

Dunkelfeld- und Elektronenmikroskopie

Nachweis von Tetanus- und Botulismus-Toxin im Tierversuch

Bakteriologische Methoden

## Anhang C

# Mikroskopie, Toxinnachweis und bakteriologische Methoden

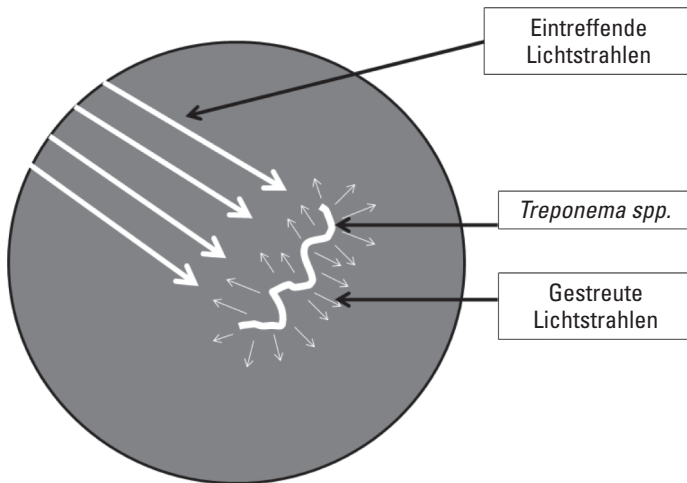
**A**uch wenn die Methoden, die Ihnen in diesem Kapitel vorgestellt werden, im »echten« Buch keinen Platz mehr hatten, sind sie heute noch immer genauso wichtig für die Routine wie früher. Einige Tests werden nicht mehr von allen Laboren durchgeführt (das trifft zum Glück auch auf die Tierversuche zu), dennoch werden gerade die »alten« bakteriologischen Verfahren gern im Unterricht zur Veranschaulichung demonstriert.

## Mikroskopie – mehr als nur Licht

Im Buch wurde Ihnen in Kapitel 9 die Lichtmikroskopie vorgestellt, aber mit Licht können Sie auch nicht alles sehen – Viren oder *Treponema pallidum* (den Erreger der Lues) zum Beispiel nicht. In diesem Abschnitt werden Ihnen noch zwei weitere Methoden zur Mikroskopie vorgestellt, mit denen auch die ganz kleinen Objekte sichtbar werden.

## Dunkelfeldmikroskopie – Tanz im Spotlight

Die Dunkelfeldmikroskopie ist eine besondere Methode, um kleinste Objekte wie zum Beispiel *Treponema pallidum* kontrastreich zu mikroskopieren (siehe Abbildung c.1). Diese Methode bedient sich des **Tyndall-Effekts**; dabei streuen kleine Teilchen Licht, wenn sie in einem dunklen Umfeld von einem Lichtstrahl getroffen werden. Diesen Effekt kennen Sie, wenn in einem abgedunkelten Raum herumfliegender Staub von einem Lichtstrahl beleuchtet wird. Von der Routine wird die Dunkelfeldmikroskopie allerdings nur selten durchgeführt.



**Abbildung c.1:** Dunkelfeldmikroskopie: Eintreffende Lichtstrahlen werden von einem Objekt (hier Treponemen) in alle Richtungen gestreut.



Bei der Dunkelfeldmikroskopie von Treponemen haben Sie lebende und somit infektiöse Mikroorganismen unter dem Mikroskop! Bitte achten Sie hier besonders auf Hygiene und somit auf Ihren eigenen Schutz!

