

Beitrag zur Standardisierung und Qualitätssicherung der molekularbiologischen Diagnostik von Schadpilzen



im Institut für Holztechnologie Dresden

Projektleiter: Dipl.-Ing. Kordula Jacobs
 Bearbeiter: Dipl.-Ing. Kordula Jacobs
 Dipl.-Ing. Sc. Natalie Rangno
 Förderinstitution: BMWi/DIN

Einleitung und Zielstellung

Im Rahmen holzschutztechnischer und baubiologischer Untersuchungen an Gebäuden und Bauteilen werden zunehmend molekularbiologische Methoden zur Identifizierung pilzlicher Schaderreger angewendet. Diese wurden als Option auch in Teil 4 der aktualisierten Fassung der DIN 68800-4:2012 aufgenommen.

Die molekularbiologische Pilzdiagnostik wird von verschiedenen Institutionen angeboten, wobei die Expertise im Bereich Holz- und Bautenschutz in unterschiedlichem Maße und zum Teil auch nicht vorhanden ist. Weiterhin kommen je nach Arbeitsgruppe, Bundesland und Laborausstattung sehr unterschiedliche und nicht standardisierte In-house-Methoden zum Einsatz; ein allgemeingültiger Standard existiert nicht. Die Sicherheit der Laborergebnisse ist mitentscheidend für Art, Umfang und Kosten von Sanierungsmaßnahmen sowie den Sanierungserfolg. Bisher existieren jedoch keine Untersuchungen bezüglich der Zuverlässigkeit der Diagnostik bei den verschiedenen Anbietern und es besteht dringender Bedarf an einer Evaluierung und Standardisierung der Methoden sowie einer unabhängigen Qualitätskontrolle.

Ziel des Vorhabens war eine Evaluierung der bei verschiedenen Anbietern verwendeten Nachweisttechnologien und -methoden und die Erarbeitung von Grundlagen zur Standardisierung der molekularen Pilzdiagnostik. Weiterhin sollten Instrumente für eine interne und externe Qualitätskontrolle entwickelt werden. Zur Sicherstellung einer qualitätsgerechten praktischen Diagnostik wurde ein Ringversuch konzipiert und im Rahmen des Projektes unter Einbeziehung der relevanten deutschen Diagnostikanbieter durchgeführt.

Lösungsansatz und Vorgehensweise

Bisher sind keine relevanten Normungsaktivitäten zum Thema auf EU-Ebene bekannt, obwohl es einen europäischen Markt für molekularbiologische Pilzdiagnostik im Holzschutzbereich gibt. Daneben existieren zahlreiche Forschungsaktivitäten zur Diagnostik holzerstörender Pilze, wobei jedoch vor allem Untersuchungen zur Artenvielfalt und taxonomischen Systematik der Pilze und damit andere diagnostische Fragestellungen und Methoden im Mittelpunkt stehen.

Die Projektarbeit hatte den Charakter einer pränormativen Forschung und diente der Erfassung und Bewertung der aktuellen Situation auf dem Gebiet der angewandten molekularen Holzpilzdiagnostik sowie der Erarbeitung von Grundlagen für die Standardisierung dieser Diagnostik. Relevante Diagnostikanbieter und weitere Interessengruppen wurden im Rahmen eines Ringversuchs in die Projektarbeit eingebunden. Es erfolgte eine Erfassung der derzeit genutzten Methoden. Wissenschaftliche sowie ökonomische Kriterien für deren vergleichende Bewertung konnten festgelegt werden. Für abgeleitete Vergleichsparameter kamen teilweise bereits vorhandene Daten zur Anwendung. Weitere Parameter wurden an identischen Probenmaterialien experimentell bestimmt, darunter die Spezifität, die Nachweisgrenze sowie die Reproduzierbarkeit der einzelnen Methoden.

Die identifizierte, leistungsfähigste Methode konnte experimentell weiterentwickelt, optimiert und in ein Standardprotokoll als Grundlage für eine zukünftige Norm überführt werden. Anschließend erfolgten eine Basisvalidierung sowie ein Feldtest. Weiterhin wurde ein Konzept für regelmäßige Ringversuche und für die Bewertung von Diagnostikan-



Abb. 1: Beispiele für Probenmaterialien, die bei der vergleichenden Diagnostik eingesetzt wurden; von links: pilzgeschädigtes Holz ohne sichtbare Pilzstrukturen, Oberflächenmyzel auf einer Holzprobe, Reinkultur von *Leucogyrophana pinastri* in einer Malzextrakt-Agar-Petrischale

bietern entwickelt. Ein erster Ringversuch erfolgte im Rahmen des Projektes.

