

Michael Leuhn, Freising, und Gabriela Garcés-Sánchez, Garching

Neue molekularbiologische Ansätze zur Bestimmung der Vitalität von Krankheitserregern

Auch im landwirtschaftlichen Bereich hat die Quantifizierung infektiöser Krankheitserreger in Umweltproben, Futter- oder Nahrungsmitteln eine zentrale Bedeutung, um Epidemien oder Erkrankungen vorzubeugen. Traditionelle Methoden zur Bestimmung der Erreger werden zunehmend durch molekularbiologische Techniken ersetzt. Diese Methoden sind allerdings nur in der Lage, tote von lebenden (infektiösen) Zellen zu unterscheiden, wenn ein Selektionsschritt, der eine Aktivierung des Metabolismus enthält, der eigentlichen Messung vorgeschaltet ist. Dieser Artikel stellt solche molekularbiologischen Techniken vor.

Dr. Michael Leuhn ist wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Landtechnik, Bauwesen und Umwelttechnik der LfL und leitet die Arbeitsgruppe Mikrobiologie im Arbeitsschwerpunkt Biogas; Vöttinger Str. 36, 85354 Freising; e-mail: michael.leuhn@lfl.bayern.de. Zudem ist er verantwortlicher Wissenschaftler für den gentechnischen und Infektionsschutz-Bereich am Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft der TUM, an dem Dipl.-Biol. Gabriela Garcés-Sánchez als wissenschaftliche Mitarbeiterin promoviert.

Schlüsselwörter

Krankheitserreger, Vitalität, Hygiene, Molekularbiologie

Keywords

Pathogens, viability, hygiene, molecular biology

Literatur

Literaturhinweise sind unter LT 07114 über Internet <http://www.landwirtschaftsverlag.com/landtech/local/fliteratur.htm> abrufbar.

Ein verlässlicher Infektionsschutz ist bei Human-, Tier- und Phytohygiene sowie Pflanzenschutz von zentraler Bedeutung. Er dient dazu, Mensch, Tier und Pflanzen vor Krankheitserregern zu schützen, die von außen aufgenommen oder in ein bestimmtes Gebiet eingetragen werden könnten.

Dementsprechend sind für sensible Bereiche beispielsweise über die EU-Hygieneverordnung, die Düngemittelverordnung oder die Bioabfallverordnung Routineuntersuchungen zu sogenannten Indikatorkeimen vorgesehen. Ein positives Ergebnis gibt dabei den Hinweis, dass Krankheitserreger im untersuchten Material vorhanden sein können. Die Charge solchen Materials darf dann nicht der ursprünglichen Bestimmung entsprechend weiterverwertet werden und ist der Hygienisierung erneut zuzuführen, was hohe Kosten verursachen kann.

Zur Überwachung des hygienischen Status werden klassische mikrobiologische, kultivierungsabhängige Methoden eingesetzt. Diese haben den Vorteil, dass vermehrungsfähige Organismen - Krankheitserreger oder Indikatoren - bestimmt werden. Viele dieser Methoden zeigen allerdings mangelhafte Spezifität, erzeugen also auch falsch positive oder falsch negative Ergebnisse, benötigen eine zu lange Bearbeitungszeit, erfordern speziell ausgebildetes Personal und teure Ausrüstung, sind zu teuer oder haben andere Nachteile. Hinzu kommt, dass sich einige wichtige Krankheitserreger wie etwa Kryptosporidien oder Noroviren nicht oder nur äußerst schwer kultivieren lassen.

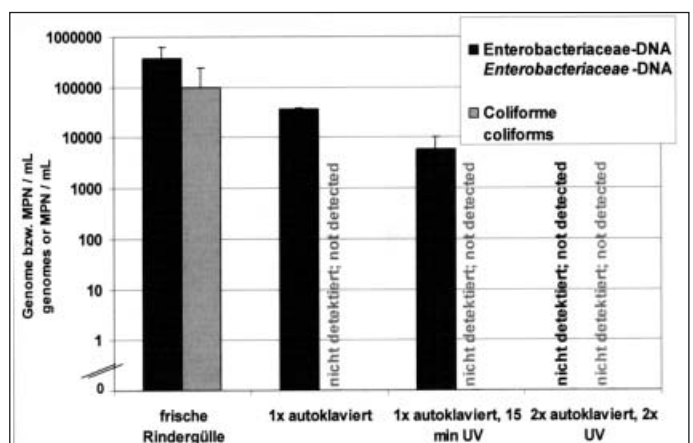
Aus diesem Grund wurde in jüngerer Vergangenheit in vielen Bereichen versucht, die etablierten klassischen Methoden durch neue molekularbiologische Bestimmungsverfahren zu ersetzen und alternative Verfahren zu entwickeln. In der Lebensmittelüberwachung haben mittlerweile insbesondere PCR (Polymerase-Kettenreaktion)-gestützte Verfahren Einzug gefunden, aber auch im Bereich Pflanzenschutz werden inzwischen serologische Verfahren, die meist Antikörper gegen bestimmte Oberflächenstrukturen der Zielorganismen benutzen, neben verschiedenen PCR-Methoden im Routine-Nachweis verwendet.