## Elektronenmikroskopie – hier wird scharf geschossen

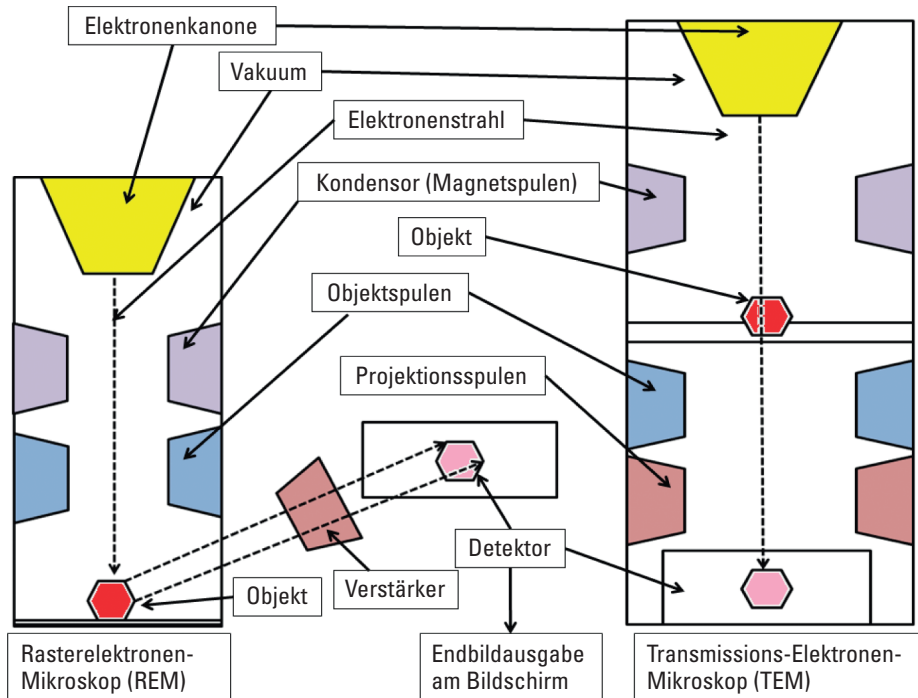
Die Elektronenmikroskopie gehört nicht (mehr) in die Routinediagnostik. Abgesehen davon, dass es inzwischen weitaus praktischere Methoden für die Identifikation von Viren gibt, ist so ein Gerät sehr, sehr teuer und seine Anwendung je nach Fragestellung oft sehr zeitintensiv. Da die Elektronenmikroskopie aber in den Virologie-Kapiteln oft Erwähnung gefunden hat und auch für die Forschung genutzt wird, werden Ihnen zwei Versionen dieser Technik kurz vorgestellt.

### Warum Elektronenmikroskopie?

Viren sind sehr klein. Sie sind sogar so klein, dass sie meist das Auflösungsvermögen des Lichtmikroskops unterschreiten und daher keine erkennbare Ablenkung des Lichtstrahls hervorrufen. Um diese Winzlinge dennoch sichtbar machen zu können, haben sich schlaue Leute Elektronenmikroskope mit einem noch besseren Auflösungsvermögen ausgedacht. Damit die abgefeuerten Elektronen nicht mit Luftmolekülen wechselwirken, erfolgt der ganze Ablauf in einem Vakuum.

### Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM) – das geht sauber durch

1931 wurde von den deutschen Physikern Max Knoll und Ernst Ruska das erste experimentelle TEM in Berlin gebaut. Das TEM funktioniert ähnlich wie ein Lichtmikroskop, allerdings mit Elektronenstrahlen anstatt sichtbarem Licht (Abbildung c.2).



**Abbildung c.2:** Vergleich von Rasterelektronenmikroskop (REM, links) und Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM, rechts)

- ✓ Eine Elektronenkanone feuert Elektronenstrahlen ab.
- ✓ Durch einen Kondensor (Magnetspulen) werden diese Strahlen gebündelt.
- ✓ Die Elektronen durchdringen das Objekt. Damit sie es passieren können, muss das Objekt vorher aufwendig behandelt werden (zum Beispiel Schockgefrierung, Einbettung in Kunstharz) und extrem dünn (10 bis 100 nm) aufgetragen werden.
- ✓ Objektspulen und Projektionsspulen konzentrieren die Elektronen nochmals.
- ✓ Ein Detektor misst die ankommenden Elektronen.
- ✓ Durch ein entsprechendes Verarbeitungsprogramm im PC kann das Objekt am Bildschirm sichtbar gemacht werden. Mit dem TEM können nur 2D-Abbildungen erstellt werden.

## Rasterelektronenmikroskop (REM) – mehr fühlen als sehen

Das erste Rasterelektronenmikroskop (englisch » scanning electron microscope oder SEM«) wurde 1937 von Manfred von Ardenne gebaut. Anstatt eine Probe mit dem Elektronenstrahl zu »durchleuchten«, wird diese mit dem Strahl abgetastet (Abbildung c.2). Seit einigen Jahren gibt es nicht nur Rasterelektronenmikroskope mit Hochvakuum, sondern auch welche mit variablem Druck, in denen Objekte ohne Beschichtung betrachtet werden können. Für eine Abbildung von Virendetails ist die Auflösung aber zu gering.