Ergebnisse

Methodenevaluierung und -optimierung

Im Vorfeld der Methodenevaluierung sowie im Rahmen der anschließenden Weiterentwicklung der favorisierten Diagnostikmethode erfolgte eine Basisvalidierung (bioinformatische und experimentelle Überprüfung der Spezifität, Implementierung von positiven und negativen Kontrollen, Optimierung der PCR-Parameter) für verschiedene PCR-Assays. Anschließend wurden entsprechende Standardprotokolle erarbeitet und in Form von Standardarbeitsanweisungen (Entwürfe) niedergelegt:

- AA-20-44: Probenahme Pilzdiagnostik und DNA-Extraktion,
- AA-20-45: Real-Time-PCR-Nachweis von *Serpula lacrymans* (Fluoreszenzassay),

- AA-20-46: Sondenbasierter Real-Time-PCR-Nachweis von *Serpula lacrymans*.

Die vergleichende Bewertung der verschiedenen Nachweismethoden erfolgte durch Diagnostik von pilzgeschädigten Holzproben (Beprobung von 20 Schadensfällen aus dem Jahr 2012) sowie Referenzkulturen (10 Reinkulturen). Ausgewählte Probenmaterialien zeigt Abbildung 1.

Nach der DNA-Extraktion (Optimierte Methode der DNA-Isolierung mit dem Nucleo-Spin®Plant-Extraktionskit von Macherey-Nagel) wurden die DNA-Präparate hinsichtlich Qualität und Quantität bewertet und mit den unterschiedlichen Methoden analysiert. Dabei fanden verschiedene Bewertungskriterien Anwendung, insbesondere die Bestimmungssicherheit, die Nachweisgrenze bzw. Sensitivität, die Kontaminationsanfälligkeit sowie die Reproduzierbarkeit. Die Ergebnisse zu Bestimmungssicherheit zeigt Tabelle 1. Die höchste Sensi-

Tab. 1: Vergleichende Bewertung molekularer Nachweismethoden für Hausfäulepilze

Diagnostikmethode	Anzahl korrekter und eindeutiger Befunde an Praxisproben (20)*	Anzahl korrekter Befunde an Reinkulturen (10)
Konventionelle PCR-Verfahren mit artspezifischen Primern und Elektrophorese-Gelauwertung (Primer nach Jacobs et al. 2011)**	11	10
Real-Time PCR-mit artspezifischen Primern, EvaGreen-Assay (Primer nach Jacobs et al. 2011)**	18	10
Sondenbasierte Real-Time-PCR (Primer und Sonden unveröffentlicht)	18	10
Mycotype Basidio-DNA-Chip mit artspezifischen Hybridisierungssonden	18	10

* keine analysierbare DNA bei zwei Proben

** Jacobs K, Rangno N, Weiß B, Becker-Follmann J (2011): PCR-basierter Nachweis von *Serpula lacrymans*. 4. Mykologisches Kolloquium, Institut für Holztechnologie Dresden gemeinnützige GmbH, Dresden, 27./28.10.2011, S. 9-18

tivität und Bestimmungssicherheit wurden mit den Real-Time-PCR-Verfahren (Nachweisgrenze 10 fg genomische DNA in einem 20 µl Analysenansatz im Vergleich zum DNA-Chip mit 100 fg und der konventionellen PCR mit 1 pg) erzielt.

Die konventionelle PCR ist vor allem aufgrund der oft nicht eindeutigen Auswertung (Interpretationsspielraum bei der Gel-Bewertung) und der erforderlichen, relativ großen Nachweisfragmente problematisch. Dadurch ist stärker degradierte DNA mit konventioneller PCR nicht nachweisbar. Real-Time-PCR-Verfahren ermöglichen sehr kleine Nachweisfragmente bis 50 bp und gewährleisten eine objektive Bewertung der Analyse. Sie können durch die fluoreszenzbasierte Detektion eine höhere Sensitivität erzielen und sind auch im Hinblick auf die Kontaminationsanfälligkeit zu bevorzugen, da hier die gesamte Analytik im geschlossenen System erfolgt und die Gefahr der Verschleppung von PCR-Produkten nicht besteht. Aus diesen Gründen ist die sondenbasierte Real-Time PCR mit zwei voneinander unabhängigen spezifischen Markern derzeit die beste Grundlage für die Erarbeitung eines diagnostischen Standards zum Nachweis des Echten Hausschwamms.

