

*Aus dem Institut für Milchhygiene und Milchtechnologie der
veterinärmedizinischen Universität, Wien*

**ZUR BEDEUTUNG DER ENDOTOXINE GRAMNEGATIVER MIKROORGANISMEN
SOWIE DEREN NACHWEIS MITTELS DES LIMULUSTESTES**

H. ASPERGER

Endotoxine und deren biologische Eigenschaften

Endotoxine sind Zellwandbestandteile gramnegativer Mikroorganismen. Chemisch handelt es sich um Lipopolysaccharide (LPS), eine in der Natur lediglich in der Zellwand der gramnegativen Bakterien gefundenen Substanz.

Bei parenteral aufgenommenen Endotoxinen kommt es in Abhängigkeit vom allgemeinen Gesundheitszustand und der individuellen Empfindlichkeit zu einer Reihe biologischer Effekte. Die am deutlichsten erkennbare Reaktion des Körpers auf das Endotoxin ist das Auftreten von Fieber. Man bezeichnet die Endotoxine daher als pyrogene Substanzen.

Ganz anders stellt sich die Toxizität nach einer oralen Aufnahme dar. Da im Darm massenhaft gramnegative Bakterien leben und bei ihrem Absterben Endotoxin in die Umgebung abgeben, ist der Körper in diesem Bereich dauernd gegenüber Endotoxin exponiert. Dieses wird aber ohne Probleme vom Monocyten/Makrophagensystem beseitigt.

Bedeutung und Nachweis gramnegativer Keime in der Lebensmittelhygiene

Die Qualitätssicherung von Milch- und Milchprodukten und vieler anderer Lebensmittel ist derzeit überwiegend auf die Ausschaltung bzw. Unterdrückung gramnegativer Keime (GN) ausgerichtet. GN wie Enterobacteriaceen, Pseudomonaden, Flavobakterien u.a. werden zwar durch Erhitzungsverfahren wie der Pasteurisierung abgetötet, können aber

zum einen nach ihrer Abtötung durch ihre hitzestabilen Enzyme wirken,

und zum anderen, wenn sie in geringen Mengen durch Reinfektionen die bereits GN-freien Produkte kontaminieren, aufgrund ihrer psychrotrophen Fähigkeiten auch bei Kühlung ausgeprägte proteolytische und lipolytische Veränderungen hervorrufen.

Für eine lebensmittelhygienische Kontrolle ist somit die Erfassung vermehrungsfähiger als auch abgetöteter GN von großer Bedeutung.

Mit den derzeit zur Verfügung stehenden kulturellen Bestimmungsverfahren ist es lediglich möglich, mit den Coliformen, Enterobacteriaceen oder Psychrotrophen Teile der GN-Flora unter mehr oder weniger großem Aufwand an Zeit und Material quantitativ zu erfassen. Es existiert jedoch kein standardisiertes Verfahren oder Medium, das die Bestimmung der GN-Bakterien als Gesamtgruppe erlaubt. Da auch sehr geringe Kontaminationen lebensmittelhygienisch von Bedeutung sind, erfordern die kulturellen Verfahren aufwendige Anreicherungs-schritte.

Der Limulustest als Alternative

Mit dem Limulustest ist eine Methode gegeben, die die Erfassung der GN-Keimflora durch die quantitative Bestim-

mung der in den Zellwänden aller GN Mikroorganismen vorkommenden LPS erlaubt. Man bedient sich dabei der Blutzellen (Amöbozyten) aus dem Blut des Pfeilschwanzkrebse (*Limulus polyphemus*). Die Blutzellen enthalten ein Enzymsystem, das bei Anwesenheit von LPS eine der Blutgerinnung ähnliche Gelbildung hervorruft.

Diese Reaktion kann analytisch in verschiedener Weise sichtbar gemacht werden:

- a) Röhrchen-Gerinnungstest: Diese Methodik ist derzeit am meisten gebräuchlich. In pyrogenfreien Reagenzgläsern werden LAL und Probenmaterial gemischt und nach einer Bebrütung von 1 Stunde bei 37°C auf Gelbildung überprüft. Diese qualitativ auswertbare Testform hat eine materialsparende Weiterentwicklung in Form eines Mikrotiterplattenansatzes erfahren. Eine Quantifizierung des LPS-Gehaltes ist durch Anlegen von Verdünnungsreihen ebenfalls möglich.

Die Methode hat eine geringe Präzision aufgrund der Subjektivität der Ablesung und der Ungenauigkeiten der Verdünnungsprozedur.

- b) Turbidimetrische Methode: Durch Polymerisierung von Coagulin durch die C-Peptide erfolgt eine Trübungszunahme, die im Spektralphotometer bei 360 nm gemessen werden kann.

