

Einleitung

Neben den bestens eingeführten klassischen kulturellen Methoden der Lebensmittelmikrobiologie kann in den Untersuchungseinrichtungen der amtlichen Lebensmittelüberwachung, der Lebensmittelwirtschaft und der Universitäten nicht mehr auf molekularbiologische Methoden und auch sogenannte Schnellmethoden, zu denen einige molekularbiologische Arbeitsansätze ebenfalls zählen, verzichtet werden. Dabei ist gerade in letzter Zeit die technische Entwicklung schnell vorangeschritten. Das Symposium "Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelmikrobiologie" im Bundesinstitut für Risikobewertung soll einen Überblick über die aktuellen molekularbiologischen Methoden bieten. Es richtet sich in erster Linie an die Anwender im Untersuchungsamt, in der Universität oder in Behörden, die mit Fragen der mikrobiologischen Lebensmittelsicherheit befaßt sind. Ziel ist daher, neuere Entwicklungen kritisch zu beleuchten und auch die Grenzen und sinnvollen Anwendungsgebiete aufzuzeigen.

Molekularbiologische Methoden dienen dem Anwender zum einen zur Identifizierung und zum anderen zur Feintypisierung und -differenzierung von Mikroorganismen. Einerseits wird die sichere Identifizierung einer Spezies, eines Genus oder von bestimmten Genmarkern, andererseits die Bestimmung der Ähnlichkeit oder der Verwandtschaft von Stämmen einer Spezies, z.B. für epidemiologische Fragestellungen, angestrebt. Dies ist wichtig sowohl für Lebensmittelinfektions- und -intoxikationserreger als auch für technologisch genutzte Bakterien, wie Starterkulturen oder Probiotika. Es sollen die wichtigsten Anwendungsgebiete und die dafür geeigneten Methoden vorgestellt werden. Hierbei sind Fragen wie die Zielstellung der Untersuchung, der erforderliche Diskriminierungsgrad, Kosten-Nutzen-Analyse und natürlich auch die Praktikabilität im Labor zu berücksichtigen. Eine wichtige Voraussetzung für die Anwendung in amtlichen Laboratorien ist die Normierung und Validierung der Methoden. Hierzu wird der Stand auf nationaler und internationaler Ebene wiedergegeben (DIN, CEN, Food-PCR). Es soll zudem Einblick gegeben werden, welche Methoden in den Nationalen Referenzlaboratorien bzw. -zentren angewendet und entwickelt werden. Dazu stellen Vertreter der Referenzlaboratorien Arbeitsergebnisse vor. Die Langfassung der Vorträge wird in einem Sonderheft der "Berliner Münchner Tierärztlichen Wochenschrift" veröffentlicht.

Günter Klein

Edda Bartelt

Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, im Februar 2003

Anwendung molekularbiologischer Methoden in der Lebensmittelmikrobiologie

Günter Klein

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin, Deutschland

Ziel molekularbiologischer Arbeitsmethoden in der Lebensmittelmikrobiologie ist einerseits die Identifizierung eines Mikroorganismus, d.h. die Zuordnung eines unbekanntem Mikroorganismus zu einem bekannten Taxon auf Spezies- bzw. Subspeziesebene (z.B. Nachweis pathogener Erreger oder Qualitätskontrolle von Probiotika). Spezifische Methoden sind auch zur Stammidentifizierung geeignet. Zur Identifizierung gehören auch Methoden zum Nachweis bestimmter Virulenzgene oder Resistenzmarker, die Vertreter einer Spezies z.B. eindeutig als Pathogene kennzeichnen (z.B. EHEC vs. VTEC). Die molekularbiologische Typisierung oder Feindifferenzierung zielt dagegen auf eine Unterscheidung auf Stammebene ab und wird u.a. zu epidemiologischen Fragestellungen (z.B. Aufklärung von lebensmittel-bedingten Ausbrüchen, Verfolgung von Kontaminationswegen vom Bestand über die Schlachtung zum Verbraucher) sowie ebenfalls für die Qualitätskontrolle probiotisch wirksamer Bakterien eingesetzt, die stammspezifische Eigenschaften haben.

Molekularbiologische Methoden erfassen die Struktur von Mikroorganismen auf molekularer Ebenen, d. h. in der Zusammensetzung ihrer Zellbestandteile auf der Ebene der Moleküle. Zunächst kann man die phänotypischen Eigenschaften eines Mikroorganismus von seinen genotypischen unterscheiden. Zu den ersteren gehören auf molekularer Ebene z.B. die Analyse der Zellwandzusammensetzung als Identifizierungsmethode, die Fettsäureanalyse sowie die Darstellung der löslichen Zellproteine zur Typisierung. Molekularbiologische Methoden im engeren Sinne sind genotypische Ansätze, angefangen mit der Plasmidanalyse bis hin zur Analyse der genomischen Nukleinsäuren. Identifizierungsmethoden machen sich die PCR und Gensondentechnik oder ihre Abwandlungen zu nutze. Zu den genotypischen Differenzierungs- oder Fingerprint-Methoden gehören als häufig angewendete Methoden die REA (*Restriktionsenzymanalyse*), PFGE (*Pulsfeldgelelektrophorese*), die RAPD-PCR (*Random Amplified Polymorphic DNA*) bzw. AP-PCR (*Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction*), die AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), das Ribotyping und deren Abwandlungen. Sie können sich entweder auf das gesamte Genom oder nur auf bestimmte Genabschnitte beziehen. Neuere, für die Lebensmittelmikrobiologie erst noch anzupassende Entwicklungen sind DNA-Microarrays.

Es empfiehlt sich je nach Fragestellung ein mehrstufiges Vorgehen, da oftmals auch die klassischen Methoden (z.B. biochemische und physiologische Charakteristika oder Serotypisierung) ausreichend sind. Die zur Verfügung stehenden molekularbiologischen Methoden sollten abhängig vom Ziel (Identifizierung, Typisierung) und vom Zielorganismus eingesetzt werden. Für probiotische Milchsäurebakterien eignen sich z.B. je nach Genus für die Identifizierung die Zellwandanalyse und PCR-Techniken, zur Differenzierung Proteinfingerprinting, PFGE oder RAPD-PCR. Die Methoden unterscheiden sich dabei erheblich im Arbeits- und Personalaufwand, im Diskriminierungsgrad und in der Reproduzierbarkeit innerhalb und zwischen Laboratorien. Dies ist bei der Wahl der Methode zu berücksichtigen.

