

Moderne Diagnosemethoden und Nachweisverfahren

Petr Karlovsky

Department für Nutzpflanzenwissenschaften, Abt. Molekulare Phytopathologie und Mykotoxinforschung,
Georg-August-Universität, Grisebachstrasse 6, 37077 Göttingen (pkarlov@gwdg.de)

Analytik und Biotechnologie: Überschneidungen, gegenseitige Abhängigkeit und das Öffentlichkeitbild

Moderne analytische Verfahren in Landwirtschaft und Lebensmitteltechnologie berühren biotechnologische Anwendungen in zwei Bereichen. Zum Ersten ist es die Aufgabe von DNA- und proteinanalytischen Verfahren molekularer Diagnostik, Targets wie Gene, Genprodukte, Keime oder ganze Organismen nachzuweisen und/oder zu quantifizieren, deren Anwesenheit durch biotechnologische Verfahren bestimmt oder beeinflusst werden. Eine typische Aufgabe ist zum Beispiel die Bestimmung des Anteils gentechnisch veränderten Pflanzenmaterials im Erntegut. Zum Zweiten bedienen sich Analytik und Diagnostik oft biotechnologischer Verfahren und verwenden biotechnologisch hergestellte Enzyme (DNA-Polymerasen für PCR) und Antikörper (ELISA). Im Gegenzug dazu ist Analytik für die Optimierung und Überwachung biotechnologischer Verfahren unentbehrlich. In vielen Bereichen können Analytik und Biotechnologie formell nicht mehr voneinander separiert werden. Begriffe wie "biotechnologische Diagnoseverfahren" und "analytische Biotechnologie" (Hensley und Myszka, 2000) spiegeln diese Sachlage wieder.

Analytische Verfahren und Biotechnologie verbindet auch die Eigenschaft, dass sie Ergebnisse der Grundlagenforschung mit minimaler Verzögerung aufgreifen und umsetzen, sich gegenwärtig sehr rasant entwickeln und von der Gesellschaft, den Medien und der Politik stärker als andere Technologien wahrgenommen werden. Im Rampenlicht der Medien kommen den beiden Bereichen jedoch unterschiedliche Rollen zu. Biotechnologie selbst wird meist kritisch betrachtet, und wenn sie nicht gleich be- bzw. abgeurteilt wird, regt sie Fachleute – und im weitaus größerem Ausmaß insbesondere Nicht-Fachleute – zu Diskussionen über ihr Risiko/Nutzen-Verhältnis an. Gesellschaftliche Gruppen jeder Couleur von Hobbyvereinen bis zu Kirchen sehen sich in der Lage, zu Fachfragen über die Folgen der Freisetzung von gentechnisch veränderten Organismen für die Umwelt oder gesundheitlichen Aspekten der Nutzung gentechnisch veränderter Sorten dezidiert Stellung zu nehmen. Analytische und diagnostische Verfahren werden dagegen als wertfrei betrachtet. Ihre Ergebnisse werden zur

Unterstützung von Aussagen über die Folgen des Einsatzes oder - viel seltener - Nicht-Einsatzes bestimmter Technologien verwendet. Die analytischen Daten selbst sind zwar in der Regel zuverlässig, ihre Interpretation stellt aber hohe Ansprüche an die Berücksichtigung von Sachverhalten aus der Toxikologie, Stabilität, dem Umweltverhalten und weiteren Eigenschaften der betrachteten Stoffe, Genprodukte und Organismen, die auf der Ebene der medialen Übermittlung meist außer Acht bleiben. Analytische Daten täuschen damit eine nicht vorhandene Objektivität und Aussagekraft vor. Zum Beispiel wird bei Überlegungen zur Freisetzung gentechnisch veränderter Organismen die Wahrscheinlichkeit einer unbeabsichtigten Ausbreitung des fremden bzw. veränderten Gens durch Pollenflug oder einen horizontalen Gentransfer grundsätzlich als Risiko betrachtet, und zwar nicht nur in den zahlreichen belanglosen Kommentaren in den Massenmedien, sondern gelegentlich auch in populärwissenschaftlicher Literatur. Wenn etwa analytische Daten über den Anteil des Pollens einer gentechnisch veränderten Sorte in einem bestimmten Abstand vom Feld zur Schätzung der Wahrscheinlichkeit einer Übertragung der veränderten Genomsequenzen in andere Bestände verwendet wird, werden die Ergebnisse oft als eine "Bewertung von Risiken" kommentiert. Es wird nicht erörtert, ob eine unbeabsichtigte Ausbreitung eines Herbizidresistenzgens eine Gefahr für die Umwelt oder lediglich ein Umsatzrisiko für die chemische Industrie darstellt und welche Folgen sie für den Pflanzenschutz haben kann. Der pauschalisierende, voreingenommene Sprachgebrauch beim Umgang mit Biotechnologie ist in unserer medialpolitischen Landschaft so verbreitet, dass er kaum noch auffällt. Bei dem genannten Beispiel handelt es sich zwar um einen besonders drastischen Fall, mangelnder Sachverstand bei der Interpretation von Bestimmungsergebnissen und chemisch-analytischen Daten ist jedoch für Massenmedien typisch.

Massenspektrometrische Kopplung als entscheidende Innovation in der chemischen Analytik

Drei technische Innovationen prägten die chemische Analytik und Diagnostik in den letzten zehn Jahren. Die erste Neuerung war die Weiterentwicklung der massenspektrometrischen Kopplung bis zu einem Stadium, welches ihre Einführung als Standardmethode der Routineanalytik ermöglichte. Die nächste Innovation in der Analytik, die bereits in den ersten kommerziellen Produkten von Agilent Technologies (HPLC-Chip) und Nanostream (Brio cartridge) angezeigt wird, besteht primär in einer gravierenden Miniaturisierung analytischer Trennsysteme. Weil diese Entwicklung die Routinepraxis noch nicht in spürbarem Ausmaß erreicht hat, wird sie hier nur kurz erläutert. Die dritte Innovation, die man aufgrund ihrer Auswirkung bereits als Revolution bezeichnen kann, war die Einführung von auf Polymerase Kettenreaktion (PCR)-basierten Verfahren, mit deren Hilfe sequenzspezifisch Nukleinsäureabschnitte nachgewiesen bzw. quantifiziert werden können. Diese Verfahren werden im nächsten Abschnitt am Beispiel von mykotoxinbildenden Pilzen erklärt.