- ✓ Eine Elektronenkanone erzeugt wieder einen Elektronenstrahl.
- ✓ Durch die Kondensor- und Objektpulen, beides Magnete, wird dieser gebündelt auf das Objekt geschickt.
- ✓ Der Elektronenstrahl trifft auf das Objekt. Dieses sollte ebenfalls vorher behandelt werden, es erhält bei Viren zum Beispiel eine Beschichtung aus Chrom. Das Objekt wirft die Elektronen wieder zurück. Durch die Bewegung des Elektronenstrahls kann das Objekt abgetastet werden; dabei werden Elektronen aus dem Probenmaterial herausgeschlagen.
- ✓ Diese Sekundärelektronen gehen durch einen Verstärker, bevor sie auf einen Detektor treffen.
- ✓ Mit der entsprechenden Software generiert der PC aus den ankommenden Elektronen ein 3D-Modell Ihrer Probe.



Für die Routine sind diese Methoden zum direkten Virusnachweis ungeeignet. Greifen Sie lieber auf die serologischen und molekularbiologischen Methoden zurück. Die sind nicht nur günstiger, sondern auch einfacher und platzsparender durchzuführen.

## Toxinnachweis im Tierversuch

In Kapitel 6 wurden Ihnen die Clostridien vorgestellt, zu denen auch *Clostridium tetani* und *Clostridium botulinum* gehören. Bei Tetanus und Botulismus weisen Sie das Toxin selber nach. Da die Untersuchungsanforderung auf Tetanus- und Botulismus-Toxin nur selten ist, ist es für die Firmen leider nicht wirtschaftlich genug, einen serologischen Test auf den Markt zu bringen (im Gegensatz zum Toxinnachweis von *Clostridium difficile*, denn dafür gibt es einen ELISA). Daher gibt es für beide Toxine leider immer noch den Tierversuch, der zum Glück aber auch nur ganz selten und nicht von jedem Labor durchgeführt wird. Selbstverständlich gilt es, auch strenge Vorschriften vom Tierschutzgesetz einzuhalten!

Für die Tests benötigen Sie mindestens vier Mäuse. Verwenden Sie nur zwei Tiere, kann es zu falsch negativen beziehungsweise falsch positiven Ergebnissen kommen, da Sie die Reaktionen der Mäuse nicht überprüfen können. Zwei Mäuse werden mit einem Antitoxin »immunisiert«, bevor das Untersuchungsmaterial injiziert wird. Die anderen beiden Mäuse werden nicht »immunisiert« und erhalten nur das Untersuchungsmaterial. Ist im Untersuchungsmaterial das Toxin vorhanden, werden die ungeschützten Mäuse unter der Ausbildung typischer Symptome eingehen, während die »immunisierten« Mäuse vor dem Toxin geschützt sind.

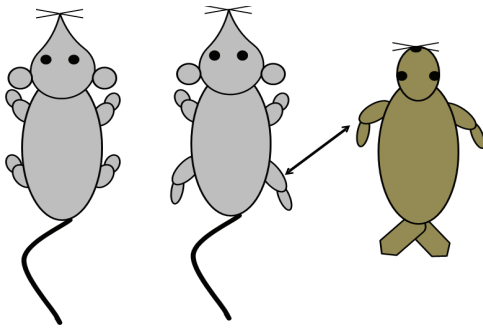


Bei Verdacht auf eine Vergiftung müssen Sie sofort eine Therapie mit Antitoxin einleiten! Untersuchungsmaterial müssen Sie zwar vor Therapiebeginn abnehmen, Sie dürfen aber nicht das Ergebnis des Versuches abwarten!

## Nachweis von Tetanustoxin

Als Untersuchungsmaterial können Sie nur Patientenserum verwenden. Das Serum sollten Sie möglichst bald nach Erkrankung (das Toxin dockt an den Nervenzellen an und verschwindet langsam aus der Blutbahn) und vor Therapiebeginn (das verabreichte Antitoxin würde das Toxin inaktivieren und der Test »falsch negativ« ausfallen) abgenommen werden.

Positives Testergebnis: Als typisches Symptom tritt bei den Mäusen durch einen Starrkrampf der Hinterbeine die in Abbildung c.3 gezeigte **Robbenstellung** der Hinterbeine auf. Allgemeine Muskelkrämpfe können innerhalb von ein bis drei Tagen auftreten. Sie können den Test nur sicher als »positiv« bewerten, wenn die beiden Kontrollmäuse ohne gesundheitliche Beeinträchtigung am Ende des Testes am Leben sind, während die ungeschützten Mäuse (unter mehr oder weniger stark ausgeprägten Symptomen innerhalb von 10 Tagen) verenden.

