Erfahrungen über Möglichkeiten und Grenzen des Nachweises von Pathogenen und deren Toxinen in der Lebensmittelhygiene = Detection of pathogens and toxins in food : experiences about the efficiency and limits of some respective techniques

Autor(en): **Fey, H.**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **82 (1991)**

Heft 6

PDF erstellt am: **31.05.2024**

Persistenter Link: https://doi.org/10.5169/seals-982432

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.
Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.
Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Ein Dienst der *ETH-Bibliothek*
ETH Zürich, Rämistrasse 101, 8092 Zürich, Schweiz, www.library.ethz.ch

http://www.e-periodica.ch

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg., **82**, 571–578 (1991)

H. Fey, Liebefeld-Bern

Erfahrungen über Möglichkeiten und Grenzen des Nachweises von Pathogenen und deren Toxinen in der Lebensmittelhygiene

Detection of Pathogens and Toxins in Food. Experiences about the Efficiency and Limits of some Respective Techniques

Ich möchte – pars pro toto – in diesem Zusammenhang über ein paar Erfahrungen berichten, die mir wichtig erscheinen. Alles ist schon gesagt worden, verliert aber durch Wiederholung nicht an Bedeutung.

Zuerst ein Wort zum *Salmonella*-Nachweis, zu welchem sich vor Jahren in zunehmendem Masse *Campylobacter* und *Yersinia* gesellten, die zu meiner Zeit die *Salmonella*-Zentrale noch nicht beschäftigten. Offenbar hat mittlerweile *Campylobacter* die Salmonellen an zahlenmässiger Bedeutung überrundet. Herr Nicolet hat deshalb in verdienstvoller Weise die Aufgabe der ehemaligen Zentrale bedeutend erweitert, und ich wünsche ihm und Herrn Burnens vollen Erfolg in der Erfüllung dieser Aufgabe.

Die Erkennung dieser Pathogenen erfolgte seit jeher über Selektions- und Differenzierungsmedien, die offenbar immer besser wurden, und zwar zumeist basierend auf der Nichtvergärung von Lactose. Ein gewichtiger Nachteil war der, dass auf diesen nicht nur *Salmonella-*, sondern auch *Proteus*-Kolonien farblos wuchsen. Es scheint, dass neue Medien farbige *Salmonella*-Kolonien liefern, die sich von allen anderen abheben.

Bei allen Empfehlungen von solchen Medien kam und kommt immer noch zu wenig zum Ausdruck, dass die Selektion nicht völlig spezifisch ist, sondern überlappend erwünschte Keime mehr oder weniger gehemmt, unerwünschte aber nicht gehemmt werden. Die Folge ist die, dass man mit zwei Anreicherungsmedien und zwei bis drei Isoliermedien mehr spezifische Keime isoliert als mit weniger Medien. Der Laborleiter hat also einen durch Ökonomie diktierten Optimierungsentscheid zu treffen und seine Einsender immer wieder darauf aufmerksam zu machen, dass er nur einen Teil der gesuchten Keime findet. Die Diagnose heisst also immer noch: «Keine Salmonellen nachgewiesen» und nicht «Keine Salmonellen vorhanden».

Ist der Keim isoliert, so schliesst sich die Typisierung an. Das war nicht immer unumstritten. Es gab während Jahren Vorschläge, nur noch *S. ENTERITIDIS* als Gastroenteritis-Erreger zu diagnostizieren und nicht *S. bern, S. wohlen, S. wil* und *S. zürich.* In der Tat müssten vom Standpunkt einer reinen Individualmedizin aus nur *S. typhi, S. paratyphi* A, B und C und allenfalls noch *S. choleraesuis* spezifiziert werden, weil diese ein typhöses Krankheitsbild erzeugen, der ganze Rest aber Gastroenteritis macht (cum grano salis, übrigens). Das ging soweit, dass seinerzeit der Zürcher Regierungsrat beabsichtigte, die Schweiz. Salmonellazentrale nicht weiter finanzieren zu helfen und die Waadt flugs nachzog. Bei einer Enquète in allen interessierten Laboratorien zeigte es sich, dass eine Typisierung nach wie vor einem Bedürfnis entsprach, wobei vor allem die lebensmittelhygienischen Laboratorien besonders hilfreich waren.