Für die chemischen Routineuntersuchungen in der Praxis bedeutete die Etablierung und benutzerfreundliche Gestaltung massenspektrometrischer (MS) Detektoren für Gas- (GC) und Hochleistungschromatographie (HPLC) einen entscheidenden Fortschritt. Diese als "hyphenated technologies" bezeichnete Kopplung von MS-Detektoren mit Chromatographieranlagen ist seit den 60er Jahren bekannt und seit zwei Jahrzehnten wurde sie intensiv entwickelt (Vestal, 1984), erst in den letzten fünf Jahren sind die Anlagen jedoch so robust und benutzerfreundlich geworden, dass sie nicht nur von spezialisierten Massenspektrometrikern, sondern auch von eingearbeiteten Fachkräften im Routinebetrieb in der Industrie und den Untersuchungsämtern bedient werden können. Zunächst GC-MS- und später auch HPLC-MS-Anlagen (Careri, Mangia, und Musci, 1996) sind zur Grundausstattung analytisch orientierter Laboratorien geworden. Die meisten Analyten lassen sich in ionisierte Formen überführen, die für die Identifizierung und Quantifizierung mittels Massenspektrometrie benötigt werden. Durch die Einführung massenspektrometrischer Detektion in die Routineanalytik wurde insbesondere die Fähigkeit der Analytik verbessert, Bestimmungsmethoden für neue Targets im Erntegut und in Lebensmitteln schnell zu etablieren. Die hohe Selektivität der Massenspektrometrie und die Ionisierbarkeit der meisten Analyten erlaubt es außerdem, viele Analyten in einem Chromatographielauf zu quantifizieren.

GC-MS-Anlagen haben die Praxisreife früher als HPLC-MS erreicht, weil Gas als Mobilphase direkt in die Ionenquelle eingeführt werden kann, während bei der HPLC die flüssige Mobilphase in eine Gasphase überführt werden muss. Inzwischen hat die HPLC-MS gegenüber GC-MS-Anlagen in der Verbreitung aufgeholt und wird sie vermutlich weiter verdrängen. Im Gegensatz zu GC-MS benötigt HPLC-MS keine Derivatisierung von nichtflüchtigen Analyten, sie ist für thermolabile Analyten geeignet und deckt auch den wichtigen Bereich informationshaltiger Makromoleküle (Proteine und DNA-Fragmente) ab, für die GC-MS prinzipiell ungeeignet sind. Der Vorteil einer deutlich höheren Separationskraft der Gaschromatographie im Vergleich zur HPLC spielt bei der Kopplung mit MS-Detektion eine untergeordnete Rolle, weil die hohe Selektivität der Detektion eine niedrige Chromatographieauflösung kompensiert. Im Gegenteil, es werden bei HPLC-MS immer kürzere Säulen verwendet, um die Analysedauer zu verkürzen und den Probendurchsatz zu erhöhen. Aus dem gleichen Grund bringt eine weitere Steigerung der HPLC-Auflösung, die zum Beispiel durch die UPLC-Technologie (Ultra Performance Liquid Chromatography) von Waters erreicht wird, nach Ansicht des Autors in Verbindung mit MS-Detektion keinen Vorteil, der den erhöhten technischen Aufwand rechtfertigt. (UPLC arbeitet mit Drücken von bis 1000 bar und speziellen Säulen mit Matrixpartikeln mit einem Durchmesser von weniger als 2 μm).

Die Vorteile der Massenspektrometrie im Vergleich zu anderen Detektionssystemen sind ihre Eignung für eine Vielzahl von verschiedenen Analyten und eine hohe Selektivität, die durch den Einsatz von Tandem-MS-Verfahren und/oder durch die Verwendung von Analysatoren mit hoher Massenauflösung weiter gesteigert werden kann. Flugzeitmassenspektrometrischen Detektoren (TOF), die bereits als Kopplung mit GC

oder HPLC kommerziell erhältlich und in der einfachsten Variante im Preis mit klassischen Triple-Quadrupol- und Ionenfalldetektoren vergleichbar sind, bieten eine um zwei Größenordnungen verbesserte Massenauflösung, allerdings mit dem Nachteil eines engeren dynamischen Bereiches, die sie für Routineanalytik als weniger geeignet erscheinen lassen. Kürzlich konnte auch die Massenauflösung von Ionenfallen in einem geringeren Umfang mit Hilfe neuer Verfahren verbessert werden (High Resolution Isolation-Technologie von Thermo Electron); sie wird insbesondere für eine verbesserte Isolierung von Präkursor-Ionen für Tandem-MS genutzt. Weitere Ionenfallen mit noch deutlicherer Verbesserung der Massenauflösung stehen kurz vor der Markteinführung.

Die Empfindlichkeit massenspektrometrischer Detektion ist entgegen weit verbreiteter Meinung nicht höher als bei photometrischer oder fluorometrischer Detektion. Es ist jedoch schwierig, allgemeine Aussagen zur Empfindlichkeit verschiedener Detektionsverfahren zu machen, weil die Ionisierbarkeit verschiedener Analyten sehr unterschiedlich ist und von der Beschaffenheit der Anlage, dem verwendeten Ionisierungsverfahren und vielen weiteren Faktoren abhängt. Für die meisten Analyten und eine für Analyselabore typische Triple-Quadrupol- oder Ionenfalle-Anlage der mittleren Preisklasse gelten ungefähr die folgenden Schätzungen: In der GC-MS-Kopplung kann bei klassischer Elektroneneinfang-Detektion und/oder der Thermionen-Massenspektrometrie mit um bis 100-fach niedrigeren Nachweisgrenzen gerechnet werden als bei der MS-Detektion, die Empfindlichkeit von Flammenionisations-Detektoren ist mit der MS-Detektion etwa vergleichbar. Bei der HPLC-MS-Kopplung kann die MS-Detektion hinsichtlich Empfindlichkeit insbesondere mit der Fluoreszenzdetektion nicht mithalten, aber auch einem UV-Absorptionsdetektor ist sie oft unterlegen, zum Beispiel bei Polyaromaten mit einem hohen Extinktionskoeffizienten, insbesondere, wenn sie keine polaren Funktionsgruppen enthalten und daher schwer ionisierbar sind. Der Nachteil einer niedrigeren Empfindlichkeit für bestimmte Analyten wird durch die oben beschriebenen Vorteile der Massenspektrometrie jedoch mehr als ausgeglichen. Außerdem ist zu bemerken, dass mit der fortlaufenden Entwicklung von Massenspektrometern auch die Empfindlichkeit der Detektion ständig gesteigert wird. Neben verbesserten Ionenquellen trägt insbesondere die Erhöhung des Eintrags in den Analysator zur Verbesserung der Nachweisgrenze bei, die durch eine Vergrößerung des inneren Durchmessers der Einlasskapillare in Verbindung mit einer entsprechend gesteigerten Leistung der turbomolekularen Vakuumpumpen erreicht werden kann.