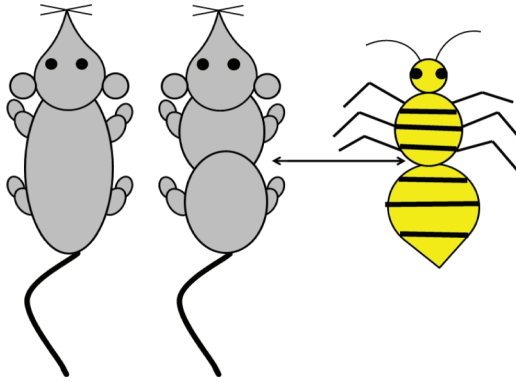


**Abbildung c.3:** Schematische Darstellung. Links die normale Beinstellung der Mäuse, rechts die Robbenstellung

## Nachweis von Botulinumtoxin

Sie können für diesen Test nicht nur Patientenserum, sondern auch Erbrochenes und Nahrungsmittel verwenden. Das Patientenserum sollten Sie auch bei diesem Test vor Therapiebeginn abnehmen. Erbrochenes und Nahrungsmittel müssen vor dem Testeinsatz in 0,9%iger NaCl-Lösung zerkleinert und mit einem Filter steril gefiltert werden.

Positives Testergebnis: Typische Symptome sind neben der in Abbildung c.4 gezeigten **Wespentaille** die allgemeine Muskelschlaffheit sowie die Lähmung der Beinmuskulatur. Bei den Mäusen tritt eine **Schnappatmung** auf. Der Tod der Mäuse tritt infolge der Atemlähmung ein. Sie können den Test nur sicher als »positiv« bewerten, wenn die beiden Kontrollmäuse ohne gesundheitliche Beeinträchtigung am Ende des Testes am Leben sind, während die ungeschützten Mäuse (unter mehr oder weniger stark ausgeprägten Symptomen innerhalb von 7 Tagen) verenden.



**Abbildung c.4:** Schematische Darstellung. Rechts die normale Körperform der Maus, links die sogenannte »Wespentaille«

## »Alte« bakteriologische Tests – ganz lässig »old school«

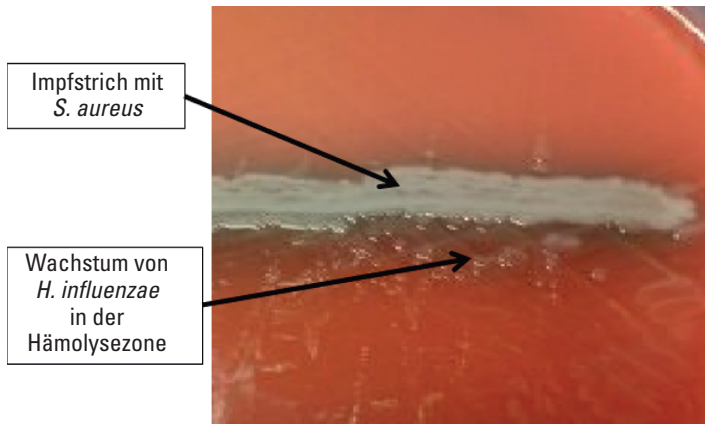
Stellen Sie sich vor, in Ihrem Labor fällt ein wichtiges Gerät zur Identifikation aus oder Sie können mit der biochemischen Identifizierung die Bakterienspezies nicht eindeutig bestimmen. In einigen Fällen hilft Ihnen noch nicht einmal die Molekularbiologie weiter, weil die einzelnen Vertreter einer Art biochemisch und molekularbiologisch zu nahe verwandt sind. Anbei eine kurze Liste mit einigen klassischen Tests, die Ihnen in diesem Fall sehr nützlich sein können.

### Die AMME – Hilfestellung für *Haemophilus influenzae*

Wie in Kapitel 4 bereits beschrieben, benötigt *Haemophilus influenzae* zwei Wachstumsfaktoren (X-Faktor = Hämin, V-Faktor = NAD). Auf normalem Blutagar können Sie *Haemophilus influenzae* nur dann wachsen lassen, wenn Sie zusätzlich einen Impfstrich von *Staphylococcus aureus* auftragen. Streichen Sie ihren verdächtigen Keim großflächig auf einer Blut-Agarplatte aus und bringen Sie einen Impfstrich von *Staphylococcus aureus* auf die Platte. Bebrüten Sie die Platte bei erhöhter  $\text{CO}_2$ -Spannung und  $36^\circ\text{C}$  über Nacht. In den Erythrozyten (roten Blutkörperchen) befindet sich das Hämin, das durch die Hämolyse von *Staphylococcus aureus* freigesetzt wird und jetzt als Nährstoff zur Verfügung steht. Zusätzlich bildet dieser den Cofaktor NAD. Jetzt kann in der Hämolysezone von *Staphylococcus aureus* (der »Amme«) dann als kleine, feine Kolonie Ihr *Haemophilus influenzae* wachsen (Abbildung c.5)