Standardisierung von molekularbiologischen Nachweisverfahren auf nationaler und internationaler Ebene

Kornelia Berghof-Jäger und Andrea Tauschmann

BIOTECON Diagnostics GmbH, Potsdam, Deutschland

Das Prinzip eines molekularbiologischen Nachweises im Gegensatz zu konventionellen Nachweisverfahren liegt in der Detektion der DNA bzw. RNA und nicht der Zelle selbst. In der Lebensmittelindustrie werden bereits molekularbiologische Verfahren für den Nachweis von gentechnisch veränderten Organismen (GVO) und pathogenen Mikroorganismen sowie für die Tierartendifferenzierung eingesetzt. Besonders interessant ist der Einsatz des molekularbiologischen Nachweises für Parameter, für die kein kultureller Nachweis möglich ist, z.B. Viren, für schwer kultivierbare Mikroorganismen, wie *Campylobacter*, und für Mikroorganismen, bei denen auf kulturellem Weg pathogene von nicht-pathogenen schlecht bzw. nicht unterscheidbar sind. Das heißt, dass molekularbiologische Nachweisverfahren an den Stellen Einsatz finden, wo bisherige Techniken unzulänglich oder zu langwierig sind. Zudem zeichnen sich diese Methoden durch eine sehr hohe Spezifität und Schnelligkeit aus. Die Standardisierung von molekularbiologischen Verfahren erhöht die Akzeptanz von solchen Verfahren und leistet somit einen großen Beitrag zur Lebensmittelsicherheit. Eine bedeutende Rolle kommt der Polymerase Kettenreaktion (PCR) zu.

Eine Methode muss jedoch bestimmte Voraussetzungen erfüllen, um als Standard akzeptiert zu werden. Die komplette Methode muss vollständig beschrieben sein. Die Einsatzstoffe sowie die dafür notwendigen Geräte müssen alle kommerziell erhältlich sein. Des Weiteren muss die Methode entwickelt und geprüft sein, sie muss nachweislich robust und für jedes Labor anwendbar sein. Falls es bereits einen Standard gibt, muss die Methode mindestens so gut sein, wie der bisherige Standard.

Die Probleme bei der Standardisierung von molekularbiologischen Verfahren entstehen häufig durch patentrechtliche Unsicherheiten insbesondere in Bezug auf das PCR Patent. Ein weiteres Problem bei der Standardisierung stellen die verschiedenen Technologieplattformen dar. Es kommen stets neue Technologieplattformen für die Detektion auf den Markt (Gel, Southern Blot, PCR-ELISA, real time PCR, Arrays). Aus der Sicht der Standardisierung soll die Methode einerseits exakt beschrieben sein, andererseits sich aber nicht auf eine einzige Technik festlegen. Hier müssen im Rahmen der Standardisierung Wege gefunden werden, einerseits dem Anwender des beschriebenen Verfahrens eine exakte Arbeitsanleitung vorzugeben, andererseits den unterschiedlichen Technologie-Innovationen gerecht zu werden. Eine weitere Schwierigkeit entsteht durch die zum Teil große Anzahl von relevanten DNA/RNA Sequenzen, die für die Detektion eines bestimmten pathogenen Organismus in Frage kommen. Es müssen daher Kriterien erarbeitet werden, nach denen die Auswahl der verwendeten Genregion erfolgt. Der Vergleich der Validierungsdaten ist nicht immer übereinstimmend, da der „Goldstandard“, d.h. der Standard, an dem sich die neue Methode messen muss, z.T. schlechter ist, als die PCR. Da die Methoden zum Teil noch sehr neu sind, werden sie noch nicht über einen langen Zeitraum in der Routine genutzt. Die Interpretation solcher Ergebnisse kann daher regen Diskussionsbedarf auslösen.

Aufgrund der heute noch nicht sehr verbreiteten Nutzung von molekularbiologischen Methoden in der Routineuntersuchung und dadurch zum Teil nicht vorhandenen Erfahrung mit der Technik werden zur Untermauerung der Ergebnisse zahlreiche Kontrollen vorgeschrieben. Für die Standardisierung der molekularbiologischen Methoden auf nationaler Ebene ist das Deutsche Institut für Normung (DIN) in Zusammenarbeit mit Nachfolgeinstitutionen des Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) verantwortlich. Auf internationaler Ebene übernehmen das

Europäische Komitee für Standardisierung (CEN) und die International Organisation für Standardisierung (ISO) diese Aufgabe.

Eine molekularbiologische Methodenkaskade zum Nachweis, zur spezifischen Isolierung und Charakterisierung von STEC aus unterschiedlichen Habitaten

Peter Gallien

Bundesinstitut für Risikobewertung, Dessau, Deutschland

Es wird der Ablaufplan einer molekularbiologischen Methodenkaskade für den Nachweis, die Isolierung und die Charakterisierung von STEC in / aus verschiedenen Habitaten, wie Lebensmittel (Rohmilch, rohes oder unzureichend gegartes Fleisch, Rohwurst, Weichkäse), Abwasser, Stuhl und Kot dargestellt. Die Gesamtmethodik beinhaltet folgende Teilschritte:

Probenahme, Voranreicherung / Anreicherung, Probenaufarbeitung, Screening-PCR, DNA-Hybridisierung zur spezifischen STEC -Isolierung, Bestätigung als STEC mittels PCR, Charakterisierung der Isolate (Bestimmung und Subtypisierung von Virulenzmarkern mittels PCR), Klonalitätsuntersuchungen (PFGE, DANN - Sequenzierung).

Zur Absicherung von Ergebnissen im Rahmen der Screening -PCR werden Möglichkeiten der Amplifikationskontrolle aufgezeigt. Hierzu werden Ergebnisse von Versuchen mit zusätzlich einzubringender DNA mit identischen bzw. nicht identischen Primerbindungsstellen vorgestellt.

Des Weiteren wurden Ergebnisse zur Subtypisierung der *stx*-Gene in Isolaten aus Lebensmitteln und Beziehungen zu anderen Virulenzfaktoren dargelegt. Hierbei wurde festgestellt, dass *stx2e* nicht in Isolaten aus Milch, sondern nur aus Fleisch und Wurst gefunden wurde. Außerdem haben *stx2e* - und *stx2d* – tragende STEC keinen nachweisbaren LEE und auch ein deutlich gesenktes Vorkommen anderer Faktoren mit Ausnahme des EHEC-*hly*.

Ein Ringversuch zur Überprüfung der Spezifität der PCR-Methoden zur Subtypisierung der *stx*-Gene wurde vom NRL-Ec anhand von 18 (zunächst kodierten) Isolaten zwischen der Würzburger Arbeitsgruppe, der Gießener Arbeitsgruppe und dem NRL-Ec organisiert. Es ergab sich eine 100%-ige Übereinstimmung .

Ein Methodenentwurf zum Nachweis, zur Isolierung und zur Charakterisierung von STEC mittels PCR und DNA-Hybridisierungstechnik in Hackfleisch wurde federführend vom NRL-Ec erarbeitet, in der Arbeitsgruppe 'Molekularbiologische Methoden-Mikrobiologie' diskutiert und akzeptiert. Die Ergebnisse eines bundesweiten Ringversuches führten zur Aufnahme der Methodenkaskade in die amtliche Methodensammlung nach §35 LMBG.

***Escherichia coli* O157-PCR: Entwicklung und Anwendung im Rahmen des EU-Projektes „Food-PCR“ für gesundheitlich bedenkliche Mikroorganismen in Lebensmitteln**

Michael Bülte, Amir Abdulmawjood und Stefanie Roth

Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland

Im Rahmen eines EU-Verbundprojektes unter Beteiligung von 34 Laboren in 21 Ländern sollten PCR-Verfahren zur Erfassung von gesundheitlich bedenklichen Mikroorganismen in Lebensmitteln entwickelt und standardisiert werden. Dabei handelt es sich um Salmonellen, *Campylobacter* ssp., *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* und *E. coli* O157. Am Beispiel von *E.coli* soll das einheitlich für alle aufgeführten Mikroorganismen etablierte Verfahrensprocedere dargestellt werden.