Um die Relativität des Empfindlichkeitskriteriums zu veranschaulichen, ist es hilfreich, die Leistung von kostengünstigen MS-Anlagen mit den High-End-Anlagen der gleichen Art zu vergleichen. Wie immer ist es auch hier schwierig, absolute Zahlen anzugeben, weil die Nachweisgrenze von den Einstellungen der Ionenquelle, des Analysators, des Detektors und schließlich auch von der Zusammensetzung der Matrix abhängt. Als Schätzwert kann die Steigerung der Empfindlichkeit entlang einer Geräteserie (z.B. API 2000 bis API 5000 von Applied Biosystems oder Quattro Micro bis Quattro Ultima Pt von Waters/Micromass) mit einem Faktor von 50 bis 200 angegeben werden. Weiteres

Potenzial zur Steigerung der Empfindlichkeit besteht in der Entwicklung von neuen Ionisierungsverfahren wie Photoionisierung (z.B. Atmospheric Pressure Photoionization, Applied Biosystems) für diejenigen Analyten, die mit den etablierten Verfahren Elektrospray-Ionisation (ESI) und chemischer Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) nicht effizient ionisiert werden können.

Die Zukunft der Analytik: Labor am Chip

Die nächste Innovation in der chemischen Analytik bei Pflanzenprodukten und Lebensmitteln wird vermutlich die Einführung von miniaturisierten Trenn- und Detektionssystemen, die vereinfacht mit dem Begriff "Labor am Chip" bezeichnet werden. Die Trennung wird in einer regenerierbaren oder nichtregenerierbaren Plattform durchgeführt, deren Dimensionen im Vergleich mit den gängigen Trennsystemen deutlich verringert wurden. Als Folge der Miniaturisierung werden erhebliche Zeit- und Kostenersparnisse in der Routineanalytik erwartet und weiterhin eine Steigerung der Empfindlichkeit, die bei klassischen Anlagen aufgrund von Verlusten und der Verbreiterung der Peaks entlang der Trennstrecke auftreten. Als weitere Vorteile erhofft man sich, dass mit Einweg-Trennmedien ein bisher nicht mögliches Niveau der Standardisierbarkeit erreicht wird und dass die modulare Bauweise eine Parallelisierung der Analysen und damit eine weitere Erhöhung des Probendurchsatzes ermöglicht. Neben den spezifischen Problemen der Miniaturisierung (Fertigungsprobleme, Kapillaritätskräfte) stellt auch die Empfindlichkeit der Detektion bei massenabhängigen Detektoren eine Herausforderung dar. Die Menge des Analyten, der den Detektor erreicht, sinkt proportional mit dem Quadrat des Durchmessers des Trennmediums. Die Empfindlichkeit von konzentrationsabhängigen Detektoren wird durch die Miniaturisierung aber viel mehr gesteigert. In diesem Zusammenhang sollen Entwicklungen von neuen Detektionsverfahren erwähnt werden, mit deren Hilfe wenige Moleküle des Analyten nachgewiesen werden können ("**single molecule detection**"). Falls sie tatsächlich die Praxisreife erreichen, was zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht ersichtlich ist, können sie einen weiteren Durchbruch in der chemischen Analytik auslösen.

Im molekulargenetischen Bereich hat die Miniaturisierung die Praxisreife bereits erreicht. Die oft als DNA-Chip bezeichnete Technologie (**Microarrays**) ist zum Standardverfahren bei der Untersuchung des Transkriptom geworden. Prinzipiell kann die gleiche Technologie auch in der Diagnostik für den Nachweis einer Vielzahl von verschiedenen Viren und anderen Pathogenen in einem Analysevorgang eingesetzt werden (Lee et al., 2003). Die Empfindlichkeit der Detektion von Nukleinsäuren durch Hybridisierung mit auf DNA-Microarrays immobilisierten Oligonukleotiden ist für die Ansprüche der Diagnostik jedoch zu niedrig. Die Targets müssen zunächst mit Hilfe von PCR amplifiziert werden. Weil für die Bestimmung von PCR-Produkten kostengünstigere Alternativen als DNA-Arrays existieren und mit Real-time PCR sogar eine Möglichkeit besteht, die Quantifizierung bereits während der PCR vorzunehmen, werden DNA-

Microarrays für diagnostische Zwecke selten eingesetzt. Nur wenn in einer Probe viele verschiedene Krankheitserreger nachgewiesen werden sollen, zeigt DNA-Hybridisierung einen entscheidenden Vorteil gegenüber der PCR: Auf einer Membran oder einem Slide kann eine aus der Sicht der Diagnostik uneingeschränkte Anzahl von Hybridisierungstargets immobilisiert werden, während die Grenzen für Multiplexing bei Real-time PCR bei fünf Targets liegen, wegen der anspruchsvollen Optimierung und hohen Kosten der doppelt markierten Sonden jedoch selten mehr als zwei Targets gleichzeitig in einer PCR-Reaktion untersucht werden. Die Kombination von PCR mit einer Microarray-Hybridisierung ist daher in solchen Fällen günstig, wenn viele Targets amplifiziert werden, die dann mit Hilfe von DNA-Arrays parallel nachgewiesen werden können (Hadidi, Czosnek und Barba, 2004). Nur wenige Firmen bieten Array-basierte phytomedizinische Diagnostik an. Die Firma Relab Den Haan (Wateringen, Niederlande) kann mit Ihren DNA-Arrays gegenwärtig 38 pilzliche Pflanzenpathogene nachweisen. Das Spektrum der von der Firma DNA-scan GmbH (Gillersheim) getesteten Organismen umfasste über 50 Krankheitserreger, DNA-scan musste jedoch vor einem halben Jahr wegen Mangel an Aufträgen schließen.