Tatsächlich bedeutet der Verzicht auf Typisierung auch einen Verzicht auf die Möglichkeit der epidemiologischen Quellensuche. Dies ist, so meine ich, eine nach wie vor wichtige medizinisch-mikrobiologisch-hygienische Aufgabe, um so mehr als es nicht viel Sinn macht, die *Salmonella*-Typisierung aufzugeben und dafür die *Campylobacter*-Typisierung an die Hand zu nehmen. Ein möglicher Kompromiss bestünde darin, dass man im Sinne der Ökonomie der Kräfte vorerst auf eine Typisierung verzichtet, die Stämme im Stich behält, und dann, wenn sich eine Ausweitung im Sinne eines Ausbruchs ergibt, die Typenabklärung vollzieht, sei es nur mittels Serologie oder unter Einschluss der Lysotypie.

Nach wie vor bedauere ich, dass in der Schweiz, im Gegensatz zu überall im Ausland, ein umfassender feldepidemiologischer Dienst, der sich nicht nur mit Salmonellen abgibt, nicht existiert. Anlässlich der Typhusepidemie von Zermatt wäre es ein Leichtes gewesen, so etwas auf die Dauer aufzuziehen, aber die Gelegenheit wurde verpasst. D.h. man hat die Salmonellazentrale etwas ausgebaut, in der falschen Meinung, das wäre ein Epidemiezentrum. Sie war es nie, sondern war und ist nach wie vor ein Referenzlabor.

Man baut statt dessen auf die diagnostischen Laboratorien, deren Mitarbeiter aber ausgerechnet während eines Ausbruchs zu Hause benötigt werden. Der Kantonstierarzt und Kantonsarzt sind eher Registraturbehörden. Es bleibt der Lebensmittelhygieniker, der sich sur place begeben kann, aber er kann den Mediziner oder Veterinärmediziner nicht ersetzen.

Das stete Bemühen des *Salmonella*-Nachweises war seit jeher die Beschleunigung des Verfahrens. Als dann die Immunofluoreszenz anfangs der 60er Jahre allgemein verfügbar wurde, stürzten sich viele auf diese elegante Methode in der Hoffnung, aus Stuhl oder gar Lebensmitteln, wenn möglich direkt oder aber nach Anreicherung, innerhalb von Stunden die Keime zu sehen. Die Enttäuschung folgte auf dem Fuss, weil jede mikroskopische Methode viel zu wenig sensitiv und auch zu zeitaufwendig ist. Es braucht Zehntausende von Keimen ml^{-1}, bis man in vielen Gesichtsfeldern einen einzigen sieht. Es war auch unmöglich, die geforderte Polyvalenz der Konjugate zu erreichen.

In ihrem Enthusiasmus über die neue Methode, welche die Diagnose z. B. der Tollwut, der Scharlach-Streptokokken und der Gonorrhoe auf eine ganz neue Ebene stellte, gingen einige so weit, die bewährte Objektträgeragglutination, die in

Sekunden das Resultat liefert, durch die FA-Technik zu ersetzen! Da kann man am besten Frisch aus «Biedermann und die Brandstifter» zitieren:

«Was nämlich jeder voraussieht, lange genug,
Dennoch geschieht es am End:
Blödsinn, der nimmerzulösende jetzt.»

Als die hochsensible Methode des Radio Immuno Assay in den verschiedenen Spielarten verfügbar wurde, habe ich sofort damit gearbeitet (bovine Ig-Klassen und Tetanus-Toxin). Als schweren Nachteil empfand ich die teure Apparatur, die kurze Halbwertszeit der Konjugate und die aufwendigen Koppelungsverfahren. Als dann ELISA kam, habe ich deshalb sogleich dieses ingeniöse Verfahren für uns nutzbar gemacht.