In einer ersten Phase wurden anhand von positiven und negativen Kontrollstämmen bereits publizierte PCR-Verfahren geprüft und mit einer selbstentwickelten PCR-Methode verglichen. Die dabei verwendeten Primer Gi O157 I/II, auf Basis des *rfbE*-Gens, erwiesen sich als überlegen und wurden für die weiteren Untersuchungen eingesetzt. In einer zweiten Phase wurden interne Kontrollen entwickelt, die in jedem PCR-Ansatz mitgeführt werden. In einem nationalen und einem sich anschließendem internationalen Ringversuch konnte für diese O157-PCR eine jeweils 100%ige Sensitivität und Spezifität ermittelt werden. In einem derzeit noch laufenden internationalen Ringversuch wird die Robustheit dieser PCR an Spülproben von Schlachttierkörperoberflächen evaluiert. Erste Ergebnisse belegen die Zuverlässigkeit der O157-PCR, auch für nativ mit *E.coli* O157 kontaminierte Proben.

Es ist zu erwarten, daß, basierend auf den bisherigen Ergebnissen, eine zuverlässige PCR angeboten werden kann, die auch im Rahmen der Routinediagnostik Anwendung finden wird.

Identifizierung von Milchsäurebakterien in komplexen Mikrofloren

Christian Hertel

Institut für Lebensmitteltechnologie, Universität Hohenheim, Stuttgart, Deutschland

Die Identifizierung von Milchsäurebakterien in komplexen Mikrofloren mit Hilfe kulturtechnischer Methoden in Kombination mit pheno- und genotypischen Identifizierungstechniken ist arbeitsintensiv und zeitaufwendig. Neue molekularbiologische Methoden ermöglichen eine schnelle und insbesondere kulturunabhängige Charakterisierung solcher Floren. Die denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE) von PCR-Amplifikaten der 16S rRNA Gene hat sich zur Charakterisierung von komplexen Floren wie z.B. Fermentationsfloren bewährt. Die bakterielle DNA des Substrates wird isoliert und ein Teilbereich der rDNA mit variablen Regionen amplifiziert. Das Gemisch aus rDNA-Fragmenten wird im Polyacrylamidgel mit denaturierendem Gradient sequenzabhängig getrennt und somit ein Fingerabdruck der Zusammensetzung der Flora erzeugt. Ein Beispiel für die Anwendbarkeit der Methode stellen unsere Untersuchungen der Sauerteigfloren dar. In Sauerteigfermentationen sind neben Hefen die Milchsäurebakterien die vorherrschenden Fermentationsorganismen. Wir haben die PCR-DGGE eingesetzt, um die Dynamik der Fermentationsflora im Fermentationsprozess von der Zugabe des Starters bis zur Etablierung einer stabilen Flora unter unterschiedlichen ökologischen Bedingungen zu untersuchen. Mit spezifischen Primern wurden ein 185 bp 16S rDNA-Fragment der Bakterien der Gattungen *Lactobacillus*, *Weissella*, *Pediococcus* und *Leuconostoc* amplifiziert. Nach der DGGE erfolgte die Identifizierung der Spezies durch Vergleich mit einer Identifizierungsleiter oder durch Sequenzvergleich. Trotz der Vielzahl an verschiedenen Milchsäurebakterien im Starter erwiesen sich nur wenige Spezies, ausschließlich der Gattung *Lactobacillus*, unter den gegebenen ökologischen Bedingungen als wettbewerbstark. Da die PCR-DGGE nur den Nachweis von 90-99% der Spezies einer Flora ermöglicht, handelte es sich hier um die dominierenden Spezies in Sauerteigen. Alle durch PCR-DGGE identifizierten Spezies wurden auch durch kulturtechnische Untersuchung der Sauerteige als dominierend nachgewiesen. Es können aber auch Limitierungen durch einen PCR-Bias auftreten. So konnte in unseren Untersuchungen *L. fermentum* zwar kulturtechnisch, aber nicht mittels PCR-DGGE nachgewiesen werden. Die PCR-DGGE mit den gruppenspezifischen Primern ist insbesondere für die Charakterisierung von komplexen Mikrofloren geeignet, in denen die Milchsäurebakterien nicht zu den dominierenden Bakterien gehören, z.B. Intestinaltrakt des Menschen.

Für die Identifizierung von Milchsäurebakterien auf Stammebene ist eine Vielzahl von Typisierungstechniken verfügbar. Eine eindeutige Identifizierung kann insbesondere bei komplexen Mikrofloren die Anwendung mehrerer Techniken erfordern, so dass sich der Stammnachweis aufwendig gestaltet. Wir haben für den Nachweis von *Lactobacillus paracasei* LTH 2579 ein spezifisches PCR-System entwickelt. Durch Anwendung der Subtraktionshybridisierung konnte ein stammspezifisches, chromosomales DNA-Fragment von 235 bp Länge isoliert werden. Dieses Fragment hybridisierte nicht mit dem Genom von fünf weiteren Stämmen der Spezies *L. paracasei*. Basierend auf dieser Zielsequenz wurde ein spezifisches PCR-System aufgebaut und mit einem spezifischen PCR-System für *L. paracasei* kombiniert. Mit Hilfe dieses kombinierten Nachweissystems konnte *L. paracasei* LTH 2579, der mit dem Starter zu dem Fleischbrät gegeben wurde, in der Fermentationsflora der Rohwurst identifiziert werden. Nach Verzehr der Rohwurst wurde der Stamm in Fäzes von Probanden eindeutig nachgewiesen, wobei die vorkommende Keimzahl von Mensch zu Mensch stark schwankte.

Molekularbiologischer Nachweis der Chinolonresistenz bei *Campylobacter jejuni* am Beispiel der SSCP-PCR

Lutz Beckmann, Monika Müller, Petra Luber, Christina Schrader, Edda Bartelt, Günter Klein

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin, Deutschland

Seit etwa zehn Jahren wird ein Anstieg der Resistenzen bei von Tieren stammenden *Campylobacter* gegenüber Fluorchinolonen beobachtet. Obwohl der Einsatz von Fluorchinolonen in der Veterinärmedizin nur etwa 1% der bei Tieren eingesetzten Substanzen ausmacht, wird von Resistenzraten von ca. 11-40%, insbesondere bei Geflügelprodukten, berichtet. Bei *Campylobacter* spielen bei der Chinolonresistenz hauptsächlich Punktmutationen in Genen eine Rolle, die für die DNA-Replikation wichtig sind (*gyrA* und *parC*).

Unterschiedliche Methoden zur molekularbiologischen Charakterisierung der Chinolonresistenz bei *Campylobacter jejuni* wurden in den letzten Jahren entwickelt. Zum molekularen Nachweis der Chinolonresistenz sollte möglichst eine preisgünstige, schnelle, effektive und nicht nur im Materialaufwand einfache Methode zur Anwendung kommen. Diese Bedingungen erfüllte u.a. die Single-Strand-Conformation Polymorphism (SSCP) Analyse, bei der zwar nicht der Ort aber dafür das Vorhandensein von Punktmutationen in einem Polyacrylamidgel detektiert werden können.