Aufgabenbereiche moderner Analytik und Diagnostik in der Pflanzenproduktion und bei der Lebensmittelherstellung

Analytische und diagnostische Methoden in der Landwirtschaft und Lebensmittelproduktion haben zum Ziel, als Analyten oder Zielorganismus bezeichnete Gegenstände zu identifizieren und zu quantifizieren. Die Komplexität der Analyten reicht von einzelnen chemischen Substanzen bis zu Gemischen von niedermolekularen und hochmolekularen Verbindungen. Bei den Zielorganismen der Diagnostik handelt es sich um Viren, Viroide, Bakterien einschließlich Mycoplasmen, Pilze und pilzähnliche Protisten. Quantitative analytische und diagnostische Bestimmungsverfahren spielen eine wichtige Rolle in der gesamten Produktionskette vom Anbau einer Kulturpflanze im Feld bis zur Qualitätskontrolle des endgültigen Lebensmittels im Handel.

Die für die Pflanzenproduktion und Lebensmittelherstellung relevanten Analyten können in drei Substanzgruppen gegliedert werden. Zum Ersten sind es chemische Verbindungen, die von Pflanzen und Mikroorganismen gebildet werden, im Endprodukt gewünscht sind und für die Qualität der Rohware und der Lebensmittel ausschlaggebend sind. Typische **qualitätsbestimmende Inhaltsstoffe** sind Proteine, Fette, Stärke, Zucker, essentielle Aminosäuren, ungesättigte Fettsäuren, Antioxidantien, Vitamine und Mineralstoffe. Qualitätsmindernde und potenziell gesundheitsschädigende Naturstoffe werden bisher in der Routineanalyse von Lebensmitteln mit Ausnahme von Mykotoxinen kaum betrachtet. Bei Mykotoxinen hat der Fortschritt der Toxikologie in den meisten Ländern inzwischen Initiativen für die Einführung von Grenzwerten ausgelöst, für die gefährlichsten Mykotoxine wurden gesetzliche Höchstmengen eingeführt und für weitere Mykotoxine zumindest Empfehlungen ausgesprochen. Wir können davon ausgehen, dass in den kommenden Jahren Mykotoxine verstärkt in die amtliche Lebensmittelüberwachung

einbezogen werden. Die Toxizität von pflanzeigenen Sekundärmetaboliten in den Lebensmitteln wird dagegen bisher weitgehend ignoriert, was sicherlich auch mit dem Umstand zu erklären ist, dass die bei uns angebaute Kulturpflanzen verhältnismäßig wenig gesundheitsgefährdende Inhaltsstoffe enthalten. Lediglich bei der Entwicklung von neuen Sorten werden die Gehalte an toxischen Metaboliten geprüft. Bei Kulturpflanzen mit hohem Toxizitätspotenzial (Kartoffel) werden solche Untersuchungen bei allen Züchtungsunternehmen regelmäßig durchgeführt. Die wirklich gefährlichen Stoffe pflanzlichen Ursprungs erreichen den Verbraucher in Deutschland allerdings nicht mit Feldfrüchten, sondern mit Kräutertees, herbaler Medizin und Pflanzenextrakten für Schlankheitsdiäten. In den letzten Jahren wurden zahlreiche Produkte dieser Art vom Markt genommen. Analytische Verfahren, insbesondere HPLC, haben bei der Identifizierung der Quellen der toxischen Bestandteile dieser Produkte eine wesentliche Rolle gespielt.

Eine zweite, hinsichtlich des ihr gewidmeten analytischen Aufwandes sehr bedeutende Gruppe von Substanzen, sind die vom Menschen in verschiedenen Stadien der Produktion zugesetzten **synthetischen Stoffe**, die in ihrer ursprünglichen oder geänderten Form im Endprodukt nachweisbar sind. Hierzu gehören insbesondere Rückstände von Pflanzenschutzmitteln und Konservierungsstoffe. Die zugelassenen Höchstmengen dieser Substanzen in den verschiedenen Rohware- und Produktgruppen werden in einem Regelwerk von Vorschriften und Verordnungen festgelegt. Ihre Bestimmung erfolgt bereits in der Verarbeitungskette durch die Lebensmittelindustrie selbst, andererseits werden in den amtlichen Monitoringprogrammen nach einem verbindlichen Schema Stichproben aus dem Handel gezogen und analysiert.

Obwohl es sich um eine aus toxikologischer Sicht im Vergleich mit Naturstoffen untergeordnete Substanzgruppe handelt, stehen Pflanzenschutzmittel, Zusatzstoffe und ihre Rückstände nach wie vor im Zentrum der Aufmerksamkeit des Gesetzgebers, der Verbraucher und Medien gleichermaßen. Der Grund ist eine weit verbreitete Besorgnis über die von den synthetischen Stoffen in unserer Umwelt und Nahrungskette ausgehenden Gefahren. Auch die strengen Zulassungsverfahren und die in ihnen integrierten toxikologischen Prüfungen konnten diese Befürchtungen bisher nicht entkräften. Diese Einschätzung der Zusatzstoffe steht im Kontrast zu Naturstoffen, die oft pauschal für gesund oder zumindest harmlos gehalten werden, obwohl zu ihren Vertretern zahlreiche Gifte und potente krebserregende Stoffe gehören, die außerdem keinem Zulassungsverfahren unterliegen (Gold, Ames, und Slone, 2002). Neben unerwünschten synthetischen Stoffen in den Lebensmitteln werden bei der Lebensmittelherstellung auch qualitätssteigernde Zusätze wie Vitamine, Geschmacksstoffe, Aromen und Antioxidantien verwendet, deren Gehalt als Qualitätsparameter gilt und bei Qualitätskontrollen analytisch bestimmt wird.

Der Inhalt an unerwünschten synthetischen Stoffen, die als Kontaminationen bezeichnet werden, spielt heute bei der Bewertung pflanzlicher Produkte oft eine größere Rolle als

der Inhalt an Proteinen, Vitaminen und anderen Nährstoffen. Diese Gewichtung von Qualitätskriterien wurde durch eine außerordentlich gute Versorgung der Bevölkerung in unserem Land mit preiswerten und hochwertigen Lebensmitteln ermöglicht, die eine Unterversorgung mit Nährstoffen praktisch ausschließt (außer bei abnormalem Konsumverhalten).

