

Neue diagnostische Verfahren zum Nachweis von Erregern Lebensmittelbedingter Infektionen

Burkhard Malorny

Moderne Erregerdiagnostik: Der Wettlauf gegen die Zeit

Ziel:

Nachweis von bis zu einer Zelle eines pathogenen Keimes in 10 - 25 g Lebensmittel

Kultureller Nachweis:

- *Salmonella*: 4 bis 5 Tage (EN/ISO 6579:2002)
- *Campylobacter*: 5 bis 7 Tage (EN/ISO 10272-1)
- *Listeria*: 5 bis 6 Tage (EN/ISO 11290-1)
- Brucellen : bis zu 6 Wochen
- *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: 3-4 Monate

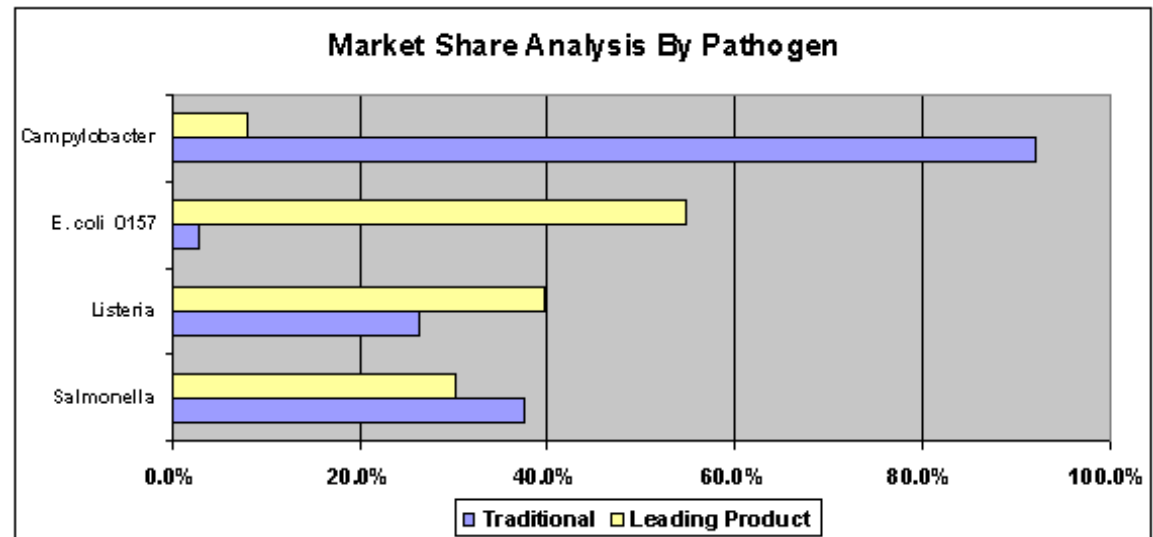


Der Markt für Lebensmittel-Mikrobiologische Testsysteme

- Der globale Markt für die Lebensmittelmikrobiologie (2005) umfasste ca. 625 Mio. Tests mit einem Marktwert von US \$ 1,65 Milliarden
- Bis 2010 wird ein Anstieg der Tests auf ca. 823 Mio. mit einem Marktwert von US \$ 2,4 Milliarden vorausgesagt
- Traditionelle Nachweise umfassten (2005) ca. 65% der Tests und Schnellverfahren 35% (220 Mio. Tests)
- Bis 2010 wird ein Marktanteil von 48% für Schnellverfahren vorausgesagt.

Daten aus Food Micro-2005,
Strategic Consulting, Inc.