Zum Nachweis der Chinolonresistenz bei *C. jejuni* wurde daher auf die Detektion der resistenzverursachenden Punktmutationen mittels SSCP zurückgegriffen. Die Genabschnitte mit potentiellen Punktmutationen wurden hierzu amplifiziert und nach Denaturierung der Amplifikate durch eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese das SSCP-Muster ermittelt. Die Amplifikate wurden zusätzlich sequenziert.

Bei der SSCP zeigten die PCR-Amplifikate der Genomabschnitte des *gyrA*-Gens sequenzabhängige Wanderungsgeschwindigkeiten, so dass anhand verschiedener SSCP-Muster auf unterschiedliche Sequenzen geschlossen werden konnte. Die Sequenzierung der entsprechenden PCR-Amplifikate ermöglichte eine genaue Ermittlung des Ortes und der Art der Sequenzunterschiede bzw. Punktmutationen. Die Zahl der SSCP-Muster war jedoch höher als die Zahl der Resistenzvarianten, da es auch sog. stumme Mutationen ohne Auswirkungen auf die Resistenz gab.

Die SSCP-PCR ermöglicht somit in einem ersten Schritt das Screening von resistenten *Campylobacter*-Stämmen auf kennzeichnende Punktmutationen und ermöglicht innerhalb eines Resistenzmonitorings das Erkennen neuer Resistenzvarianten. Zur Absicherung im Einzelfall muss aber stets auf die Sequenzierung zurückgegriffen werden. Ein phänotypisches Resistenzmonitoring kann durch ein genotypisches Monitoring nicht ersetzt werden, es kann allerdings Zusatzinformationen über die aktuellen Resistenzmechanismen liefern und zu einer mikrobiologischen Risikobewertung beitragen.

Multiplex-PCR im Rahmen eines Enterokokken-Monitoring Projektes

Kiem N. Mac, Heidi Wichmann-Schauer, Jan Peters, Christiane Dittmar-Gabor und Lüppo Ellerbroek

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin, Deutschland

Bei Enterokokken, einer der Haupterreger von nosokomialen Infektionen, wurden in den letzten Jahrzehnten ein Anstieg der Antibiotika-Resistenzen beobachtet. Als resistenzfördernde Faktoren wurde neben der Anwendung von Antibiotika in Kliniken auch der Einsatz von sogenannten Leistungsförderern in der Tiermast vermutet. Unter anderem wurde 1997 der Einsatz des Avoparcins, eines Glykopeptid-Antibiotikums, aufgrund seiner Resistenzförderung gegen das in der Humanmedizin angewandte Reserve-Antibiotikum Vancomycin europaweit verboten.

Im Rahmen eines Projektes wurden Vancomycin-resistente Enterokokken aus tierischem Material und Lebensmitteln isoliert. Es sollte festgestellt werden, ob es nach dem Avoparcinverbot zu einer Abnahme der Vancomycin-Resistenz gekommen ist.

Die mikrobiologische Identifikation von positiven Tupferproben benötigt in der Regel 4 bis 7 Tage, mit eventuellen Wiederholungen ist sogar mit 14 Tagen bis zur vollständigen Speziesdifferenzierung zu rechnen. Die PCR stellt hierfür eine zeit- und materialsparende Alternative dar. Eine Erweiterung der PCR ist die Multiplex-PCR, mit der ein Nachweis mehrerer Targetfragmente (hier Vancomycin-Resistenzgene, genus- und speziesspezifische Genfragmente) gleichzeitig durchgeführt wurde. Dazu wurden parallel zu den biochemischen Untersuchungen der Tupferproben 522 Enterokokken-Stämme mit unsicherer Genus- und Spezieszugehörigkeit mittels der genannten Multiplex-PCR untersucht.

Um alle möglichen PCR-Fragmente zu erfassen, war eine Optimierung der PCR-Parameter, wie z.B. Magnesiumchlorid-Konzentration, Annealing-Temperatur, Extensionzeit, Primerkonzentration und vor allem Primerkombination notwendig,.

Es stellte sich heraus, dass der Einsatz der genuspezifischen "Ent"-Primer eine inhibierende Wirkung auf die anderen Primer besaß. Die "Ent"-Primer jedoch verfügten über eine weitaus höhere Spezifität als die ebenfalls genuspezifischen "E1"-Primer.

Während alle Vancomycin-Resistenzgene mit den hierfür verfügbaren Primern eindeutig nachgewiesen werden konnten und die Ergebnisse durch phänotypische Tests (z.B. Sensititre, Etest) bestätigt wurden, führten die beiden *E. faecium*-spezifischen Primer "Efm" und "EM" zu falschen Aussagen. Die "EM"-Primer detektierten 17 Stämme als positiv, obwohl sie biochemisch als *E. avium*, *E. durans/hirae* oder *E. faecalis* bestimmt wurden. Die "Efm"-Primer hingegen erfassten 3 eindeutige *E. faecium*-Stämme nicht.

Bei schwierig einzuordnenden PCR-Ergebnissen sollte eine Wiederholung der gesamten PCR-Prozedur, angefangen bei der DNS-Isolation bis hin zur Durchführung von Einzel-PCR-Untersuchungen, vorgenommen werden.

Dennoch bleibt festzuhalten, dass die beschriebene Multiplex-PCR eine zeitsparende Alternative darstellt und z. B. für Monitoring-Projekte als geeignet erscheint.

Molekularbiologischer Nachweis lebensmittelrelevanter Viren am Beispiel von NLV and HAV in Muscheln

Christina Schrader und Jochen Süß

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin, Deutschland

Lebensmittel können durch verschiedenste Erreger, darunter auch Viren kontaminiert sein. Mit Ausnahme des FSME-Virus, das durch die Milch von durch Zecken infizierten Weidetieren übertragen werden kann, handelt es sich dabei um Erreger, die durch fäkale Verunreinigungen, den direkten Kontakt von Mensch zu Mensch bzw. über Aerosole übertragen werden. Die Infektionen verursachen Hepatitiden bzw. Gastroenteritiden. Zu den wesentlichsten Erregern zählen neben Hepatitis A- und den Norwalk like Viren (NLV) auch Rotaviren der Gruppe A, Astro-, Adeno-, Hepatitis E- und Coronaviren.

In der virologischen Diagnostik existieren für diese Erreger verschiedene Nachweisverfahren. Insbesondere molekularbiologische Methoden haben zunehmend an Bedeutung gewonnen. Sie sind sensitiv und schnell. Außerdem ist die Virusanzucht von NLV z.B. zur Zeit noch nicht möglich.