Der Überschuss an Rohwaren im Lebensmittelbereich hat außerdem dazu geführt, dass neue Produktionsweisen etabliert und als Qualitätsmerkmale vermarktet werden können, obwohl sie keinen wissenschaftlich belegbaren Vorteil für den Verbraucher mit sich bringen. Diese Produkte werden im Lebensmittelmarkt mit Hilfe von positiv besetzten Begriffen positioniert, die von den Wortstämmen Öko-, Bio- und Natur- abgeleitet sind. Der chemischen Analyse kommt dabei eine besondere Rolle zu, weil viele Hersteller der als "ökologisch" bezeichneten Lebensmitteln die Nichtverwendung von Pflanzenschutzmitteln bei der Produktion ihrer Rohwaren dem Verbraucher gegenüber als Qualitätsmerkmal präsentieren. Weil es sich um ein wesentliches (und aus chemisch-analytischer Sicht in den meisten Fällen einziges) Unterscheidungsmerkmal handelt, prüfen die Hersteller ihre Rohware oft selbst bzw. lassen sie auf Pflanzenschutzmittelrückstände untersuchen. In der Tat enthalten die "Öko"-Produkte wesentlich niedrigere Mengen von Pflanzenschutzmittelrückständen als andere Lebensmittel, die Tatsache, dass dieser Unterschied aus toxikologischer Sicht völlig irrelevant ist, wird dem Verbraucher allerdings selten vermittelt. Im Schlusswort der Senatsarbeitsgruppe "Qualitative Bewertung von Lebensmitteln aus alternativer und konventioneller Produktion" der Bundesforschungsanstalten des BMVEL heißt es zu diesem Thema (Tauscher et al., 2003): "Bis heute gibt es damit letztlich keinen wissenschaftlichen Nachweis dafür, dass der ausschließliche oder überwiegende Verzehr von ökologisch erzeugten Lebensmitteln direkt die Gesundheit des Menschen fördert."

Neben Inhaltsstoffen natürlichen Ursprungs und synthetischen Zusatzstoffen bzw. ihren Metaboliten, die im Produktionsprozess verwendet oder dem Endprodukt zugemischt werden, wird bei den chemischen Analysen von Lebensmitteln noch eine dritte Gruppe von Substanzen untersucht. Es handelt sich um chemische Stoffe, die in das Produkt als **lebensmittelfremde Kontaminationen** gelangen, ihm illegal zugesetzt werden oder als Folgen unerwünschter chemischer Reaktionen im Herstellungsprozess entstehen. In diese Gruppe gehören zum Beispiel Schwermetalle und nicht zugelassene Pflanzenschutzmittel, die gelegentlich mit importiertem Gemüse und Obst auf unseren Lebensmittelmarkt gelangen. Diese Analytengruppe ist klein und neue Zugänge sind selten, sie sorgen jedoch für Aufsehen, weil sie meist mit der Aufdeckung neuer Gesundheitsrisiken für den Verbraucher verbunden sind. Typische Beispiele aus den letzten Jahren waren dem Wein zur Verbesserung seines Geschmacks zugesetztes Polyethylenglykol, in Backwaren und Kartoffelprodukten entdecktes Acrylamid, unerlaubte Antibiotika in Fischfleisch und Nitrofurantol in Geflügelfleisch.

Die diagnostische Erfassung von Krankheitserregern in der Pflanzenproduktion dient primär als Entscheidungshilfe für die Ergreifung von Pflanzenschutzmaßnahmen

(McCartney et al., 2003). Sie ist insbesondere bei Kulturen mit hoher Wertschöpfung sinnvoll, weil die Kosten diagnostischer Verfahren nicht unerheblich zu den Gesamtkosten der Produktion beitragen. Darüber hinaus spielt phytomedizinische Diagnostik eine große Rolle bei der Herstellung von Saatgut und Mutterpflanzen, weil eine latente Infektion erhebliche Wertverluste und Haftungsansprüche begründen kann. Besonders gravierende Folgen hat die Feststellung eines Quarantäne-Erregers im Saatgut, denn neben der Vernichtung der ganzen Charge muss die Produktionsfläche für eine gesetzlich vorgeschriebene Periode stillgelegt werden. Untersuchung von Saatgut und Pflanzkartoffeln auf Quarantäne-Erreger gehört zu den wichtigsten Aufgaben der Pflanzenschutzämter.

PCR versus ELISA: Vergleich am Beispiel von mykotoxinbildenden Pilzen

Belastung pflanzlicher Rohstoffe mit Mykotoxinen ist ein aktuelles Problem der Pflanzenproduktion und Futtermittelherstellung, dessen Bedeutung aufgrund von veränderter Anbaupraxis in den letzten Jahren zugenommen hat. Fortschritte der toxikologischen Forschung, die immer neue gesundheitsbeeinträchtigende Wirkungen pilzlicher Sekundärmetaboliten aufdeckt, und die wachsende Verfügbarkeit instrumenteller Ausstattung für die **Bestimmung von Mykotoxinen** in komplexer Matrix stärken die Sensibilität für die Mykotoxinproblematik in allen Gliedern der Produktionskette. Gesetzliche Regelungen für Mykotoxingehalte in Erntegut, Lebensmitteln und Futtermitteln in Europa werden gegenwärtig harmonisiert. Die Einführung von Höchstgrenzen wird die Aufnahme von Mykotoxinen in die amtliche Überwachung erzwingen. Bisher gelten verbindliche Grenzwerte EU-weit nur für Aflatoxine, seit dem 1. Juli 2006 auch für Deoxynivalenol und Zearalenol. Sie sollen als Anreiz für Maßnahmen zur Prävention von Mykotoxinbildung dienen. Eine wichtige Voraussetzung für die Bewertung des Risikos von Mykotoxinbelastung ist die Verfügbarkeit schneller, empfindlicher und zuverlässiger **Diagnosesysteme** für die Bestimmung des Befalls mit mykotoxinbildenden Pilzen.

ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) hat sich kurz nach seiner Entwicklung Mitte der 70er Jahre in der phytomedizinischen Diagnostik als Standardmethode durchgesetzt. Das wirtschaftliche Potenzial immunochemischer Diagnostik wurde schnell erkannt, ein Artikel zu diesem Thema aus dem Jahr 1984 in Business Week wurde "Plant diagnostics: Seeds of a new industry" betitelt (Anon., 1984). Interessant ist, dass im einleitenden Satz bereits damals moderne phytomedizinische Diagnostik der Biotechnologie zugeordnet wurde: "Companies are beginning to use biotechnology to identify symptoms of disease in plants". Inhaltlich war die Ausführung allerdings nicht korrekt, denn der Vorteil molekularer und biotechnologischer Verfahren und der Hauptgrund für ihren Einsatz ist gerade ihre Fähigkeit, Krankheitserreger noch vor der Ausprägung der Krankheitssymptome zu identifizieren. Heute sind monoklonale und polyklonale Antikörper und vollständige ELISA-Kits für die wichtigsten phytopathogenen Pilze kommerziell verfügbar, ELISA-Photometer sind zum essentiellen

Instrument in allen diagnostisch ausgerichteten Einrichtungen geworden. ELISA ist schnell und preiswert und seine Empfindlichkeit ist für die meisten phytomedizinischen Fragestellungen ausreichend.

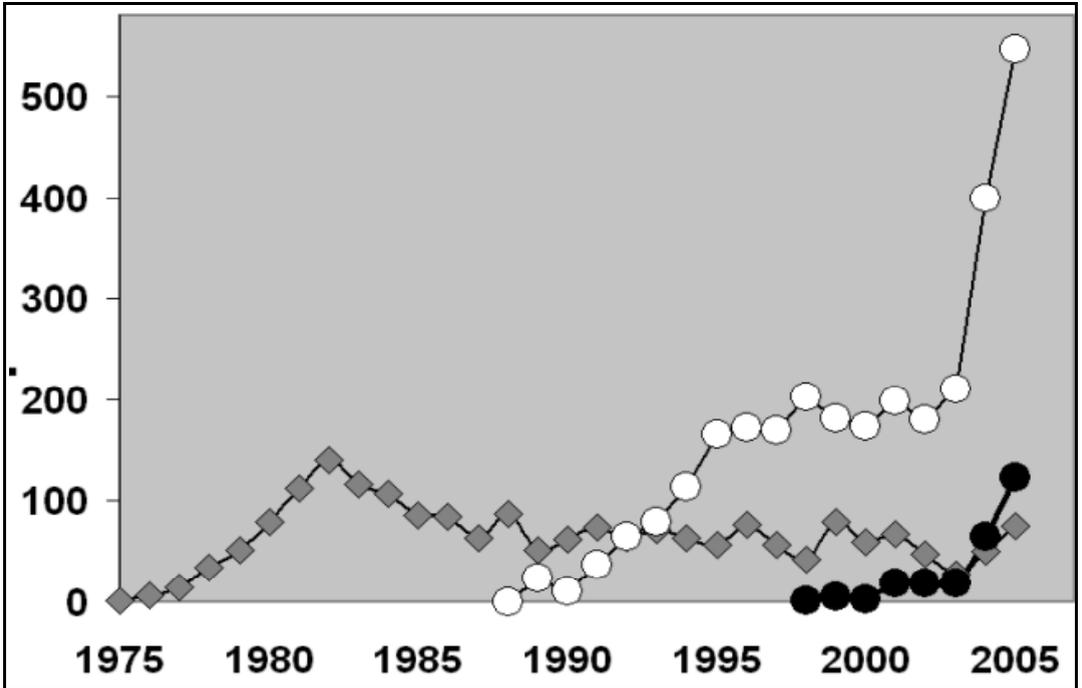


Abb. 1: Anzahl von Publikationen in der Literaturdatenbank AGRICOLA, deren Titel den Begriff ELISA (Raute), PCR (weißer Kreis) und Real-time PCR (schwarzer Kreis) enthält

Die wichtigste Einschränkung von ELISA betrifft seine Spezifität. Als Beispiel kann die Bestimmung mykotoxinbildender *Fusarium*-Arten in Getreide für die Schätzung des Risikos der Mykotoxinbildung genannt werden. ELISA-Tests können zwischen verwandten *Fusarium*-Arten nicht unterscheiden, sie liefern daher beim Besatz des Korns mit nicht-toxinbildenden *Fusarium*-Arten falsch-positive Ergebnisse. Die Spezifität eines ELISA-Tests für Pilze kann im beschränkten Umfang durch die Wahl des Antigens und evtl. eine Absättigung des Antikörpers mit "falschen" Antigenen verbessert werden, zuverlässige Unterscheidung zwischen phylogenetisch nahe stehenden Pilzarten ist aber oft nicht möglich. Nachdem Deoxynivalenol in messbaren Mengen gebildet wurde, kann statt der Bestimmung des mykotoxinbildenden Pilzes das Mykotoxin selbst bestimmt werden, kommerzielle ELISA-Kits für Deoxynivalenol werden von mehreren Firmen angeboten. Die Genauigkeit von ELISA ist jedoch oft für die Entscheidung ausreichend, ob eine Getreidepartie die gesetzliche Höchstgrenze überschreitet, nicht ausreichend. Insbesondere werden die ELISA-Werte für Deoxynivalenol oft überschätzt, vermutlich

weil die Deoxynivalenol-spezifischen Antikörper auch andere Trichothecen-Derivate binden.

Seit Anfang der 90er Jahre werden in der phytomedizinischen Diagnostik **PCR**-Systeme (Polymerase-Kettenreaktion) erprobt und erfolgreich eingesetzt. Die Spezifität von diagnostischen Tests auf der Basis von PCR kann durch die Wahl der Primer gezielt eingestellt werden. Für alle phytopathologisch und toxikologisch bedeutenden Fusarium-Arten sind inzwischen artspezifische Primer verfügbar. Die Spezifität der PCR-Analyse kann einerseits durch die Wahl stark divergierender Sequenzbereiche als Primerbindungsstellen weiter gesteigert werden, so dass Taxa unter der Art-Ebene unterschieden werden können - *formae speciales*, Populationen und prinzipiell sogar individuelle Genome. Andererseits - und dies ist für die phytomedizinische Diagnostik durchaus wichtiger - können Tests entwickelt werden, die mehrere Pilzarten gemeinsam erfassen, die das gleiche Mykotoxin (oder verwandte Mykotoxine) bilden. In diesem Sinn wurden z.B. für trichothecenbildende Fusarium-Arten PCR-Tests entwickelt, in denen ein Teil eines Gens der Trichothecensynthese (Tri5, Trichodiensynthase) amplifiziert wird. Diese Tests können zur Schätzung des Potenzials des Pilzbesatzes zur Bildung von Deoxynivalenol verwendet werden. In Kombination mit RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) kann außerdem die Aktivität der Gene der Trichothecensynthese direkt im infizierten Pflanzengewebe untersucht werden. Somit kann die Auswirkung von Fungizidbehandlung auf Deoxynivalenolbildung untersucht werden, die zu den stark diskutierten Fragen im Pflanzenschutz der letzten Jahre gehört.