Allerdings haben wir niemals den Erreger-Nachweis mit ELISA angestrebt, obwohl diese Methode dazu durchaus geeignet wäre, wie Mattingly et al. zeigten: Diese Autoren haben polycarbonatbeschichtete Stahlkugeln mit zwei verschiedenen Hybridom-Antikörpern beschichtet, die *alle Salmonella*-H-Antigene erkennen. Nach Anreicherung wird das Flagellen-Antigen durch Kochen solubilisiert und danach mit diesem Spezial-ELISA in 2–3 Stunden nachgewiesen. Ich habe für dieses erstaunliche Phänomen niemals eine Erklärung gefunden. Erstens ist im klassischen Kauffmann-White Schema kein common H-Antigen bekannt, und zweitens wundere ich mich über die Hitzesolubilisierung des Flagellin-Proteins. Die Resultate waren aber eindeutig und – an ca. 100 Stämmen der Salmonellazentrale geprüft – auch spezifisch.

ELISA, als höchst versatile, leistungsfähige und sensitive Methode hat sich auf breitester Ebene durchgesetzt und es vor allem in der Virologie ermöglicht, die langsame kulturelle Erregerisolierung durch den Antigen-Nachweis zu ergänzen. Es gab in der Folge einen eigentlichen Boom an Immuno-Diagnostika, zu denen ich selbst, zusammen mit Walter Bommeli, Bern, einen Kit für Staphylokokken-Enterotoxine beigetragen habe.

Über ELISA möchte ich jetzt ein paar Einsichten bekanntgeben: Wenn möglich sollte man direkte Methoden anwenden, d.h. beim Antigennachweis den entsprechenden Antikörper direkt markieren. Je mehr Schritte benötigt werden, um so zeitaufwendiger und unspezifischer wird der Test. Der Sandwichtest hat sich in unseren Experimenten dem kompetitiven Verfahren als überlegen erwiesen (Abb. 1, Abb. 2).

Um die Amplified Enzyme Immunoassays ist es wieder etwas stiller geworden. Jedenfalls hat das NAD-NADH-System offenbar den Durchbruch nicht geschafft. Ob das indessen den von Herrn Gottstein erwähnten europiummarkierten Antikörpern gelingen wird, muss sich zeigen. Durchbruch bedeutet, dass mehrere Zehnerpotenzen an Sensitivität gewonnen werden können.

Gegen Ende meiner Tätigkeit habe ich mich dem Streptavidin-Biotin-System zugewendet. Streptavidin ist dem Avidin wegen der beinahe neutralen Ladung, welche Autoaggregationen entgegenwirkt, vorzuziehen (Abb. 3).

Das System hat mir deshalb so gefallen, weil einerseits die Biotinylierung der Reaktionspartner denkbar einfach ist sowie stabile Konjugate schafft, und weil der Avidinkomplex eine hohe Bindungskraft aufweist. Zudem gelingt es durch einfa-