Eine einfache Übernahme dieser medizinisch-diagnostischen Methoden zum Nachweis von Lebensmittelinfektionen ist jedoch nicht möglich. Die Konzentration der Viren im Lebensmittel ist zumeist gering. Es erfolgt hier auch keine Virusvermehrung. Außerdem können zahlreiche Inhibitoren die PCR (Polymerasekettenreaktion) hemmen. Spezielle Methoden zur Virus- und Nukleinsäureextraktion aus Lebensmitteln für den nachfolgenden Nachweis mittels PCR werden entwickelt (z.B. Schwab et al. 2000). Auch an Methoden zum Ausschluß des Nachweises von inaktiviertem Virusmaterial in der PCR wird gearbeitet (Nuanualsuam und Cliver, 2002).

Obwohl es für die Untersuchung von mit Virus kontaminierten Muscheln noch keine einheitlichen Standards gibt, existieren doch bereits zahlreiche, sensitive Nachweismethoden. Untersuchungsstandards gibt es bisher nur für den Bakteriennachweis. Die Bakterien sind, mit Ausnahme der Salmonellen, jedoch nur Indikatororganismen. Die eigentliche Gesundheitsgefahr entsteht durch die Belastung mit Viren, insbesondere Hepatitis A und Norwalk like Viren.

Wir nutzen zur Untersuchung von Muscheln z.Z. folgende Methoden: Virusisolierung und RNA-Extraktion nach Kingsley und Richards (2001), RT-PCR zum Nachweis von Hepatitis A Virus nach Pina et al. (2001) bzw. Goswami et al. (2002) und von Norwalk like Viren (NLV) nach Schreier et al. (2000).

Literatur:

- Goswami, B.B. et al.: A polymerase chain reaction-based method for the detection of hepatitis A virus in produce and shellfish. *J Food Protect* 65 (2002) 393-402
- Kingsley, D. H., G. P. Richards: Rapid and efficient extraction method for reverse transcription-PCR detection of hepatitis A and norwalk-like viruses in shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 4152-4157
- Nuanualsuam, S., Cliver, D.O.: Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses. *J Virol Meth* 104 (2002) 217-225.
- Pina, S., Clemente-Casares, J. Jofre, R. Girones: Genetic analysis of hepatitis A virus strains recovered from the environment and from patients with acute hepatitis. *J. Gen. Virol.* 82 (2001) 2955-2963
- Schreier, E. et al.: Molecular epidemiology of outbreaks of gastroenteritis associated with small round structured viruses in Germany in 1997/98. *Arch. Virol.* 145 (2000) 443-453
- Schwab, K.J. et al.: Development of methods to detect „norwalk-like viruses“ (NLVs) and hepatitis A virus in delicatessen foods: Application to a food-borne NLV outbreak. *Appl. Environ. Microbiology* 66 (2000) 213-218).

Molekulare Typisierung von Pathogenen

Trudy M. Wassenaar

Molecular Microbiology and Genomics Consultants, Zotzenheim, Deutschland

Das Ziel der molekularen Typisierung von pathogenen Bakterien ist einerseits, Unterschiede zwischen bakteriellen Stämmen, die bedeutend für die Virulenz sind, zu erkennen, und andererseits Isolate, die auf den gleichen Stamm zurückzuführen sind, zu identifizieren und zu gruppieren.

Eng hiermit verbunden ist der Grad der Klonalität der Spezies. Wenn alle Zellen durch asexuelle Fortpflanzung entstehen, gleichen sie genetisch einander und der Urzelle: die Spezies ist klonal. Wenn aber DNA-Transfer stattfindet, ist die Klonalität zerstört. Manchmal, aber nicht immer, ist damit auch der Genotyp verändert. Dies kompliziert die Interpretation der Typisierungsergebnisse. Weiterhin können bei verschiedenen Bakterienarten genomische Rekombinationen zu 'neuen' Typen führen, die allerdings noch die gleiche genetische Information besitzen; nur die Reihenfolge bestimmter Gene kann verändert sein. Wiederum kann dies den Genotyp verändern, obwohl es sich hier epidemiologisch gesehen immer noch um den gleichen Stamm handeln kann.

Die Schwierigkeit, die diese evolutionäre Entwicklungen für die Interpretation der Typisierungsergebnisse mit sich bringen, wird diskutiert. Vor- und Nachteile verschiedener Typisierungsverfahren werden an Hand der MLST und der PFGE dargestellt.

Typisierung von *Clostridium perfringens* unter epidemiologischen Gesichtspunkten

Hartmut Eisgruber

Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs, Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland

Clostridium (C.) perfringens Typ A ist in den westlichen Industrienationen für eine der am häufigsten auftretenden Lebensmittelvergiftungen verantwortlich. Dabei sind nur ca. 5 % der Population dieses in der Umwelt ubiquitär verbreiteten anaeroben Sporenbildners in der Lage, ein für das Auslösen des Krankheitsgeschehens erforderliches Enterotoxin (CPE) zu bilden. Die verfügbaren epidemiologischen Daten weisen *C. perfringens* Typ A hinter den Salmonellosen bzw. Campylobacteriosen und *Staphylococcus aureus* - Intoxikationen als einen der am häufigsten vorkommenden bakteriellen Enteritis infectiosa - Erregern aus. Es ist daher außerordentlich wichtig, geeignete Typisierungsverfahren zur Verfügung zu haben, um Infektionsquellen und Übertragungswege des Erregers herausfinden zu können.

Im Zusammenhang mit der Aufklärung einer Lebensmittelvergiftung, die durch *C. perfringens* Typ A verursacht wurde, sind nach wie vor klassische, kulturtechnische Verfahren als diagnostisches Mittel gut geeignet. Unter Berücksichtigung des Vorberichts (Art des Lebensmittels bzw. der Speise, Verpflegungsform, Inkubationszeit und Symptomatik der Erkrankung) und Einbeziehung der HAUSCHILD'schen Postulate (z.B. Keimzahl von *C. perfringens* im Lebensmittel $> 10^6/g$) ist ein aktuelles Koloniezählverfahren nach DIN EN ISO 7937 (2002) mit Bestätigungsreaktionen für *C. perfringens* dann einsatzfähig, wenn das verdächtige Lebensmittel zur Untersuchung vorliegt. Dies wird in der Praxis fast immer der Fall sein.

Es wird abschließend über die Ergebnisse verschiedener Studien berichtet, wobei im Rahmen der hier vorliegenden Auswertung vier molekularbiologische Verfahren berücksichtigt werden. Zur Untersuchung gelangten sowohl das verdächtige Lebensmittel als auch Stuhlproben von an Durchfall erkrankten Personen. Insgesamt 35 *C. perfringens* - Stämme, 12 aus Lebensmitteln und 23 von Patienten, die das jeweilige Lebensmittel konsumiert hatten, wurden geprüft. Die Isolate stammten aus 10 verschiedenen, gut dokumentierten Ausbrüchen von Lebensmittelvergiftungen, die über einen Zeitraum von acht Jahren in Deutschland auftraten. Zur Auswertung kamen folgende Methoden: 1) Ribotypisierung (SCHALCH et al., 1997), 2) Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) mit *Sma*I als Makrorestriktionsenzym (KLEIN, 1999), 3) Plasmidmusteranalyse (EISGRUBER, 1997) und 4) Analyse der löslichen Zellproteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (KLEIN, 1999). Nach den Ergebnissen der durchgeführten Untersuchungen waren die Ribotypisierung und die PFGE am besten geeignet, epidemiologische Zusammenhänge von Lebensmittelvergiftungen, verursacht durch *C. perfringens*, aufzuklären.