Diese Methode wird als spezifischer und präziser beschrieben.

- c) Chromogentest: Durch die Aktivierung eines Proenzym im LPS-LAL-Komplex kann ein chromogenes Substrat proteolytisch gespalten werden. Die Freisetzung von p-Nitroanilin wird colorimetrisch bei 405 nm gemessen. Diese

Methode ist sehr empfindlich, benötigt allerdings entsprechende Meßgeräte.

Einsatz des Limulustestes in der Lebensmittelkontrolle

Verschiedene grundlegende Untersuchungen haben den Einsatz des Limulustestes in der Lebensmitteluntersuchung ermöglicht:

a) Limulustest und Reinkulturen von Gramnegativen:

Bei der Untersuchung von Reinkulturen gramnegativer Keime zeigte sich in allen Fällen eine enge Beziehung zwischen der Keimzahl und dem LPS-Gehalt. Zwischen den einzelnen gramnegativen Arten ergeben sich jedoch bei gleicher Keimzahl deutliche Unterschiede. Bei Berücksichtigung aller Befunde kann in Rohmilch, da ja meist Mischkulturen der Gramnegativen vorliegen, im Mittel 1 ng LPS einem Keimgehalt von 3000 bis 7000 zugeordnet werden. Als Keimzahläquivalent für die Interpretation des LPS-Wertes kann 5000 KBE eingesetzt werden.

b) LPS-Werte von Milch und Milchprodukten:

Beispiele verschiedener Untersuchungen von Rohmilch, pasteurisierter Milch und H-Milch zeigen asymmetrische Verteilungsmuster. Daraus wird deutlich, daß Überschreitungen des unter normalen Bedingungen erreichbaren LPS-Wertes vorkommen. Die Erfassung des Limulustiter macht daher eine Schnellidentifikation und damit Elimination grenzüberschreitender Proben möglich.

c) Kontaminationsnachweis:

Der für die Beurteilung erhitzter, nicht fermentierter Milchprodukte überaus wichtige Nachweis erfolgter Kontaminationen mit gramnegativen Keimen kann in sehr effektiver Weise durch Bestimmung eines Limulusdifferenzi-

ters erfolgen. Die Differenz der Limulustiter vor und nach einer Bebrütungsphase der Probe ermöglicht es, Voraussagen über die Wachstumskinetik der gramnegativen Verderbskeime und somit der Haltbarkeit süßer Milchprodukte zu treffen.

d) Andere Lebensmittel:

Die Anwendung des Limulustestes erstreckt sich nicht nur auf Milch und Milchprodukte. Auch andere tierische Lebensmittel, wie Fleisch und Fisch, aber auch pflanzliche Lebensmittel und auch Zucker lassen sich mittels des Limulustestes hinsichtlich hygienischer Kriterien beurteilen.

Konsequenzen und Zukunftsperspektiven

Der Limulustest kommt als Pyrogentest aus der Kontrolle pharmazeutischer Produkte, in dessen Rahmen auch die Untersuchung von Wasser einen wichtigen Stellenwert einnimmt.

Für den Einsatz des Limulustestes im Bereich der Qualitätssicherung von Lebensmitteln scheinen folgende Konsequenzen und Zukunftsperspektiven vorstellbar:

Zunächst sind es methodische Weiterentwicklungen. Mit der breiteren Verfügbarkeit von Mikrotiterplatten-Fotometern und den entsprechenden Softwarepaketen werden sich die Methoden von den Gerinnungsmethoden zu den fotometrischen Analysen verlagern.

Für die Erzeugung qualitativ hochwertiger H- und Sterilprodukte wird sich ein breites Anwendungsgebiet des Limulustestes für die Auswahl der Rohware ergeben.

Einen verstärkten Einsatz wird der Limulustest auch als Rekontaminationsnachweis auf der Basis der Differenzwertbestimmungen erfahren.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß das Nachweisprinzip des Limulustestes mit seiner Aussage über lebensfähige bzw. bereits abgestorbene gramnegative Mikroorganismen nicht mehr aus einer lebensmittelhygienischen Kontrolle wegzudenken ist.

Anschrift des Verfassers: Univ.-Doz.Dr. Hans ASPERGER, Institut für Milchhygiene und Milchtechnologie, Veterinärmedizinische Universität Wien, Linke Bahngasse 11, A-1030 Wien.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Wasser und Abwasser](#)

Jahr/Year: 1989

Band/Volume: [1989](#)

Autor(en)/Author(s): Asperger H.

Artikel/Article: [Zur Bedeutung der Endotoxine gramnegativer Mikroorganismen sowie deren Nachweis mittels des Limulustestes 325-330](#)