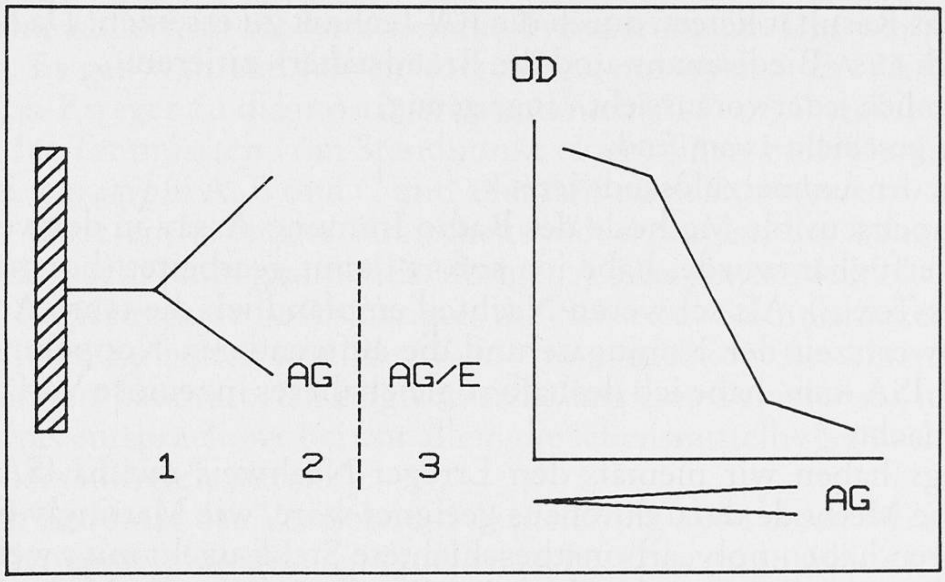

Abb. 1. Kompetitive Methode
Antikörper wird als «coat» insolubilisiert (1). Danach wird mit der Antigen enthaltenden Probe inkubiert (2). Gleichzeitig oder mit Verzögerung von etwa 2 h wird enzymgekoppeltes Antigen dazugegeben (3).
Viel Antigen ergibt einen niedrigen OD-Wert und umgekehrt
(Abb. 1–3 aus Fey, H.: Enzyme linked immunosorbent assay. In: Blobel, H. und Schliesser, Th. (Eds.), Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, S. 345–371. Gustav Fischer, Jena 1991)

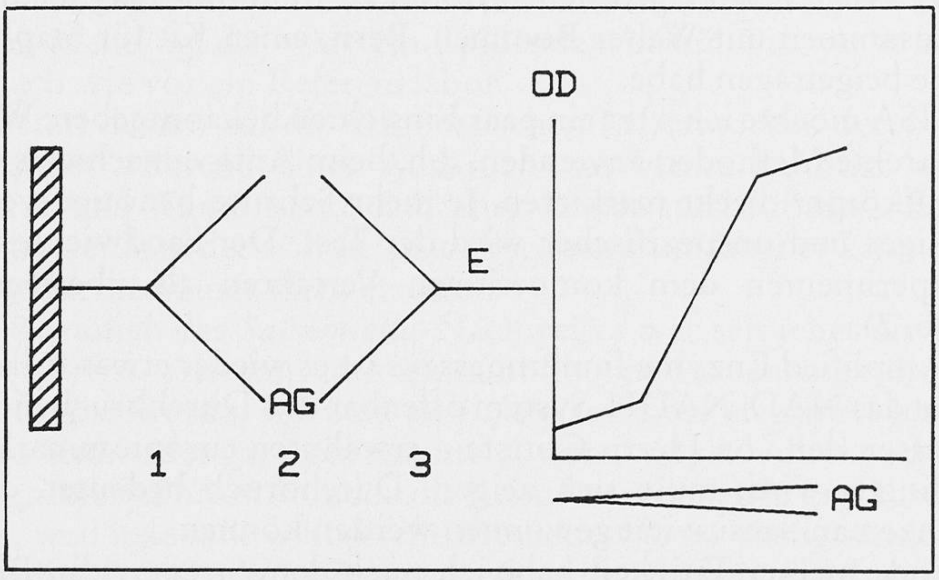

Abb. 2. Sandwichmethode
Antikörper dient als «coat» (1). Nach Inkubation mit der Antigen enthaltenden Probe (2) erfolgt der Nachweis des gebundenen Antigens mit dem gleichen Antikörper, der aber mit Enzym markiert ist (3).
Viel Antigen ergibt einen hohen OD-Wert und umgekehrt