Literaturverzeichnis:

DIN EN ISO 7937 (2002): Horizontales Verfahren zur Zählung von *Clostridium perfringens*, Koloniezählverfahren, Beuth Verlag Berlin

EISGRUBER, H. (1997): Die Plasmidmusteranalyse zur Stammdifferenzierung von *Clostridium perfringens* aus Lebensmitteln, Arch. Lebensmittelhyg. **48**, 10–13

KLEIN, G. (1999): Epidemiologische Untersuchung von *Clostridium perfringens* – Isolaten aus Lebensmittelvergiftungen durch Proteinfingerprinting und Pulsfeldgelelektrophorese, Arch. Lebensmittelhyg. **50**, 59–63

SCHALCH, B., J. BJÖRKROTH, H. EISGRUBER, H. KORKEALA und A. STOLLE (1997): Ribotyping for strain characterization of *Clostridium perfringens* isolates from food poisoning cases and outbreaks, Appl. Environm. Microbiol. **63**, 3992-3994

Anschrift des Verfassers: Prof. Dr. H. Eisgruber, Veterinärstr. 13, 80539 München, e-mail: Hartmut.Eisgruber@lmhyg.vetmed.uni-muenchen.de

Einsatz der AFLP-Analyse zur molekularbiologischen Feintypisierung von *Campylobacter* sp.

Thomas Alter und Karsten Fehlhaber

Institut für Lebensmittelhygiene, Universität Leipzig, Leipzig, Deutschland

In den letzten Jahren wurden verschiedene Methoden zur Typisierung von Prokaryonten und Eukaryonten auf DNA-Ebene entwickelt. Eine ideale Genotypisierungsmethode sollte eine hohe Reproduzierbarkeit auch zwischen verschiedenen Labors aufweisen, eindeutige Vergleichsanalysen gestatten und die Erstellung von Datenbanken ermöglichen (Savelkoul et al., 1999).

Eine der vielversprechendsten Methoden ist die ursprünglich zur Genotypisierung von Pflanzen entwickelte AFLP (amplified fragment length polymorphism)-Analyse, die sich durch eine hohe Diskriminierungsstärke und außerordentliche Reproduzierbarkeit auszeichnet und zur Klärung von taxonomischen und epidemiologischen Fragestellungen sowie zur Subtypisierung von Bakterienstämmen angewandt werden kann.

In jüngster Zeit erfolgte die Adaptation der Methode zur Typisierung diverser Bakterienarten (Aarts et al., 1998; Geornaras et al., 1999).

Bei dieser Methode wird die chromosomale DNA der zu untersuchenden Organismen mit Restriktionsendonukleasen verdaut, enzymespezifische Adapter werden ligiert und anschließend wird ein Teil der entstehenden DNA-Fragmente mit adapterspezifischen Primern amplifiziert. DNA-Polymorphismen der untersuchten Stämme, die innerhalb oder unmittelbar neben der Restriktionsenzym-Erkennungssequenz auftreten oder aufgrund von Insertionen und Deletionen entstehen, können erkannt und verglichen werden, wobei die gesamte chromosomale DNA berücksichtigt wird. Zudem benötigt man nur sehr geringe Mengen bakterieller DNA und keine Kenntnisse über die zu amplifizierenden DNA-Sequenzen.

Für die Darstellung taxonomischer und epidemiologischer Beziehungen und zur Typisierung von *Campylobacter* (C.)-Stämmen verschiedener Herkunft ist die AFLP-PCR in der Literatur beschrieben worden (Lindstedt et al., 2000; Moreno et al., 2002).

Die enge Verwandtschaft von *Campylobacter*-Isolaten konnte beim Vergleich von Geflügel- und Humanstämmen, die genetisch identisch sind und sich in einem Cluster gruppieren, mit der AFLP-Typisierung zuverlässig aufgezeigt.

In eigenen Arbeiten konnten mit Hilfe der AFLP das Stammspektrum von *C. coli* in Schweinebeständen, deren Eintragsquellen und Infektionszeitpunkte ermittelt werden (Gaulle et al., 2001) sowie Stammdiversitäten in Putenbeständen vor der Schlachtung und die schlachttechnologisch bedingte Einengung auf bestimmte Subtypen während der Schlachtung beschrieben werden (Alter et al., 2002).

Literatur

- Aarts, H.J., van Lith, L.A. und Keijer, J. (1998). High-resolution genotyping of Salmonella strains by AFLP-fingerprinting. *Lett. Appl Microbiol* 26, 131-135.
- Alter, T., Gaulle, F., Froeb, A. und Fehlhaber, K. (2002) Distribution of *Campylobacter jejuni*-strains on different stages of the poultry slaughter line-do only the fittest survive? Lillehammer, "Friends and Foes"-Food Micro 2002, 107-110.
- Gaulle, F., Alter, T. und Fehlhaber, K. (2001) Nachweis und Typisierung von *Campylobacter*-Spezies bei Schweinen und Vergleich mit Isolaten anderer Herkunft. Garmisch-Partenkirchen, DVG, 42. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes „Lebensmittelhygiene“. 126-131
- Geornaras, I., Kunene, N.F., von Holy, A. und Hastings, J.W. (1999). Amplified fragment length polymorphism fingerprinting of Pseudomonas strains from a poultry processing plant. *Appl Environ Microbiol* 65, 3828-3833.
- Lindstedt, B.A., Heir, E., Vardund, T., Melby, K.K. und Kapperud, G. (2000). Comparative fingerprinting analysis of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* strains by amplified-fragment length polymorphism genotyping. *J Clin. Microbiol* 38, 3379-3387.
- Moreno, Y., Ferrus, M.A., Vanoostende, A., Hernandez, M., Montes, R.M. und Hernandez, J. (2002). Comparison of 23S polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism and amplified fragment length polymorphism techniques as typing systems for thermophilic campylobacters. *FEMS Microbiol. Lett.* 211, 97-103.
- Savelkoul, P.H., Aarts, H.J., de Haas, J., Dijkshoorn, L., Duim, B., Otsen, M., Rademaker, J.L., Schouls, L. und

Lenstra, J.A. (1999). Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. *J Clin. Microbiol* 37, 3083-3091.

Genetischer Fingerabdruck (PFGE) von Bakterienisolaten für ihre epidemiologische Subdifferenzierung.