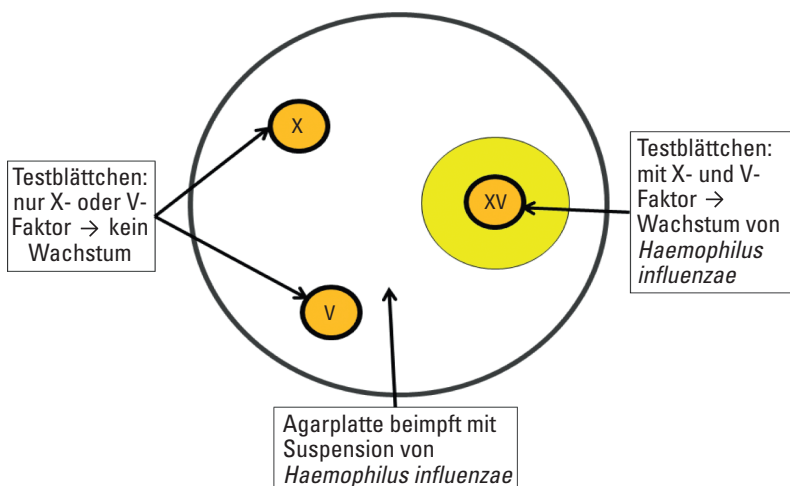
Mit dem AMME-Test können Sie *Haemophilus influenzae* nicht eindeutig identifizieren, da auch andere Bakterien (beispielsweise andere *Haemophilus spp.*) im Hämolyse-Hof von *Staphylococcus aureus* wachsen können.



**Abbildung c.5:** Das »Ammen«-Phänomen. In der Hämolysezone von *Staphylococcus aureus* sind die Erythrozyten zerstört und Hämin wurde freigesetzt. Da *Staphylococcus aureus* den Cofaktor NAD produziert, kann *Haemophilus influenzae* nur in der Hämolysezone wachsen, obwohl er auf der gesamten Agarplatte verimpft wurde.

## Der XV-Test – weiter geht's mit *Haemophilus* spp.

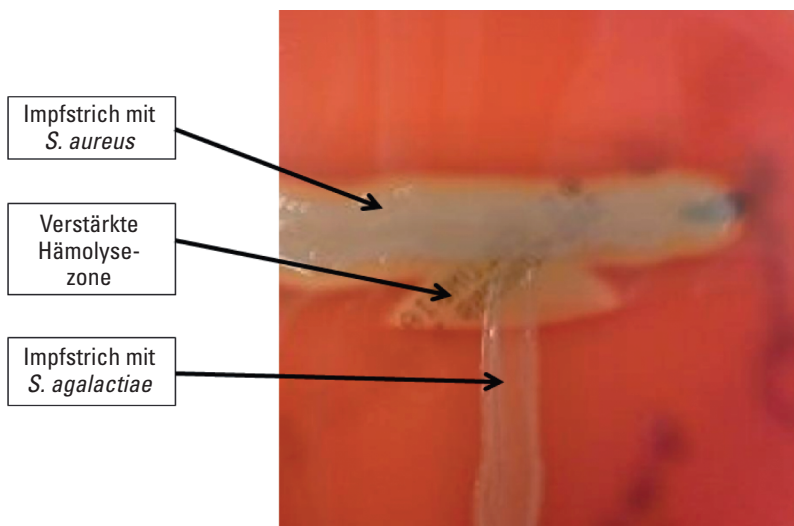
Um Ihren Keim aus dem Hämolyse-Hof von *Staphylococcus aureus* weiter zu identifizieren, können Sie den XV-Test verwenden. Auf eine Agarplatte ohne besondere Nährstoffe geben Sie eine Suspension mit Ihrem gesuchten Erreger. Jetzt legen Sie drei Testblättchen auf die Agarplatte. Ein Testblättchen ist mit dem X-Faktor, eines mit dem V-Faktor und das dritte mit beiden Faktoren getränkt. Bebrüten Sie die Platte bei erhöhtem  $\text{CO}_2$ -Gehalt und  $36^\circ\text{C}$  über Nacht. Die Faktoren diffundieren in den Agar und nur bei dem Testblättchen mit X- und (!) V-Faktor kann *Haemophilus influenzae* wachsen und bildet einen Hof um das Blättchen (Abbildung c.6). *Haemophilus parainfluenzae* benötigt hingegen nur den V-Faktor, um zu wachsen.