Obwohl vor allem die Spezifität und Schnelligkeit der serologischen und PCR-gestützten molekularbiologischen Verfahren unbestritten sind, gab es doch immer wieder Zweifel, ob positive Nachweise mit diesen und anderen molekularbiologischen Ansätzen auf Anwesenheit lebensfähiger Zielorganismen beruhen. Insbesondere nach einem Hygienisierungsschritt könnten die Zielmoleküle trotz Absterbens der Zielorganismen oder Verlust ihrer infektiösen Eigenschaften noch lange in der Probe erhalten und nachweisbar bleiben und damit falsch positive Ergebnisse hervorrufen, was zu unnötigen Kosten und Verunsicherung führen kann.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher, einen Überblick über die im landwirtschaftlichen Bereich zur Bestimmung von Krankheitserregern meist verwendeten molekularbiologischen Techniken, ihre Einsatzbereiche und ihre Limitierungen zu geben. Der

Bild 1: Reduktion der DNA-Kopienzahl von Enterobacteriaceae und der Keimzahlen (Most Probable Number, MPN) von Koliformen durch verschiedene physikalische Behandlungen zur Abtötung

Fig. 1: Reduction by different physical hygienization treatments of DNA copies of Enterobacteriaceae and of viable counts (most Probable Number, MPN) of coliforms



Die mit qPCR erzielten höheren Werte für Enterobacteriaceae beruhen darauf, dass Coliforme nur einen Bruchteil der Enterobacteriaceae darstellen.

Schwerpunkt wird dabei auf PCR-basierte Techniken gelegt. Besondere Berücksichtigung findet die Frage, inwieweit sie zur Bestimmung der Lebensfähigkeit der Zielorganismen geeignet sind.

Molekularbiologische Methoden und Anwendungen im Überblick

Die im Folgenden genannten Methoden lassen sich prinzipiell für alle landwirtschaftlich relevanten Medien anwenden. Aus diesen Trägermedien müssen zur Quantifizierung (nicht bei „in-situ“-Methoden) entweder die Organismen (Krankheitserreger) oder die Zielmoleküle extrahiert und in eine reine oder reinere Phase überführt werden, um Störungen der Messung durch andere Inhaltsstoffe in den Trägermedien zu vermeiden. Hier sind Routinemethoden entwickelt worden und Extraktions-Kits kommerziell erhältlich. Zumeist werden chemisch/physikalische, zuweilen aber auch Extraktionsverfahren mit einer serologischen Komponente verwendet [1, 2, 3]. Die Kenntnis der Extraktions-Effizienz ist ein wesentlicher Punkt zur Bestimmung der Methoden-Nachweisgrenze, die dokumentiert sein sollte [4]. Diese muss so tief wie möglich liegen, die Methode also von der Probe bis zum Messsignal bestmöglich sensitiv sein, da bereits Spuren von Krankheitserregern nach Vermehrung im geeigneten Wirt Krankheiten auslösen können.

Ein Problem stellen die oft nur kleinen analysierbaren Probenmengen dar, da sie repräsentativ für meist große Chargenmengen sein sollen. Entsprechend gut muss die Probenauswahl für Mischproben erfolgen, damit Extrapolierbarkeit der Daten gewährleistet ist. Die Methoden können nach der Art der Zielmoleküle untergliedert werden.

Oberflächenstrukturen

Serologische Methoden nutzen die Fähigkeit von (markierten) Antikörpern, sich spezifisch an bestimmte Oberflächenstrukturen von Proteinen oder Lipiden zu binden und so den markierten Organismus über eine Eichreihe quantifizieren zu können. Die Messung kann zum Beispiel über einen Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay (ELISA) oder Fluoreszenzmikroskopie und Bildanalyse erfolgen.

Deoxy-Ribonukleinsäure (DNA)

Von der klassischen PCR mit nachgeschaltetem Gelelektrophorese-Nachweis der gebildeten Produkte sind inzwischen verschiedene Techniken zur Bearbeitung unterschiedlicher Fragestellungen abgeleitet worden. Die Spezifität wird dabei über das Design der Primer und die Temperaturführung in der PCR gesteuert. Zur verlässlichen Quantifi-

zierung eignen sich nur sogenannte Real-Time-Systeme (qPCR, quantitative PCR), wobei über eine Dotierung der Probe mit definierten Standards (Standard-Spiking) eine absolute Quantifizierung möglich ist [1, 4, 5].

Der qPCR-Ansatz ist äußerst spezifisch und kann mit Vorschaltung einer geeigneten Extraktionsroutine äußerst sensitiv zur Quantifizierung sogar für Gülleproben eingesetzt werden. Die ermittelten DNA-Kopienzahlen und die Lebendkeimzahlen sind dabei in Systemen mit hoher biologischer Aktivität wie frischer Gülle praktisch identisch, die Werte klaffen allerdings nach abtötenden Maßnahmen oder auch subletalem Stress teilweise drastisch auseinander (*Bild 1*) [6, 7]. Wegen des möglichen Durchsatzes mit schnellen Ergebnissen und der hohen Spezifität und Sensitivität eignet sich die qPCR hervorragend zum Screening.