<http://www.rapidmicrobiology.com/news/1269h3.php>



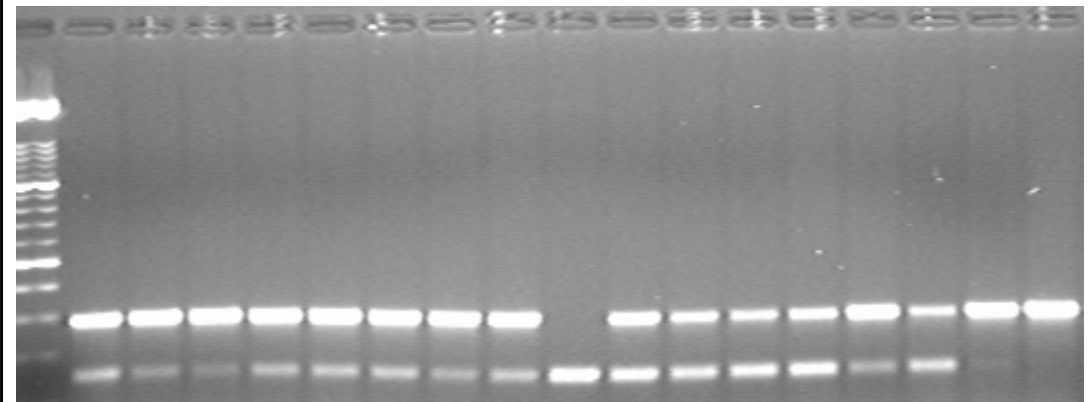
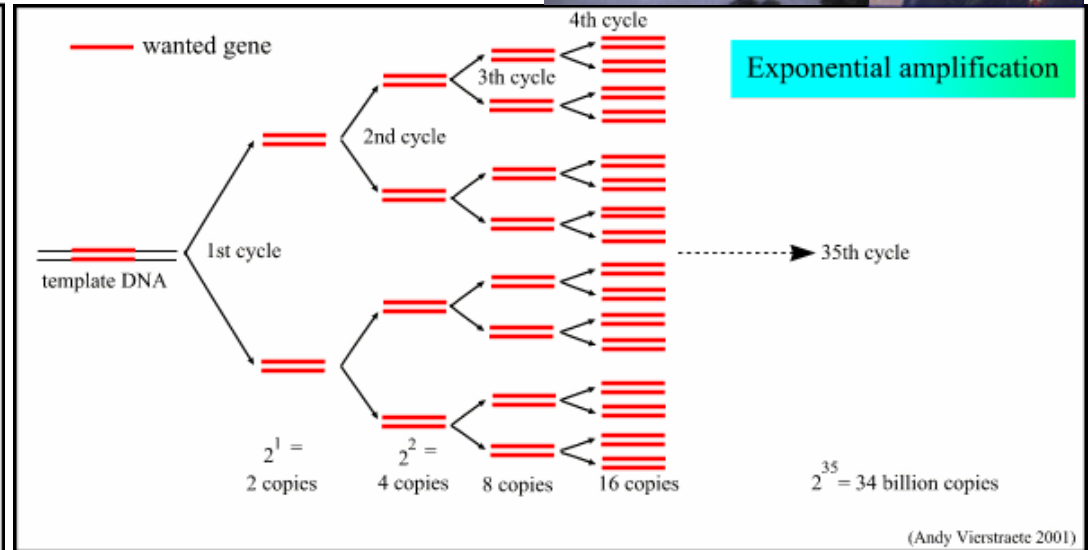
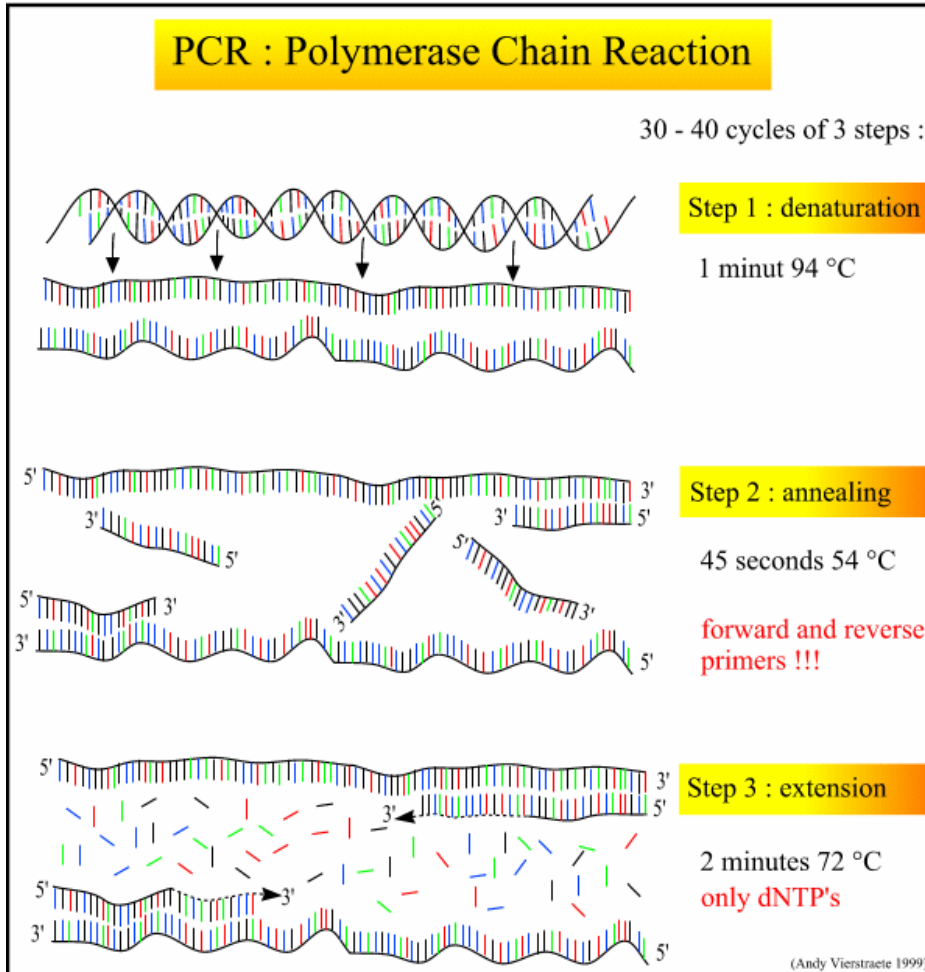
Verschiedene in den letzten Jahrzehnten entwickelte Nachweis-Technologien

