

## **Forschung - BgVV-finanziertes Projekt für Nachwuchswissenschaftler**

### **Qualitativer und quantitativer Schnelldachweis vom Lebensmittel stammender Erreger mittels Realtime-PCR und Typisierung der Erreger mit der DNA-Chip-Technologie**

B. Malorny und R. Helmuth  
Nationales Referenzlabor für Salmonellen des BgVV

#### **Problemstellung**

Lebensmittelbedingte Infektionen und Durchfallerkrankungen stellen in Deutschland immer noch eine der wesentlichen Ursachen von Erkrankungen des Menschen dar. Nach Angaben des deutschen Referenzlabors für Zoonosen und des Pressedienstes des BgVVs (Hartung, 2001; BgVV Pressedienst, 2001) konnte in den letzten Jahren sogar eine steigende mikrobielle Belastung der Lebensmittel für Deutschland festgestellt werden. Die Überprüfung der Lebensmittelkette von der Herstellung bis zum Endverbraucher ist durch den weltweiten Handelsverkehr nur durch schnelle und zuverlässige Testsysteme zum Nachweis von Lebensmittelern zu gewährleisten. Die Erfassung u.a. charakteristischer Resistenz und- Pathogenitätsmerkmale der nachgewiesenen Erreger ist für die Überwachung der Ausbreitung bestimmter genetischer Determinanten und einer wissenschaftlichen Risikoabschätzung von großer Bedeutung. Bisher erfolgt der Nachweis traditionell durch die Kultivierung von Mikroorganismen in artifiziellen Medien, gefolgt von biochemischen und serologischen Identifikationen, die einige Tage bis Wochen dauern können. Eine wirkliche Alternative bietet die Technik der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zum Nachweis von Mikroorganismen in Lebensmitteln und anderen Matrices. Schnelligkeit, Spezifität, Sensitivität und Automatisierung der Technik sind die wichtigsten Eigenschaften der PCR. Trotz des enormen diagnostischen Potentials der PCR ist die routinemäßige Anwendung und Übertrag der Technik von Forschungslaboratorien zu diagnostische Routinelaboratorien problematisch. Dies liegt teilweise an technischen Problemen sowie dem Fehlen von internationalen Validierungen der entsprechenden PCR Methoden. Außerdem bestehen Defizite bei der Erstellung von einfachen, anerkannten Protokollen, sowie der Fortbildung des Laborpersonals.

#### **Zielstellung des Projektes/Methodik**

Das Projekt hat drei Ziele:

1. Mittels Realtime PCR soll jeweils ein qualitativer Nachweis für die zwei Erregergruppen *Salmonella* spp. und Verotoxin-bildende *E. coli* entwickelt und etabliert werden. Dies umfasst die Probenaufbereitung und die spezifische DNA Amplifizierung der Erreger. Die Amplifizierungsreaktion wird in der Real-time PCR durch den Anstieg eines Fluoreszenz-Farbstoffes, der an einer Hybridisierungssonde gekoppelt ist, kontrolliert. Der Anstieg der Fluoreszenz mit zunehmender Amplifikation wird durch eine optische Detektionseinheit registriert und ausgewertet.
2. Ein quantitativer Nachweis mittels Realtime PCR soll nach dem Stand der Technik an bestimmten biologischen Proben entwickelt werden. Hier bieten sich als ein Lebensmittel Hackfleisch, aber auch im Bereich der Tiergesundheit Kotproben an. Für die Quantifizierung von DNA wird die Kinetik der Amplifikationsreaktion ausgenutzt, um eine Standard-

kurve zu erzeugen. Anhand dieser Standardkurve können schließlich unbekannte DNA Mengen und somit die Bakterienzahl ermittelt werden.

3. Es soll ein DNA Chip entwickelt werden, der wichtige genetische Determinanten der gram-negativen Erregergruppen wie *Salmonella* und *Escherichia coli* trägt und zur Typisierung einzelner Isolate der Erregergruppen einsetzbar ist. Die DNA Chip Technologie ist eine relativ junge Methode in der Molekularbiologie und stellt eine Lösung zum gleichzeitigen Screening von molekularbiologischen Eigenschaften eines Stammes in einem einzelnen Assay dar. Bei der Technik werden spezifische Sonden (kurze einsträngige DNA Abschnitte) 100-100.000 fach auf eine Silica-Oberfläche gedruckt und kovalent dort gebunden. Bietet man nun diesen Sonden extrahierte DNA eines Stammes an, so binden komplementäre DNA Stränge an komplementäre Sonden. Nicht gebundene DNA wird gewaschen und die Hybridisierungskomplexe durch einen an der DNA gebundenen Fluoreszenzfarbstoff über eine optische Einheit detektiert. Sie wird als leuchtender Spot abgebildet. Es ist vorgesehen, die Technik zur Herstellung, die Hybridisierungstechniken und die Analyse solcher DNA-Chips am BgVV zu etablieren.

### **Vorgesehene Umsetzung**

Das Nationale Referenzlabor für Salmonellen am BgVV leitet die Erarbeitung eines PCR Nachweissystems für Salmonellen im Europäischen Forschungsprojekt mit dem Acronym FOOD-PCR (<http://www.pcr.dk>), das seit zwei Jahren die Validierung und Standardisierung des Nachweises von fünf wichtigen zoonotischen Lebensmittelerregern (*Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes* und *Yersinia enterocolitica*) mittels PCR anstrebt. Diese validierten und standardisierten PCR Nachweissysteme dienen als Grundlage für die Entwicklung eines qualitativen und quantitativen Nachweissystems mittels der Real-time PCR. Es wird ein neues Projekt im sechsten Rahmenprogramm der EU angestrebt, dass PCR Nachweissysteme mittels der Real-time PCR weiterentwickelt. Eine Typisierung von *Salmonella* Isolaten wird mittels der DNA Chip-Technologie unter Federführung des Nationalen Referenzlabors für Salmonellen entwickelt und validiert werden. Durch die Europäische Entwicklung eines solchen DNA-Chips wird das BgVV in die Lage versetzt, eine wichtige Position bei der Risikobewertung von pathogenen Keimen durch Anwendung der DNA Chiptechnologie einnehmen zu können.

### **Veröffentlichungen zum Thema des Vortrages**

B. Malorny and R. Helmuth (2002). Detection of *Salmonella* ssp. In: PCR Detection of Microbial Pathogens. Herausgeber K. Sachse, J. Frey. Humana Press (im Druck).

B. Malorny, P.T. Tassios, P. Radström, N. Cook, M. Wagner, and J. Hoorfar (2002). Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *Int.J.Food Microbiol.* (im Druck).

B. Malorny, C. Bunge, J. Hoorfar, and Reiner Helmuth (2002). Multi-center validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: Towards an international standard. Eingereicht bei: *Applied and Environmental Microbiology*