Ringversuch

Von 12 angefragten Laboratorien beteiligten sich 8, darunter 5 aus Deutschland und 3 aus anderen europäischen Staaten, an einem vom Mykolabor Dresden organisierten Ringversuch zur molekularbiologischen Diagnostik von *Serpula lacrymans*. Dafür erfolgte die Präparation von sechs Proben aus Referenzmaterial von pilzdurchwachsenem Holz oder Myzel. Das Material wurde im Rahmen praktischer Schadensfälle gewonnen oder durch Pilzzucht auf Holz unter Laborbedingungen hergestellt. Vor der Aliquotierung wurde pilzgeschädigtes Holz unter sterilen Bedingungen gemahlen, Myzelien zerkleinert und soweit wie möglich homogenisiert. Weiterhin waren pilzdurchwachsene Hölzer in Reinkultur Untersuchungsgegenstand (Tabelle 2).

Die Aufgabe der Ringversuchsteilnehmer bestand in einem Nachweis bzw. Ausschluss des Echten Hausschwamms (*Serpula lacrymans*). Das Positiv-Probenspektrum umfasste eine sehr schwierige Praxisprobe des Zielorganismus mit stark degenerierter DNA (Probe 1) sowie meist einfach zu analysierendes Myzel aus einer Reinkultur (Probe 6). Negativproben wurden von nahe verwandten

Tab. 2: Probenmaterial für den 1. Ringversuch

Proben-Nr.	Art/Zustand des Materials	Pilzart
1	gemahlene Holz, Praxismaterial von lange zurückliegenden dem Befall	<i>Serpula lacrymans</i>
2	gemahlene Holz, Praxismaterial	<i>Serpula himantoides</i>
3	gemahlene Holz, Praxismaterial	<i>Oligoporus placenta</i>
4	Holzprobe mit Myzel (Laboranzucht)	<i>Antrodia vaillantii</i>
5	Holzprobe mit Myzel (Laboranzucht)	<i>Serpula himantoides</i>
6	Myzel (Laboranzucht)	<i>Serpula lacrymans</i>

Tab. 3: Ergebnisse des Ringversuchs zum Nachweis des Echten Hausschwamms (*Serpula lacrymans*), nicht korrekte Befunde grün unterlegt

Labor-Nr.	Probe 1 <i>S. lacrymans</i>	Probe 2 <i>S. himantioides</i>	Probe 3 <i>O. placenta</i>	Probe 4 <i>A. vaillantii</i>	Probe 5 <i>S. himantioides</i>	Probe 6 <i>S. lacrymans</i>	Bewertung*
1	positiv	negativ	positiv	negativ	negativ	positiv	2
2	kein Befund	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	2
3	positiv	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	2
4	positiv	positiv	positiv	negativ	negativ	positiv	3
5	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	5**
6	positiv	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	1
7	positiv	negativ	positiv	negativ	negativ	positiv	2
8	keine Befunde geliefert						5
Mykolabor Dresden	positiv	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	Referenzlabor

* Die Bewertung der Labore erfolgte nach folgendem Schema:

Note 1: kein Fehler, Note 2: 1 Fehler, Note 3: 2 Fehler, Note 4: 3 Fehler, Note 5: mehr als 3 Fehler

** Bei diesem Labor wurde in allen Proben *Serpula himantioides* nachgewiesen. Die Gesamtbefunde lassen darauf schließen, dass keine gültige Positivkontrolle für den *S.-lacrymans*-Nachweis vorlag.

oder in der Diagnostik erfahrungsgemäß problematischen Pilzarten gewonnen (Proben 2 bis 5). Im Ergebnis lieferte ein Labor trotz zweimonatiger Fristüberschreitung keine Befunde, so dass von 7 Fremdlabors gültige Auswertungen sowie die eigenen Befunde vorlagen (Tab. 3).

Nur ein Labor hatte alle 6 Proben richtig bestimmt, vier Labore identifizierten 5 von 6 Proben korrekt, eines 4 von 6. Bei Labor Nr. 5 funktionierte die *S.-lacrymans*-Nachweisreaktion überhaupt nicht, was jedoch aus der Ergebnistabelle nicht hervorgeht. In der Gesamtheit wurden vor allem falsch-positive

Befunde generiert; seltener wurde der Echte Hausschwamm in der Probe nicht erkannt. Alle Labore erhielten die anonymisierten Gesamtergebnisse sowie ihre eigene Bewertung und können auf dieser Basis ihre eigenen Methoden und Assays optimieren sowie die Befunde für die Validierung ihrer Hausverfahren verwenden bzw. im Rahmen der Akkreditierung als Validierungsnachweis nutzen. Es ist geplant, künftig jährlich einen vergleichbaren Ringversuch anzubieten und damit einen Beitrag zur Qualitätssicherung und -verbesserung bei den Diagnostikern zu leisten.