Erstmals beschrieben

- Impedanz Verfahren (umgekehrter elektrischer Leitwert) 1936
- Immuno-basierte Nachweissysteme (ELISA) 1960
 - Enzym gebundene Fluoreszenzimmunoassay 1967
- Molekular-basierte Nachweissysteme
 - Sondentechnologien (Hybridisierungen, FISH) 1969/1975/1986
 - Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 1987

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Karry Mullis



Prinzip der PCR

Amplifikation und Sichtbarmachung des PCR Produktes

Diagnostische Polymerase-Kettenreaktion

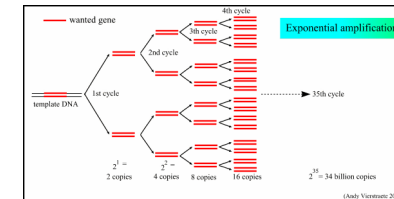
1. Probennahme



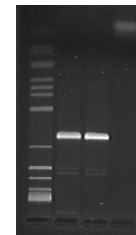
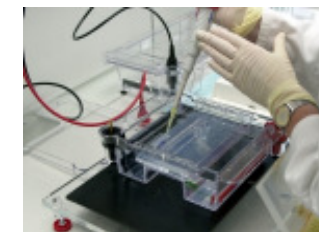
2. Probenvorbereitung (Kulturelle Anreicherung, DNA Extraktion)