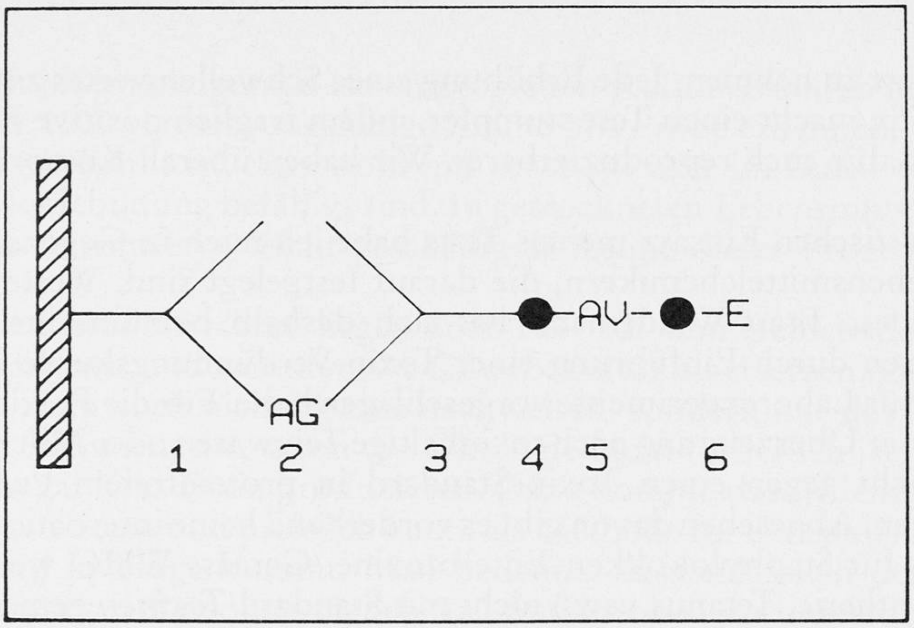

Abb. 3. Biotin-Avidin-Methode
Anstelle des enzymmarkierten Antikörpers wird biotinylierter Antikörper (3) eingesetzt, der dann mit Avidin reagiert, an welchem biotinyliertes Enzym gebunden ist. Man kann auch einen Komplex Avidin/biotinyliertes Enzym (5/6) einsetzen und somit einen Reaktionsschritt sparen.
1 = Antikörper als «coat», 2 = Antigen enthaltende Probe, 3 = biotinylierter Antikörper, 4 = Biotin, 5 = Avidin, 6 = biotinyliertes Enzym.
Die OD-Kurve verläuft wie beim Sandwichtest

ches Mischen, das biotinylierte Enzym mit dem Streptavidin zu komplexieren und auch diesen Komplex mit dem biotinylierten Antikörper zu einem einzigen Reagenzkomplex zu vereinen. Dadurch gewinnt man markierte Antikörper für ein Einschritt-Verfahren.

Bei allen Verfahren muss deren Sensitivität und Spezifität bekannt sein. Die *Sensitivität* gibt an, wieviele Prozent aller sicher positiven Proben als positiv erkannt werden. Die *Spezifität* aber, wieviele Prozent aller sicher negativen Proben negativ sind. Beide Werte sollten im Idealfall 100% erreichen.

Was aber ist negativ? Die Beschaffung einer negativen Kontrolle in ausreichender Menge kann ein Problem sein. Bei meinem Test für Staphylokokken-Enterotoxine, welcher von Frau Windemann in verdienstvoller Weise in praxi erprobt wurde, ergab sich die Schwierigkeit, dass die verschiedenen Lebensmittel in ganz unterschiedlicher Weise unspezifische Bindungen eingehen. Man müsste also korrekterweise eine negative Teigwarenkontrolle, eine Ziegenkäsekontrolle, eine Mayonnaisekontrolle usw. zur Hand haben, was unrealistisch ist. Mein System, anstelle des Kaninchen-*Antikörper*-Coats *normales* Kaninchen-IgG als Negativ-Coat zu verwenden, hat dieses Problem aus der Welt geschafft.