**Abbildung c.6:** Der XV-Test. Nur bei dem Testblättchen, aus dem beide Faktoren in den Agar diffundiert sind, kann *Haemophilus influenzae* als angrenzender Hof wachsen.

## CAMP-Test – wenn sich zwei Bakterien verbünden

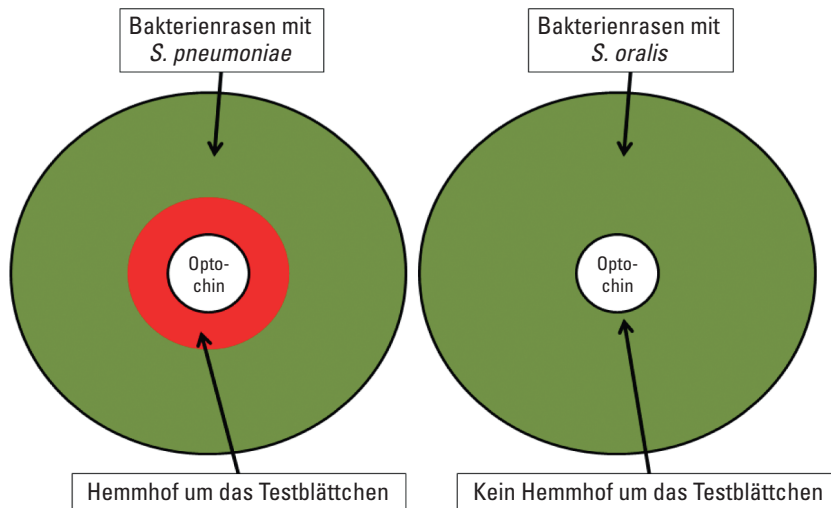
Nach seinen Erstbeschreibern (Christie, Atkins und Munch-Petersen) benannt, dient Ihnen der CAMP-Test zur Identifikation von *Streptococcus agalactiae*. Geben Sie einen Impfstrich von *Staphylococcus aureus* auf eine Blutagarplatte. Streichen Sie *Streptococcus agalactiae* im rechten Winkel aus und bebrüten Sie die Agarplatte bei 36 °C für 24 Stunden aerob (wenn Sie den Test bei erhöhtem CO<sub>2</sub>-Gehalt bebrüten, kann auch *Streptococcus pyogenes* eine verstärkte Hämolyse hervorrufen). An der Stelle, an der beide Bakterien aufeinandertreffen, tritt eine pfeilförmige Hämolysezone auf. (Abbildung c.7) Diese kommt durch ein Zusammenspiel des CAMP-Faktors (eines von *Streptococcus agalactiae* gebildeten Proteins) und des  $\beta$ -Hämolysins von *Staphylococcus aureus* zustande.



**Abbildung c.7:** Wenn der CAMP-Faktor von *Streptococcus agalactiae* auf das  $\beta$ -Hämolysin von *Staphylococcus aureus* trifft, entsteht durch ein Zusammenwirken eine pfeilförmige verstärkte Hämolyse der Schafserthrozyten.

## Optochin-Test – Pneumokokken sind sensibel

*Streptococcus pneumoniae* und einige andere vergrünende Streptokokken (zum Beispiel *Streptococcus oralis*) sind biochemisch und molekularbiologisch so nah miteinander verwandt, dass Sie keine eindeutigen Ergebnisse erhalten, und auch optisch ist nicht immer verlässlich ein Unterschied auszumachen. Jetzt können Sie den Optochin-Test einsetzen. Optochin heißt eigentlich Ethylhydrocuprein und ist eine auf *Streptococcus pneumoniae* bakterizid wirkende Substanz. Bringen Sie Ihre verdächtige Kolonie in Suspension und streichen Sie sie gleichmäßig auf einer Müller-Hinton-Agarplatte mit Blut aus. Legen Sie ein mit Optochin getränktes Testblättchen auf die Agarplatte und bebrüten Sie sie bei 36 °C aerob für 24 Stunden. Wenn Sie den Test mit erhöhtem CO<sub>2</sub>-Gehalt bebrüten, kann es zu falschen Ergebnissen kommen (einige Pneumokokken sind dann Optochin-resistent). Die Substanz diffundiert in den Agar. Bei *Streptococcus pneumoniae* bildet sich (in den meisten Fällen) ein Hemmhof um das Testblättchen, während andere *Streptococcus spp.* in der Regel resistent sind und bis an das Testblättchen heranwachsen (Abbildung c.8).