Helmut Tschäpe und Rita Prager

Robert Koch Institut, Nationales Referenzzentrum für Salmonellen u. andere Enteritiserreger, Wernigerode, Deutschland

Die Bestimmung der Makrorestriktionsmuster bakterieller Genome nach Pulsfeld-Gel-Elektrophorese gilt gegenwärtig (neben der Analyse der Mikrosatelliten) als *die* standardisierte genetische Fingerprintmethode, die epidemiologisch belastbare Indizien für Infektionsquellen und Infektionswege schafft. Dieses Verfahren (kurz als PFGE-Methode bezeichnet) ist praktisch für alle Erregerspezies anwendbar und wird in nationalen und internationalen Netzwerken (z.B. German Pulsenet, Pulsenet, Salmgene) zur epidemiologischen Überwachung angewendet. Voraussetzung dazu war die Einführung eines gemeinsamen Protokolls für eine schnelle (1-2 Tage) standardisierte und elektronisch überregional vergleichbare Generierung von Daten. Mit Hilfe der PFGE konnten in der Vergangenheit regionale Häufungen sowie internationale Ausbrüche epidemiologisch aufgeklärt und ein Langzeit-Surveillance der Erregerdynamik durchgeführt werden. Am Beispiel des internationalen Salmonellose-Ausbruchs durch kontaminierte Schokolade (bedingt durch *Salmonella enterica* serovar Oranienburg) des Jahres 2001 wird die Brauchbarkeit der PFGE Methode erläutert.

Zur Bedeutung der molekularen Charakterisierung von *Listeria monocytogenes* aus lebensmittelhygienischer Perspektive

Martin Wagner

Institut für Milchhygiene, Milchtechnologie und Lebensmittelwissenschaft, Veterinärmedizinische Universität, Wien, Österreich

Die Bedeutung von *Listeria monocytogenes* für die Lebensmittelhygiene scheint diametral zur Inzidenz des Auftretens der Krankheit in der Bevölkerung zu sein. Während die Inzidenz der Listeriose in Österreich um das etwa 800-fache niedriger als die Inzidenz der Salmonellose ist, behandeln einschlägige Verordnungen die Materie mit einer vergleichbaren Stringenz. Die Antwort für diese radikale Vorgehensweise bezüglich *L. monocytogenes* ist in den Infektionsfolgen begründet, die in vielen Fällen zu langer Hospitalisierung und nicht selten dem Tod des Betroffenen führen.

Aus lebensmittelhygienischer Sicht ist eine Charakterisierung der Gründe für das Auftreten der sporadischen wie auch der epidemischen Listeriose schwierig. Ursachen sind heterogene Krankheitscharakteristiken, eine lange, bis 90-tägigen Inkubationszeit, unklare Vorstellungen über die Exposition und minimale Infektionsdosis (MID) und die Fähigkeit von *L. monocytogenes* zur Adaption. Erkannt werden komplexe Ausbruchsmuster oft nur durch Typisieren aller verfügbaren Klone mittels molekularer Methoden, über deren Aussagekraft in Folge ausführlich berichtet wird.

Risikoanalytische Daten aus Österreich

In Österreich tritt die Humanlisteriose mit einer Krankheitsinzidenz von 0,10 bis 0,17 pro 100 000 Einwohnern auf. Im weltweiten Vergleich ist eine Inzidenz unter 0,4 als niedrig anzusehen. Epidemiologische Daten aus den USA sichern die Erkenntnis, dass 99% aller klinischen Fälle ein kontaminiertes Lebensmittel zur Ursache haben. Untersuchungen von Stuhlproben gesunder österreichischer Erwachsener ergaben, dass nur 0,8% von 505 Probanden kulturell verifizierbare Listerienausscheider waren. Diese Daten stehen in Gegensatz zum Faktum, dass viele Lebensmittel mit Listerien kontaminiert sind. Hauptquellen der menschlichen Exposition sind konsumfertige Milch-, Fisch- und Fleischprodukte. Aus der Perspektive des quantitativen Risk Assessments ist anzuführen, dass Listerien in den meisten Lebensmitteln, wenn, in Mengen <100 Kolonie bildender Einheiten (KBE)/ g oder ml nachweisbar sind. Eine solche Kontaminationsdosis ist nach oraler Aufnahme durch Menschen mit voller Immunfunktion in den allermeisten Fällen nicht ausreichend, die Krankheit auszulösen. Es ist aber zu betonen, dass Hazard Characterization – Studien davon ausgehen, dass auch im niedrigen Kontaminationsbereich ein Zusammenhang zwischen Dosis und Krankheitswahrscheinlichkeit gegeben ist und somit das Vorkommen eines einzigen *L. monocytogenes*-Keims eine, wenn auch sehr geringe, Wahrscheinlichkeit für eine Infektion birgt. Lebensmittel, in oder auf denen eine Vermehrung von Listerien möglich ist, sind aus der Sicht der Infektionsprävention als risikobehaftet anzusehen.

Molekulare Charakterisierung von *L. monocytogenes*

Die rasante Entwicklung des zur Verfügung stehenden Methodenspektrums führte dazu, dass die molekulare Lebensmittelmikrobiologie ergänzend neben der konventionellen Lebensmittelmikrobiologie steht. Die Bestimmung der klonalen Zugehörigkeit isolierter Vertreter einer Spezies kann auf Grund der Bestimmung von phänotypischen Merkmalen oder genotypischen Merkmalen vorgenommen werden. Von den phänotypischen Methoden wie der Serotypisierung, der Phagentypisierung oder der Multienzym-Elektrophorese wird heutzutage nur mehr die Serotypisierung angewandt, da sie gleichsam das Urmodell jeder Typisierung darstellt und betreffend *L. monocytogenes* erlaubt, die Isolate auf wenige Serovare zusammenzufassen. Genotypische Methoden können in solche unterschieden

werden, die auf der Polymerase Ketten Reaktion aufbauen oder auf DNA-Spaltung und nachfolgender Fragmentdetektion. Es werden Ergebnisse von Analysen der klonalen Struktur von *L. monocytogenes*-Populationen im Hinblick auf die Kontaminationsdynamik in lebensmittelerzeugenden Betrieben wie auch im Hinblick auf Forschung zum Thema Expositionsbewertung gebracht

Spezies-spezifische Identifizierung der Lebensmittelmikroflora durch einen molekularbiologischen Ansatz

Sabine Rölleke

Genalysis GmbH, Luckenwalde, Deutschland

Es wird ein automatisiertes molekularbiologisches Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen vorgestellt, mit dem im hohen Probendurchsatz unterschiedliche Lebensmittel untersucht werden können. Das Verfahren erlaubt die Erfassung aller in einer Probe vorkommenden Bakterien oder Pilze durch eine einzige Untersuchung.

Das Verfahren basiert auf der Untersuchung genetischer Markermoleküle, die eine phylogenetische Identifizierung von Mikroorganismen erlauben. In einem ersten Schritt wird das gesamte genetische Material aus der Probenmatrix extrahiert. Sodann werden definierte Genabschnitte vervielfältigt, die anschließend elektrophoretisch voneinander getrennt werden. Die Identifizierung der Mikroorganismen erfolgt über eine datenbankgestützte Auswertung der entstandenen Bandenmuster.

Neben der Darstellung der verwendeten Technologie werden deren Möglichkeiten und Grenzen erörtert. Zudem wird das Verfahren gegenüber anderen molekularbiologischen Ansätzen, wie beispielsweise der DNA-Chips, abgegrenzt und Vor- und Nachteile der jeweiligen Techniken diskutiert.

Im Unterschied zu anderen Verfahren, erlaubt das gegenständliche eine Identifizierung der Mikroorganismen ohne einschränkende Vorannahme über die Präsenz bestimmter Organismen. Während herkömmliche Verfahren die Frage beantworten, ob ein spezifischer Organismus, auf den der jeweilige Test abgestellt ist, in einer Probe vorhanden ist, ermöglicht dieses Verfahren die Beantwortung einer neuen Fragestellung: Welche Organismen sind in dieser Probe?