In einem „Frühwarnsystem“ kann der Einsatz der qPCR sehr ökonomisch und zeitsparend sein, da nur die positiven Befunde mit Physiologie-basierten Tests überprüft werden müssen [1]. Ein noch höherer Durchsatz könnte theoretisch mit DNA-Microarray-Systemen erreicht werden, allerdings werden hier DNA-Mengen der Pathogene in einer Höhe benötigt, wie sie in Umweltproben praktisch nicht vorkommen.

Ribonukleinsäuren (RNA-Arten)

Von den verschiedenen RNA-Arten wird zumeist ribosomale RNA (rRNA) und Messenger-RNA (mRNA), seltener Transfer-RNA (tRNA) neben viraler RNA (vRNA) als Zielmolekül genutzt. Mit Vorschaltung einer Reversen Transkription (RT, Überschreiben von RNA in DNA) kann über RTqPCR prinzipiell jede RNA-Art quantifiziert werden. Das gleiche gilt für die NASBA (Nucleic acid sequence-based amplification), die in einer isothermen Reaktion spezifisch RNA vermehrt, wobei die RNA-Ausgangskonzentration in der Probe über Echtzeit-Erfassung der Reaktionen ähnlich wie bei der qPCR quantifiziert werden kann. Allerdings sind abhängig vom physiologischen Zustand der Zielorganismen unterschiedlich viele RNA-Moleküle pro Zelle vorhanden, weswegen eine absolute Quantifizierung von Organismen über Erfassung von RNA schwierig ist und Standardisierung erfordert.

Prinzipiell ließe sich auch die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) zur Quantifizierung von Zielorganismen in Umweltproben nutzen, die mikroskopische Bildanalyse ist aber sehr aufwändig und vor allem bei inhomogenem Probenmaterial kaum statistisch abzusichern. Hinzu kommen Unsicherheiten vor allem bei der Permeabilisierung von Zielzellen und der Zugänglichkeit für die Sonden in komplexen Umweltproben. Die Vorteile der FISH liegen

daher mehr in der räumlichen Darstellung von Interaktionen zwischen Mikroorganismen und Substrat.

Kombinierte Methoden

Nach einem Abtötungsschritt werden allerdings bei alleiniger Anwendung der eben genannten Methoden wegen der Stabilität der DNA und RNA auch abgestorbene Organismen erfasst [5, 6, 7, 8]. Sie sind damit nur mit vorgeschaltetem Selektionsschritt, der eine Aktivierung des Metabolismus enthält, zur Dokumentation von Hygienisierung oder Absterben geeignet.

Wegen der hervorragenden Eignung der molekularen Methoden zur spezifischen, sensitiven und schnellen Quantifizierung sind inzwischen eine Reihe von kombinierten Verfahren etabliert worden, die die Bestimmung von infektiösen Organismen/Krankheitserregern zulassen.

Vor allem für Bakterien ist die Vorschaltung eines selektiven Anreicherungs-schritts vor den spezifischen Nachweis etwa über PCR (vorzugsweise qPCR) zu nennen. Tote Einheiten vermehren sich nicht und werden entscheidend ausgedünnt. Die Quantifizierung erfolgt über die Most-Probable-Number (MPN) –Analyse. Beispielfhaft wurde dies für thermophile *Campylobacter* gezeigt [7]. Obwohl ein Kultivierungsschritt eingeschaltet ist, spart dieser Ansatz gegenüber herkömmlichen Verfahren Zeit und Geld.

Für Krankheitserreger, die sich in künstlichen Medien nicht vermehren lassen, etwa Parasiten wie Kryptosporidien oder bestimmte Viren, können Zellkultursysteme (oder Tierwirte) den Schritt des Ausschlusses toter und nicht-infektiöser Einheiten und der selektiven Anreicherung lebender Einheiten übernehmen. Die Quantifizierung kann über eine Standard-Eichreihe zum Beispiel mit (q)PCR oder Immunfluoreszenz (Zellkultur PCR, Zellkultur-IFA) erfolgen [7, 8]. Allerdings sind Zellkulturen äußerst empfindlich, teilweise langwierig und erfordern geschultes Personal. Deswegen wird für die Routine-Praxis versucht, sie durch alternative Verfahren zu ersetzen.

Hier konnten wir in jüngster Zeit ein Verfahren entwickeln, das auf der Quantifizierung der Induzierbarkeit bestimmter Gene (also der Fähigkeit, von DNA mRNA zu bilden) beruht [8]. Je mehr mRNA in einer bestimmten Zeit nach der Induktion (Hitze, Substrat) gebildet wird, desto mehr aktive Einheiten liegen vor. Während nach der abtötenden Behandlung keine mRNA-Produktion mehr induzierbar war, zeigte die unbehandelte Kontrolle höhere mRNA-Gehalte aufgrund der Bildung während der Induktionszeit.