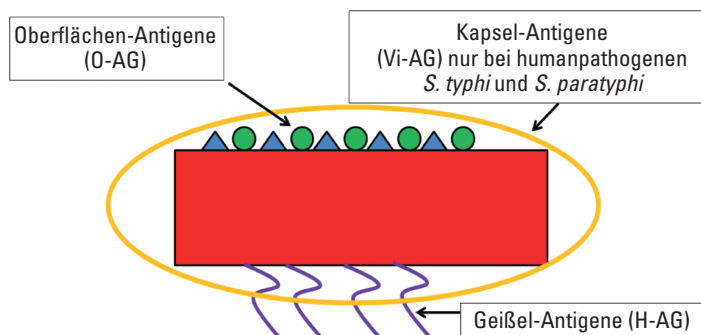


**Abbildung c.8:** Um das Testblättchen mit Optochin hat sich auf einem Streptococcus-pneumoniae-Rasen ein Hemmhof gebildet (rote Eigenfarbe der Agarplatte). Andere Streptokokken wie Streptococcus oralis sind gegen Optochin resistent und wachsen bis an das Testblättchen heran.

## Das Kauffmann-White-Schema – so viel Auswahl

Die Salmonellen (Kapitel 4) gehören zu den gemeinen Bakterien, die Sie nicht einfach mit der Bunten Reihe, dem MALDI-tof oder der PCR identifizieren können. Das gelingt nur bis auf Speziesebene. Die vollständige Typisierung ist dann tatsächlich nur mit Agglutinationsverfahren mit dem Kauffmann-White-Schema möglich.

Da es sich hier um eine direkte Bakterien-Agglutination handelt, gehört dieser Test vom Prinzip her eigentlich in den Bereich Serologie (AG-AK-Reaktionen), er wird aber eher in der Bakteriologie eingesetzt. Und so geht es: Sie haben viele kleine Fläschchen, welche unterschiedliche Antikörper gegen die einzelnen Bestandteile von Salmonellen (Abbildung c.9), die Oberflächen-AG (es existieren über 60 verschiedenen Typen), die Geißel-AG und eventuell noch das Kapsel-AG in gelöster Form enthalten.



**Abbildung c.9:** Schematische Darstellung einer Salmonelle mit zwei O-AG, den H-AG und dem Kapsel-AG (Vi-AG für Virulenz)

Die AK-Lösungen werden Seren genannt. Als Negativkontrolle (ob die Bakterien untereinander agglutinieren) verwenden Sie sterile 0,9%ige NaCl-Lösung (Abbildung c.10).

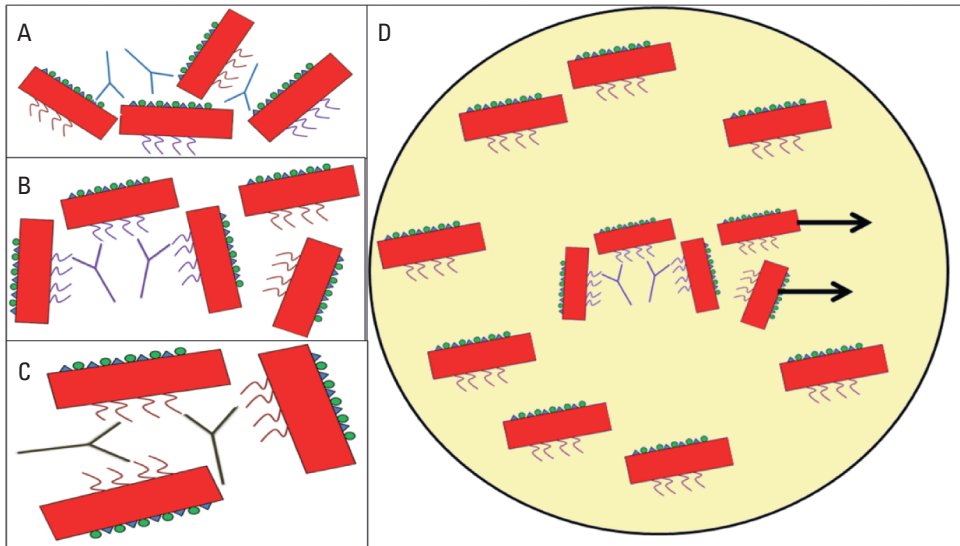
1. Tropfen Sie einen Tropfen Serum gegen ein Oberflächen-AG auf einen Objektträger.
2. Nehmen Sie mit einer sterilen Öse etwas Material von der Bakterienkolonie und verreiben Sie es im Serum.
3. Warten Sie ein paar Minuten (etwa 5 min), ob es agglutiniert. Schwenken Sie den Objektträger dabei vorsichtig hin und her.