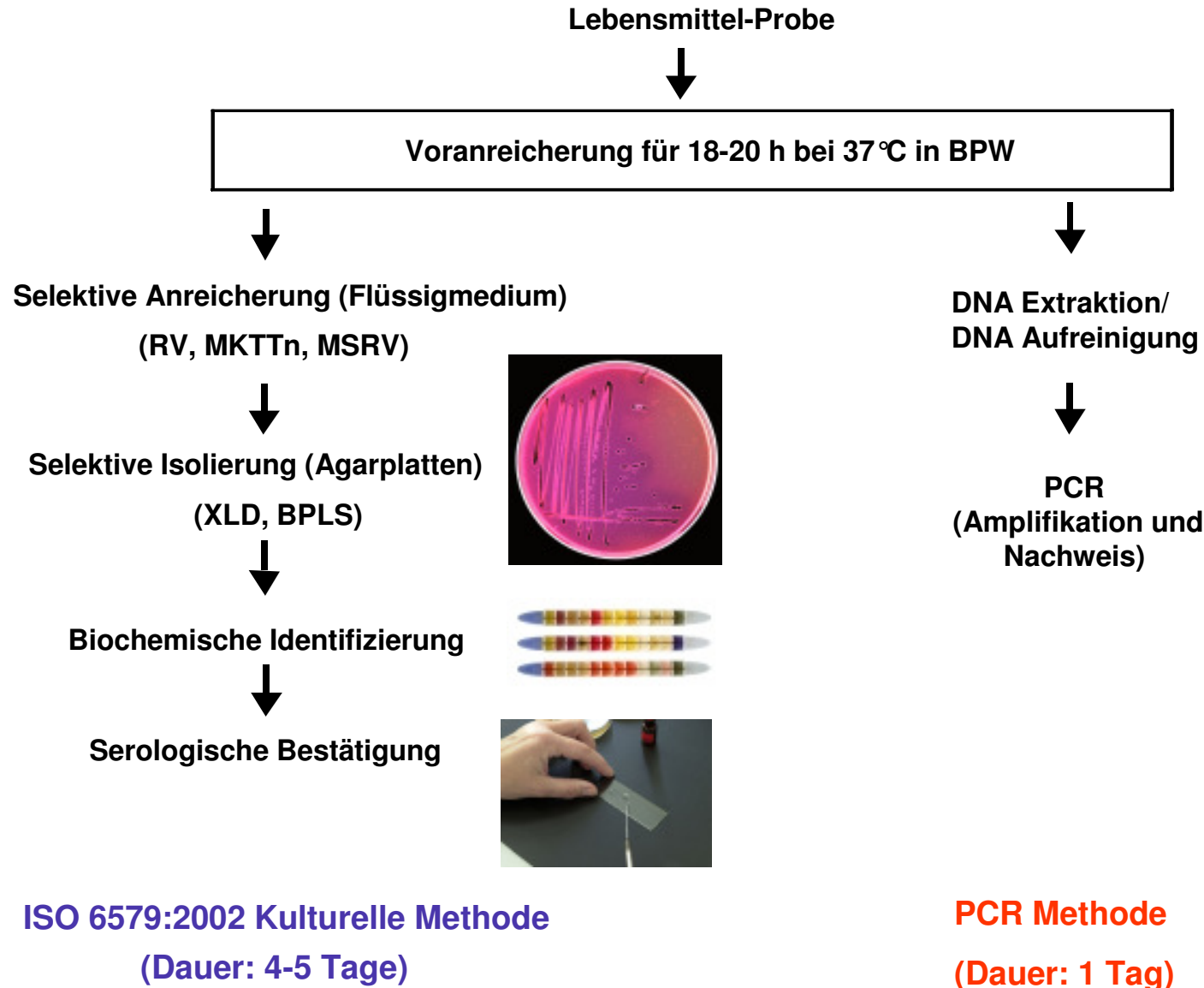
3. Spezifische DNA Vermehrung



4. Nachweis des PCR Produktes



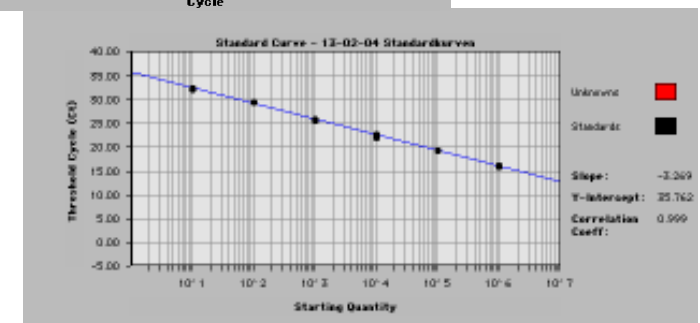
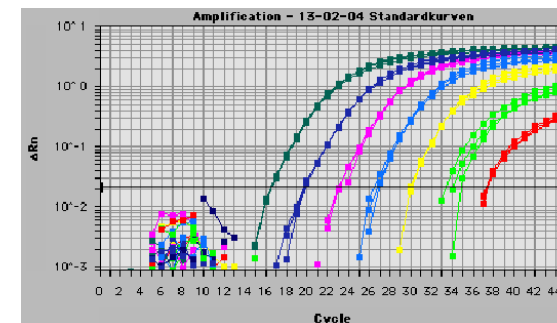
Beispiel Salmonellendiagnostik: Kulturell - PCR