Im Vergleich zum ELISA hat PCR den Vorteil einer höheren und steuerbaren Spezifität und i.d.R. auch einer höheren Empfindlichkeit. Ihre Nachteile sind neben höheren Kosten auch die (für die klassische PCR geltende) aufwändige Detektion und insbesondere die Tatsache, dass PCR mit Endpunkt-Detektion nur qualitative Ergebnisse liefert. Aufgrund des Sättigungscharakters der Reaktion und der exponentiellen Verstärkung von Störeinflüssen und statistischen Schwankungen ist es nicht möglich, eine zuverlässige Beziehung zwischen den Mengen des Templates und des Produktes herzustellen.

Die Einführung von PCR mit kontinuierlicher Produktdetektion (**Real-time PCR**) beseitigte die beiden Nachteile und eröffnete der PCR den Weg in die Routinediagnostik. Die Detektion erfolgt in jedem PCR-Zyklus mittels Messung der Fluoreszenz. Es wird entweder ein DNA-bindender Farbstoff (SYBR Green) eingesetzt, dessen Fluoreszenzausbeute durch die Bindung an DNA gesteigert wird, oder spezielle Hybridisierungssonden, deren Bindung an das PCR-Produkt zur Veränderung der Distanz zwischen einem Fluorophor und einem Farbstoff führt, der mit dem Fluorophor Energie austauschen kann. Diese Distanzänderung führt zu einer Veränderung der Intensität des Fluoreszenzsignals. Der Zyklus, bei dem ein Fluoreszenz-Schwellenwert überschritten wird, wird als Threshold Cycle (Ct) bezeichnet. Der Ct-Wert hängt von der Template-Menge ab. Für eine quantitative Auswertung der Real-time PCR-Ergebnisse wird eine Eichkurve von Ct-Werten vs. Templatemengen konstruiert. Neben ihrem quantitativen Charakter besitzt die Real-time PCR den Vorteil, dass jegliche Behandlung der Proben

nach der Beendigung der PCR entfällt. Damit ist eine Automatisierung der Analyse vom Ansetzen der Reaktionen mit Hilfe von Pipettierrobotern bis zum Erstellen der Ergebnisberichte möglich. Die Tatsache, dass PCR-Gefäße nach der Reaktion nicht geöffnet werden, reduziert darüber hinaus deutlich die Gefahr der Kontamination, die bei diagnostischen PCR-Anwendungen aufgrund der hohen Empfindlichkeit der Methode und der langen Überlebenszeit von DNA in der Laborumgebung ein nicht zu unterschätzendes Risiko darstellt. Mit einem typischen Zeitabstand nach der Einführung der Real-time PCR in die humanmedizinische Diagnostik wurde die Technologie auch für die Quantifizierung von pflanzenpathogenen Organismen eingesetzt (Schena, Nigro, Ippolito und Gallitelli, 2004). Sowohl die benötigten Investitionen als auch die Kosten der DNA-Extraktion und -Analyse selbst übersteigen jedoch im Moment die Möglichkeiten von Pflanzenschutzämtern und anderen auf die Routinediagnose von Pflanzenkrankheiten spezialisierten Einrichtungen. Eine spürbare Senkung der Kosten durch die Miniaturisierung der PCR-Ansätze ist prinzipiell möglich. Falls sie realisiert wird, kann diese fortschrittliche Technik auch in der phytomedizinischen Routinediagnose zur ernsthaften Konkurrenz für ELISA werden.

Real-time PCR-Anlagen werden inzwischen von mindestens 8 Herstellern angeboten, der Preis eines kompletten Systems liegt zwischen 25.000 und 120.000 €. Auf dem Markt befinden sich Modelle mit zwei unterschiedlichen Designs. Bei der ersten Gruppe werden PCR-Gefäße in einem Rotor befestigt und rotieren (kontinuierlich oder schrittweise) entlang einer optischen Detektoreinheit, die Temperierung der Reaktionen erfolgt durch die Luft. Dieses Design (LightCycler von Roche, RotorGene von Corbett Research) ermöglicht eine schnelle Aufheizung und Abkühlung und garantiert absolut identische Temperaturprofile für alle Ansätze. Die zweite Gruppe von Real-Time PCR Thermocyclern arbeitet mit Mikrotiterplatten, die in von den klassischen Thermocyclern bekannten Metallblöcken temperiert werden (MX4000 von Stratagene, iCycler von BioRad, ABI PRISM 7700 von Applied Biosystems). Nach Ansicht des Autors sind Geräte mit Thermoblock im Mikrotiterplattenformat für Routinediagnostik grundsätzlich besser geeignet, weil sie die Automatisierung der Pipettierschritte und das Beladen der Anlage erleichtern (Mikrotiterplatte ist das universelle Format im Bioanalytik-Labor) und bei Verbrauchsmaterial niedrigere Kosten verursachen. Bei speziellen Anforderungen können allerdings andere Modelle ihre Vorteile ausspielen: Analysezeiten von unter 0,5 Stunden ermöglicht nur der LightCycler von Roche. Noch kürzere Analysezeiten sind mit in den USA im Rahmen der Bioterrorismus-Vorbeugung konstruierten Anlagen möglich. Für die Durchführung von Analysen im Freien eignet sich das batteriebetriebene SmartCycler von Cepheid. Für die Routinediagnostik sind solche Optionen jedoch nicht wichtig. Bei der Wahl eines Thermoblock-Gerätes sollten insbesondere folgende Kriterien berücksichtigt werden: Vorhandene bzw. erweiterbare Wellenlängen für Anregung und Emission (Nutzung zukünftig verfügbarer Fluorophore, Multiplex-Tauglichkeit), Gleichmäßigkeit der Aufheizung des Thermoblocks (insb. in den Randbereichen), die Möglichkeit der Nutzung eines Temperaturgradienten für die

Optimierung von PCR-Bedingungen, Bedienungsfreundlichkeit der Software, Format und Exportmöglichkeiten für die Ergebnisberichte.