Bei allen diagnostischen Tests stellt sich die Frage des Grenzwertes zwischen negativ und positiv. In der Absicht, die Anforderung an die Spezifität hochzuhalten, haben wir uns dafür entschieden, die Standarddeviation von 4 Werten der Negativkontrolle zu rechnen und den Wert $\bar{x} \pm 3$ s (Vertrauensgrenze von 99%) als

Schwellenwert zu nehmen. Jede Erhöhung eines Schwellenwertes zwischen Negativ und Positiv macht einen Test stumpfer, indem fraglich positive Resultate wegfallen, aber dafür auch reproduzierbarer. Wir haben überall Kompromisse einzugehen.

Beim praktischen Einsatz meines Tests habe ich mich in Gegensatz gesetzt zu manchen Lebensmittelchemikern, die darauf festgelegt sind, Werte in ppm oder ppb anzugeben. Frau Windemann hat sich deshalb bemüht, mein System zu standardisieren durch Einführung einer Toxin-Verdünnungskurve in Puffer, wie ich es selbst für Laborexperimente vorgeschlagen habe. Für die Praxis lehne ich das ab, weil meiner Überzeugung nach toxinhaltige Teigwaren oder Milch und Fleischprodukte nicht gegen einen Toxin-Standard in proteinfreiem Puffer gemessen werden dürfen. Abgesehen davon gibt es vorderhand keine international anerkannte Standards für Staphylokokken-Enterotoxine. Gemäss WHO werden übrigens Toxine (Diphtherie, Tetanus usw.) nicht mit Standard-*Toxinen* gemessen, sondern mit deren viel stabileren Standard-*Antitoxinen.* Jedenfalls hat das Warten auf solche Standards die Offizialisierung meines Enterotoxin-Tests um Jahre verzögert. In der medizinischen Diagnostik ist man in solchen Fällen pragmatischer: Man stellt fest, dass mit einer gegebenen Methode Toxin nachgewiesen werden kann, wofür es keine Toleranzschwelle gibt. Ganz allgemein macht es keinen Sinn, auf die Anwendung einer stumpferen Methode deshalb zu verzichten, weil ein sensibleres standardisiertes Verfahren noch aussteht.

Mittlerweile gibt es auf den verschiedensten Gebieten eine Menge von diagnostischen, serologischen Tests, die, weil sie auf dem colorimetrischen Prinzip beruhen, auch automatisierbar sind. Man sollte aber die Automatisierung nicht übertreiben und in jedem Labor eine Reihe von Handarbeiten beibehalten, und zwar aus intellektuellen Gründen. Ein wirklich guter Test sollte auch in der Hand von weniger qualifiziertem Personal reproduzierbare Resultate liefern. Nur bei der Handarbeit wird das Verständnis für die Reaktionsabläufe wachgehalten, was dringend not tut in einer Zeit, in der wir immer mehr in eine Push-Button-Technik hineingeraten. Der Glaube, dass aus einem computergesteuerten Automaten auch automatisch richtige Resultate entweichen, ist weit verbreitet. Zum Beispiel zeigen alle ELISA-Readers OD-Werte in der dritten Stelle nach dem Komma an. Jeder Serologe ist aber froh, wenn er wenigstens die erste Stelle einigermassen unter Kontrolle hat.

Was sich seinerzeit in der Euphorie der Immunofluoreszenz zugetragen hat, wiederholt sich jetzt mit den monoklonalen Antikörpern und der PCR, über die uns soeben in höchst kompetenter Weise von den Herren Gottstein und Candrian berichtet wurde. Beides sind geniale Erfindungen, die eine neue Dimension aufgetan haben. Die Einschränkungen, die es indessen zu beachten gilt, wurden erwähnt und brauchen nicht wiederholt zu werden. Ich möchte nur das eine hervorheben, nämlich, dass bei allen Amplifikationsmethoden, also auch der PCR, nicht nur die spezifischen, sondern auch die unspezifischen Reaktionen verstärkt werden, wodurch sich u.U. nur der Schwellenwert erhöht.