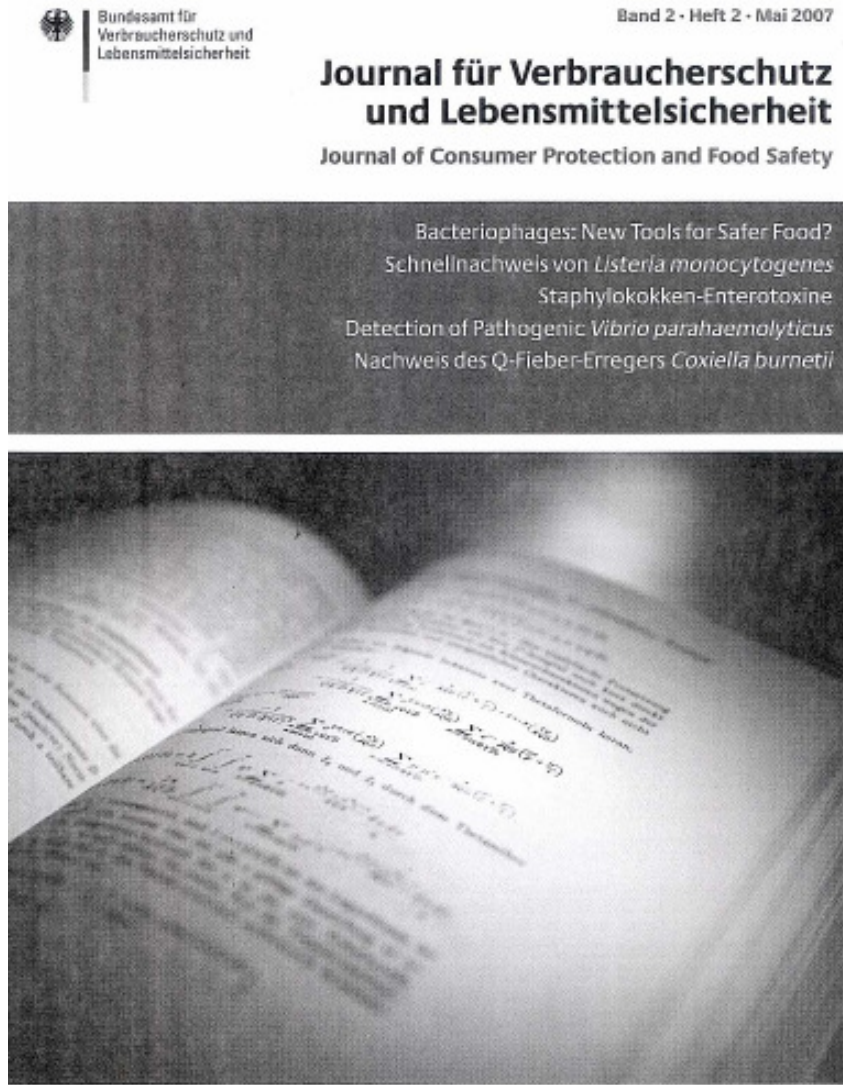
Nächste Generation der PCR: Real-Time PCR

- Amplifizierung und Detektion erfolgen im selben Reaktionsgefäß
- Zunahme des PCR Produktes wird mit Hilfe von Fluoreszenzmolekülen in Echtzeit dargestellt
- Quantifizierung möglich
- Verkürzte Analysezeit
- Vermindertes Risiko der Kreuzkontamination
- Automatisierung möglich

⇒ Real-Time PCR ist inzwischen die Methode der Wahl für eine schnelle Diagnostik (Lebensmittel und Klinik)



Real-Time PCR Nachweissysteme für pathogene Erreger



www.bvl.bund.de

Birkhäuser

Nachweissysteme für:

- Shigatoxin-bildende *E. coli* (STEC/EHEC)
- *Salmonella*
- *Listeria monocytogenes*
- *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*
- Staphylokokken-Enterotoxine
- *Clostridium perfringens*
- *Clostridium botulinum* Typ A, B, E und F
- *Yersinia enterocolitica*
- *Vibrio parahaemolyticus*
- *Enterobacter sakazakii*
- *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*
- *Coxiella burnettii*
- Viren in Lebensmitteln

PCR Labor vor Standardisierung



PCR Verfahren zum Nachweis pathogener Mikroorganismen in Lebensmitteln sind standardisiert (international, ISO/CEN)

Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln

- **Allgemeine Anforderungen und Begriffe (DIN EN ISO 22174:2005)**
- **Anforderungen an die Probenvorbereitung bei qualitativem Nachweis (DIN EN ISO 20837:2006)**
- **Anforderungen an Amplifikation und Nachweis bei qualitativen Verfahren (DIN EN ISO 20838:2006)**
- **Leistungsprüfung für PCR-Geräte (DIN EN ISO/TS 20836:2005)**
- **Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln - Allgemeine Anforderungen und Begriffe (ISO/DIS 22119:2007)**

PCR Verfahren zum Nachweis pathogener Mikroorganismen in Lebensmitteln sind standardisiert (national)