Aufgrund ihrer technischen Überlegenheit hätte die Real-time PCR gute Chancen, ELISA aus der phytomedizinischen Diagnostik zu verdrängen. Als limitierender Faktor wirken in erster Linie die Kosten. Sowohl die Aufbereitung der Proben (DNA-Extraktion) als auch die Analyse selbst sind im Vergleich mit den entsprechenden Prozeduren bei ELISA deutlich teurer. Die Kosten der DNA-Extraktion können bei vorhandener Arbeitskapazität abgefangen werden, wenn kommerzielle Kits durch "Handprotokolle" ersetzt werden, diese Option ist für kommerzielle Diagnoseanbieter und bei einem hohen Probendurchsatz jedoch wenig attraktiv. Die Kosten für DNA-Sonden würden nur bei einem drastischen Preisverfall bei Fluoreszenzmarkierung von Oligonukleotiden sinken, der in absehbarer Zeit unwahrscheinlich ist. Somit bleibt ELISA vermutlich in solchen Bereichen phytomedizinischer Diagnostik weiterhin erhalten, für deren Anforderungen ihre Spezifität und Empfindlichkeit ausreicht. Real-time PCR hat in der Praxis zunächst dort gute Perspektiven, wo die Verfügbarkeit hochwertiger diagnostischer Daten erhebliche Wertverluste verhindern kann und die technischen Vorteile der PCR gegenüber ELISA entscheidend sind. Dies ist z.B. bei der Prüfung von Meristemkulturen der Fall, sowie bei bestimmten Quarantänekrankheiten und in der Produktion hochwertiger Zierpflanzen.

Trends in der Entwicklung diagnostischer Methoden in der Landwirtschaft kann man anhand von Einträgen in der Literaturdatenbank Agricola nachvollziehen. ELISA hat im Jahr 1982 ihren Höhepunkt mit 140 Veröffentlichungen erreicht, inzwischen hat sie sich auf einem stabilen Niveau von 40-70 Veröffentlichungen pro Jahr eingependelt. Die Anwendung von PCR hat 1995 einen Level von 170-200 Veröffentlichungen im Jahr erreicht, der seit 2003 stark steigt. Real-time PCR ist im Jahr 1998 zum ersten Mal erwähnt worden. In agrarwissenschaftlich orientierten Publikationen fand diese Technologie bis 2003 kaum Beachtung; danach stieg die Zahl der Veröffentlichungen über Real-time PCR-Assays für landwirtschaftlich relevante Targets steil an, parallel zu den Veröffentlichungen über PCR. In der phytomedizinischen Praxis wird sich die Methode insbesondere dort verbreiten, wo keine geeigneten ELISA-Kits zur Verfügung stehen. Nur wenige der etablierten ELISA-Tests werden in der Routinediagnostik unmittelbar durch Real-Time PCR-Assays ersetzt werden.

Der wichtigste Bereich mit einem großen Potenzial für den Einsatz von Real-time PCR in der Landwirtschaft ist die Bestimmung des Anteils an gentechnisch verändertem Material im Saatgut, Pflanzenprodukten und Lebensmitteln. Mit dem in den kommenden Jahren erwarteten Anstieg der Zahl der in der Praxis verwendeten Genkonstrukte steht die kommerzielle Anwendung von Real-time PCR vor einem Durchbruch. Kleine und mittelständische Unternehmen, Arbeitsgruppen und Laboratorien in staatlichen Untersuchungsämtern und an Universitäten rüsten sich durch die Entwicklung eigener Methoden und Teilnahme an Verbundinitiativen (z.B. EU-Projekt SMT4-CT96-2072, Arbeitskreis PCR-Analytik im VDLUFA). Zahlreiche PCR-Methoden für gentechnisch

veränderte Pflanzen wurden bereits auf EU-Ebene validiert. Der als Folge der nun auch in Europa bevorstehenden großflächigen Einführung gentechnisch veränderter Sorten in die landwirtschaftliche Praxis erwartete Bedarf an Analysen wird vermutlich deutlich stärker ausfallen als der aktuelle Bedarf in denjenigen Ländern, in denen die Nutzung von Kulturpflanzen mit gezielten Änderungen im Genom seit Jahren etabliert ist.

Literatur

- Anon., 1984: Plant diagnostics: Seeds of a new industry. Business Week, September 17, McGraw-Hill.
- Careri, M., Mangia, A. and Musci, M., 1996: Applications of liquid chromatography-mass spectrometry interfacing systems in food analysis: pesticide, drug and toxic substance residues. *Journal of Chromatography A* 727, 153 - 184.
- Gold, L.S., Ames, B.N. and Slone, T.H., 2002: Misconceptions About the Causes of Cancer. In: *Human and Environmental Risk Assessment: Theory and Practice* (D. Paustenbach, ed.) New York: John Wiley & Sons, pp. 1415-1460.
- Hadidi, A., Czosnek, H. and Barba, M., 2004: DNA microarrays and their potential applications for the detection of plant viruses, viroids, and phytoplasmas. *Journal of Plant Pathology* 86, 97-104.
- Hensley, P. und Myszka, D.G., 2000: Analytical biotechnology: sorting needles and haystacks. *Current Opinions in Biotechnology* 11, 9 - 12.
- Lee, G.P.M.B.E., Kim, C.S., Choi, S.H., Rarn, C.H., Kim, S.U. and Ryu, K.H., 2003: Plant virus cDNA chip hybridization for detection and differentiation of four cucurbit-infecting Tobamoviruses. *J Virol Methods* 110, 19–24.
- McCartnety, H.A., Foster, S.J., Fraaije, B.A. and Ward, E., 2003: Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Management Science* 59, 129 - 142.
- Schena, L., Nigro, F., Ippolito, A. and Gallitelli, D., 2004: Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. *European Journal of Plant Pathology* 110, 893–908.
- Tauscher, B., Brack, G., Flachowsky, G., Henning, M., Köpke, U., Meier-Ploeger, A., Münzing, K., Niggli, Z., Pabst, K., Rahmann, G., Willhöft, C. und Mayer-Miebach, E., 2003: Bewertung von Lebensmitteln verschiedener Produktionsverfahren. Bundesministeriums für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft.
- Vestal, M.L., 1984: High-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Science* 226, 275 - 281.