Damit Sie sicher wissen, ob Sie mit einer Salmonelle arbeiten, agglutinieren Sie den Erreger zuerst mit einem **omnivalenten Serum**. Dieses Testserum enthält AK gegen alle O-AG von Salmonellen. Um das Ganze dann noch weiter zu vereinfachen, starten Sie die Agglutination mit einem sogenannten **polyvalenten Serum**, welches AK gegen mehrere AG (beispielsweise bei den H-AG: h, g und m) enthält. Wenn bei dieser Reaktion eine Agglutination erfolgt, reicht es, wenn Sie die AG (in diesem Beispiel die drei AG h, g und m) einzeln agglutinieren. Mindestens eine Reaktion wird dann positiv sein.

Wenn es nicht agglutiniert, nehmen Sie das nächste Serum gegen das nächste AG. Und ja, Sie müssen wirklich so lange mit den verschiedenen Seren agglutinieren, bis eine Reaktion eintritt. Und wenn es agglutiniert, überprüfen Sie das nächste AG (welches dann im Schema angegeben wird), da eine Salmonelle nicht nur ein O-AG besitzt. Als Beispiel: *S. Typhi* hat O:9 und O:12. Wenn O:9 agglutiniert, machen Sie gleich im Anschluss den Test auf O:12.

4. Sobald Sie die O-AG rausbekommen haben, wenden Sie sich den H-AG zu. Die H-AG liegen in zwei Phasen vor, wobei diese (je nach Serovar) entweder einzeln oder auch gleichzeitig expremiert werden. Sie verfahren für die H-AG genauso wie für die O-AG. Manchmal können Sie gleich beide Phasen agglutinieren, zum Beispiel wenn ausreichend Salmonellen vorhanden sind, die die zweite Phase für die Fortbewegung nutzten. Wenn nicht, müssen Sie diese speziellen Vertreter erst selektiv anzüchten. Dafür verwenden Sie zum Beispiel einen **Sven-Gard-Agar** (Abbildung c.10 D). Das ist ein halbfester Agar, in den Sie zunächst AK gegen die erste Phase geben. Diese binden die Salmonellen, welche das erste H-AG besitzen, und verhindern, dass diese über den Agar schwärmen. Nur die Salmonellen, die das zweite H-AG produzieren, vermehren sich und schwärmen über den Agar. Aus dieser Schwärmzone agglutinieren Sie wieder.

Aktuell gibt es über 2500 Serovare von Salmonellen. Also planen Sie ein bisschen Zeit für die Agglutination nach Kauffmann-White ein und seien Sie nicht enttäuscht, wenn die ersten Seren nicht gleich agglutinieren. Sie haben ja genügend Auswahl. Ach ja, der Grund, warum Sie den ganzen Aufwand betreiben (bei enteritischen Salmonellen therapieren Sie ja eh immer gleich): Die Epidemiologen wollen den Übeltäter immer ganz genau kennen. Schließlich kann es ja zu einem Ausbruch kommen und da müssen die Fälle bis zur gemeinsamen Quelle zurückverfolgt werden, um den Ausbruch zu stoppen.



**Abbildung c.10:** Schematische Darstellung einer Salmonellen-Agglutination: A: Agglutination der O-Ag. B: Agglutination der H-Ag der ersten Phase, C: Agglutination der H-Ag der zweiten Phase, D: Sven-Gard-Schwärmplatte (Erklärung im Text)

Vielen Dank, dass Sie auch dieses Zusatzkapitel gelesen haben. Jetzt können Sie vor Nicht-Laboranten so richtig mit Ihrem Wissen angeben. Viel Spaß dabei!