Das Verfahren wird in einen Anwendungszusammenhang gebracht für unterschiedliche Lebensmittelhersteller, wie beispielsweise Milchverarbeitungsunternehmen, Fruchtzubereitungshersteller, Schlacht- und Zerlegebetriebe, sowie der Fleischverarbeitung.

Schließlich wird dargelegt, wie sich die Untersuchungen in ein HACCP-Konzept der Lebensmittelhersteller und des Einzelhandels integrieren lässt, um einen eindeutigen Qualitätsbefund der jeweiligen Produktionscharge zu erhalten, bevor das Lebensmittel im Kaufhausregal ausliegt. Zukünftige Möglichkeiten der Lebensmittelanalyse mit diesem Verfahren in behördlichem Auftrag bei konkretem Kontaminationsverdacht werden ebenfalls angesprochen.

Lab-on-a-chip Technology: Applications of the Agilent 2100 Bioanalyzer

Götz Frommer

Agilent Technologies Deutschland GmbH, Berlin

The Agilent 2100 Bioanalyzer uses microfabrication technology for DNA, RNA, protein and cell investigations. The LabChip® was developed in co-operation with Caliper Technologies (Mountain View, Colorado, USA) and is the first commercial product. Filling the channels with an electrically conductive medium (buffer) creates a complex system, which can be controlled through voltage gradients or vacuum. These can be applied by means of strategically located electrodes and can effect the movement of fluids and analytes through selected channels. Proper balancing and/or sequencing of voltage inputs controls the speed and direction of this movement. Therefore, it is possible to create the functional equivalent of valves and pumps capable of performing manipulations such as reagent dispensing and mixing, incubation/reaction, and sample injection prior to analysis. In this way, multiple laboratory tasks can be integrated into a miniaturized system, which performs sample preparation, reactions, separation and detection in an automated manner.

Applications:

Separation, length and concentration determination of ds linear DNA

Integrity/Quality and quantity determination of total and messenger RNA

Separation, molecular weight and concentration determination of proteins

Cell assays (Apoptosis studies, GFP detection of transfection efficiency)

Typisierung von Salmonellen mittels Microarrays

Burkhard Malorny, Beatriz Guerra und Reiner Helmuth

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin, Deutschland

Mikroarrays (DNA-Chips) sind minaturisierte Träger, auf denen Nukleinsäure-Moleküle (Proben) wie Oligonukleotide oder PCR Produkte in hoher Anzahl und Dichte in definierter Mikroanordnung immobilisiert sind. Über eine Hybridisierung komplementärer DNA Abschnitte mit den immobilisierten Nukleinsäure-Sonden lassen sich Sequenzunterschiede der zu untersuchenden DNA nachweisen. Im Grunde handelt es sich dabei um die Reverse Dot Blot Technik, die konsequent weiterentwickelt wurde, und die es gestattet, hunderte, bis zu zehntausenden von Genen oder DNA Abschnitten gleichzeitig nachzuweisen. Der Einsatz der Technologie findet immer mehr Interesse in den verschiedensten Gebieten, wie der Diagnostik, Genom-Genom Interaktion, Umwelt- und Lebensmittelüberwachung, und Wirkstoffforschung.

Das NRL-Salm entwickelt zur Zeit einen Microarray, der zur Typisierung von *Salmonella* Isolaten dienen wird. Der Microarray wird zahlreiche Gene und Genvarianten (Abwesenheit/Anwesenheit) in *Salmonella* Stämmen identifizieren. Mehrere DNA Proben-Kategorien, wie Virulenzfaktoren, Antibiotika Resistenzen, O- und H-Antigene, Prophagen, Housekeeping Gene und andere molekulare Marker werden berücksichtigt. Hierdurch wird es in Zukunft basierend auf einem einzigen Test möglich sein, umfassend Informationen über ein Isolat zu gewinnen und diese im Rahmen einer nationalen und internationalen Datenbank auszutauschen. Damit wird ein vollkommen neues Herangehen an epidemiologische Fragestellungen und die Erregercharakterisierung ermöglicht. Das Konzept der Microarray Salmonella-Typisierung und erste Ergebnisse werden im Rahmen des Vortrages vorgestellt.

Bioinformatics in molecular biology : Solving or causing problems ?

Bruno Pot

Institut Pasteur de Lille ; Bactériologie des Ecosystèmes, Lille Cedex ; France
Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium

Since a few decades the need for efficient capture, storage and processing of biological information has increased. Not only have the techniques become more performing (e.g. sequence analysis), also the number of techniques that yield comparable information has exploded (typing techniques, micro-array analyses, automatic sequencers, etc...).

In the same time, computing - and storage power made available at democratic prices has increased quite rapidly as well. This has introduced data analysis potential in virtually any routine and research laboratory. So, why don't we all use this potential ?

Related to this expansion of techniques and automation, the problem of data exchange and compatibility has increased and the quality of the data processing has evolved accordingly. Also, some laboratories find it increasingly difficult to sufficiently train their staff in using these new technologies and data processing protocols in a reliably way. The most worrying evolution, however, is related to the increasing number of readily available algorithms that will yield at any time of analysis a grouping or evolutionary scheme. The reliability of the outcome is rarely questioned and becomes even more dangerous in the absence of proper control routines to evaluate the quality of the raw data used.

Sequences, as an example, are subjected to serious errors. Depending on the set of e.g. 16SrRNA sequences selected (or the part of it (!)), the software package used, or the tolerance accepted when judging the multiple alignment, it is possible to obtain a wealth of phylogenetic dendrograms. Interpretation of these dendrograms, moreover, relies mostly on the assumption that evolution happened by a route following the least possible mutations ! When the number of sequences is increasing to a few hundreds, most software packages and computers, even the most modern, will give up.

The question therefore should be asked if bioinformatics can really solve problems in molecular biology ? Despite the problems mentioned above, the answer is definitely YES !. In the presentation, attention will be paid to the tools that will help to improve your result : (i) be aware of the inherent limitations of specific algorithms (e.g. band matching versus curve matching ; UPGMA versus other methods, etc...), (ii) use accepted tools to evaluate data loss and data distortion (cophenetic correlation, bootstrapping, cluster violations, K-means partitioning, etc...), (iii) try validating, alternative methods for grouping or dendrogram construction (especially when dealing with highly similar datasets (dimensioning techniques) or with large and variable datasets (neural networks)), (iv) consider modified algorithms which will shorten calculation time (but may implement limitations to the reliability of the result), (v) be aware of problems related to standardisation of your data and (vi) study the congruence between different experiment types performed on a single set of strains to evaluate their reliability.

In conclusion it can be said that over the last decades bioinformatics has 'grown up' to a science on its own. Like we all need to know some chemistry or mathematics, some lab protocols and rules to perform optimally in our daily work, we will need to get sufficient training in bioinformatics to be able to use it with an acceptable level of performance. The fact that you decided to join this lecture shows that you are willing to pass your first exam. Good luck!