioxinähnlichen Substanzen mit dem Micro-EROD-Bioassay: Untersuchung von Milch und Rinderfett. J VERBR LEBENSM 1 (4), 310–316.
30. Umweltbundesamt Dessau-Roßlau (2009) Chemikalienpolitik und Schadstoffe, REACH. <http://umweltbundesamt.de/chemikalien/dioxine.htm> [08.02.2010].
31. van den Berg M., Birnbaum L., Bosveld A.T.C., Brunström B., Cook P., Feeley M., Giesy J.P., Hanberg A., Hasegawa R., Kennedy S.W., Kubiak T., Larsen J.C., van Leeuwen F.X.R., Dijen Liem A.K., Nolt C., Peterson R.E., Poellinger L., Safe S., Schrenk D., Tillitt D., Tysklind M., Younes M., Wærn F., Zacharewski T. (1998) Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs and PCDFs for humans and wildlife. ENVIRON HEALTH PERSP 106, 775–792.
32. Verordnung (EU) Nr. 252/2012 der Kommission vom 21. März 2012 zur Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Kontrolle der Gehalte an Dioxinen, dioxinähnlichen PCB und nicht dioxinähnlichen PCB in bestimmten Lebensmitteln sowie zur Aufhebung der Verordnung (EG) Nr. 1883/2006
33. Verordnung (EU) Nr. 277/2012 der Kommission vom 28. März 2012 zur Änderung der Anhänge I und II der Richtlinie 2002/32/EG des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich der Höchstgehalte und Aktionsgrenzwerte für Dioxine und polychlorierte Biphenyle in der Tierernährung

34. Verordnung (EU) Nr. 278/2012 der Kommission vom 28. März 2012 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 152/2009 hinsichtlich der Bestimmung der Gehalte an Dioxinen und polychlorierten Biphenylen
35. Verordnung (EU) Nr. 1259/2011 der Kommission vom 2. Dezember 2011 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 hinsichtlich der Höchstgehalte für Dioxine, dioxinähnliche PCB und nicht dioxinähnliche PCB in Lebensmitteln
36. Verordnung (EG) Nr. 466/2001 der Kommission vom 8. März 2001 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln.
37. Weber R, Tysklind M, Gaus C (2008): Dioxin - contemporary and future challenges of historical legacies. Environmental Science and Pollution Research 15, 96-100
38. WHO (2007) Dioxins and their effects on human health. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs225/en/>
39. Wobst H, Petersen B, Goerlich R (2012a) Dioxine in Lebensmitteln - ein anhaltendes Problem: Optimierung und Standardisierung des Mikro-EROD-Bioassays als Dioxin-Schnelltest. Food-Lab 3, 2-4
40. Wobst H, Petersen B, Goerlich R (2012b) Getting Dioxins under control ?! FMEA – an efficient tool to stabilize the Micro-EROD-bioassay as a screening-method. Food-Lab intern. 1, 23-25

Mit den besten Grüßen,

Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Lothar Rink  
Prof. Dr. Dr. Karl-Werner Schramm