Meine Skepsis gründet vor allem darauf, dass manche Bakterientests existieren, besonders für *Salmonella,* welche erst 10^5–10^8 Keime/ml nachweisen können. Dies

ist grotesk. Mit jedem einigermassen eingespielten Kulturverfahren kann man 10, 100, sicher aber 1000 vermehrungsfähige Keime pro Probe erkennen, wobei allerdings zu wenig bekannt ist, dass wohl nur etwa 1% aller im Darm vorhandenen Keime zur Koloniebildung befähigt sind. In getrockneten Lebensmitteln ist wegen der bekannten «dormancy» leicht geschädigter Keime dieser Prozentsatz sicher noch niedriger.

Die Vorteile dieser Verfahren liegen doch eher auf dem Gebiete der Virologie, wo es gilt, die arbeits- und zeitintensive Gewebekultur zu ersetzen oder zu ergänzen. Die PCR kann auch nicht Toxine nachweisen, sondern nur das Toxingen in den fraglichen Stämmen, die, wenn die Ökologie nicht förderlich ist, im Lebensmittel vielleicht gar kein Toxin produzieren. Dazu kommt, dass jedenfalls die PCR in der derzeitigen Form und preislich kaum als Methode für ein epidemiologisches Massenscreening in Frage kommt. Man bedenke, dass anlässlich der Zermatter Typhusepidemie zwei Personen täglich 300 Stuhlproben zu untersuchen hatten. Auf dem Gebiet der *Salmonella*-Erkennung ist mein Verfahren, welches das Phagengemisch O1 und OE zusammen mit einer Kleinstreihe von zwei biochemischen Reaktionen verwendet, nach wie vor führend in bezug auf die Kombination von Präzision, Preis und Schnelligkeit.

Zusammenfassung

Zeitweilig wurde die vollständige Typisierung von Salmonellen in Frage gestellt. Eine weitergehende Typisierung ist aber aus epidemiologischen Gründen unverzichtbar. Leider existiert bis heute in der Schweiz kein institutionalisierter feldepidemiologischer Dienst.

Vermehrt werden heute serologische Techniken (Immunofluoreszenz, RIA, ELISA) in der Lebensmittelhygiene eingesetzt. Deren Nachteile und Vorteile werden diskutiert. Der Autor hat mit der Sandwichmethode und dem Streptavidin-Biotin-System gute Erfahrungen gesammelt. Fragen der Standardisierung und der Verwendung von monoklonalen Antikörpern kommen zur Sprache.

Résumé

A un certain moment la typisation complète des salmonelles était remise en question. Mais pour des raisons d'ordre épidémiologique il ne peut pas être renoncé à la typisation. En Suisse il n'existe malheureusement jusqu'à ce jour aucun service institutionnalisé s'occupant d'épidémiologie de terrain.

De plus en plus les techniques sérologiques (immunofluorescence, RIA, ELISA) trouvent des applications en hygiène des denrées alimentaires. Nous en présentons les avantages et les désavantages. L'auteur a fait de bonnes expériences avec la méthode sandwich et le système streptavidine-biotine. Des questions de standardisation et l'utilisation d'anticorps monoclonaux sont abordées.

Summary

There was a tendency of abandoning the complete typing of salmonellae, which is not recommendable due to epidemiological reasons. Unfortunately an epidemiological field service is still lacking in Switzerland.

Serological techniques (immunofluorescence, RIA and ELISA) are widely applied in diagnostic food hygiene. Some of their advantages and disadvantages are discussed. The author's good experiences with the sandwich method and the avidin-biotin system are mentioned. Problems of standardisation of ELISA and the use of monoclonal antibodies are outlined.

Prof. Dr. H. Fey
Nelkenweg 32
CH-3097 Liebefeld-Bern