DEUTSCHE NORM		November 1999
Verfahren zum Nachweis von Salmonellen mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)		DIN 10135
<p>ICS 07.100.30 Method for detection of salmonella with polymerase chain reaction (PCR) Méthode de recherche des salmonella par la réaction en chaîne polymérase (PCR)</p>		
<p>Vorwort Diese Norm wurde vom Normenausschuß Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte, Arbeitsausschuß „Polymerase-Kettenreaktion zum Nachweis von Mikroorganismen“, erarbeitet. Diese Norm kann Schutzrechte betreffen. Auskünfte erteilt die Geschäftsstelle des Normenausschusses Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN Deutschen Institut für Normung e.V., 10772 Berlin (Hausanschrift: Burggrafenstraße 6, 10787 Berlin). Die Anhänge A bis C sind informativ.</p>		
<p>1 Anwendungsbereich Diese Norm legt ein Verfahren zum Nachweis von Salmonellen in Lebens- und Futtermitteln und aus diesen gewonnenen Isolaten mit der Polymerase-Kettenreaktion fest. ANMERKUNG: Diese Norm kann auch für andere Fragestellungen im Lebensmittelbereich angewendet werden, z. B. für Urgebirgsuntersuchungen.</p>	<p>L00.00-20 Untersuchung von Lebensmitteln – Nachweis von Salmonellen. In: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMVBG; Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen/BgVV, Lebensmittelammlung, Stand Jan. 1997, Bd. 1/1, (Beuth Verlag GmbH, Berlin, Köln)</p>	
<p>2 Normative Verweisungen Diese Norm enthält durch datierte oder undatierte Verweisungen Festlegungen aus anderen Publikationen. Diese normativen Verweisungen sind an den jeweiligen Stellen im Text zitiert, und die Publikationen sind nachstehend aufgeführt. Bei datierten Verweisungen gibt es spätere Änderungen oder Überarbeitungen dieser Publikationen nur zu dieser Norm, falls sie durch Änderung oder Überarbeitung eingearbeitet sind. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe der in Bezug genommenen Publikation.</p> <p>DIN 10134:1998-11 Allgemeine verfahrensspezifische Anforderungen zum Nachweis von Mikroorganismen mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in Lebensmitteln</p> <p>DIN 58967-60:1995-01 Serodiagnostik von Infektions- und Immunerkrankheiten – Teil 60: Polymerase-Kettenreaktion (PCR); Begriffe, Allgemeine methodenspezifische Anforderungen</p> <p>ISO 6579:1999 Microbiology – General guidance on methods for the detection of Salmonella</p>	<p>3 Begriffe Für die Anwendung dieser Norm gelten die allgemeinen PCR-methodenspezifischen Begriffe nach DIN 58967-60 und DIN 10134 und darüber hinaus die folgenden:</p> <p>3.1 Salmonellen Gram-negative Bakterien aus der Familie der Enterobacteriaceae. Die Gattung Salmonella umfaßt die beiden Arten Salmonella enterica mit sechs bekannten Unterarten, und Salmonella bongori.</p> <p>3.2 Salmonellen-spezifische DNA-Sequenzen Genbereiche, die für den spezifischen Nachweis von Salmonellen im Rahmen dieser Norm geeignet sind.</p> <p>3.3 PCR-ELISA; PCR-Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay Ein Nachweisverfahren, bei dem Amplifikate an einer Festphase (z. B. in Mikrotiterplatten) durch immunchemische Detektion nachgewiesen werden.</p>	
Fortsetzung Seite 2 bis 8		
Normenausschuß Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN Deutschen Institut für Normung e.V.		

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB		
L	Untersuchung von Lebensmitteln Qualitativer Nachweis von Salmonellen in Lebensmitteln ¹⁾ Real-time PCR-Verfahren	00.00
		98



April 2007

1 Zweck und Anwendungsbereich

Diese Methode beschreibt ein Verfahren zum Nachweis (Nachfrage auf An- oder Abwesenheit) von Salmonellen in Lebensmitteln durch Real-time Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Durch diese Methode nachgewiesene Salmonellen müssen für Beurteilungen bei lebensmittelrechtlichen Fragestellungen kulturell bestätigt werden.

2 Begriffe

Für die Anwendung dieser Methode gelten die allgemeinen PCR-methodenspezifischen Begriffe nach L 00.00-45 [1].

2.1 Salmonellen

Gram-negative Bakterien aus der Familie der Enterobacteriaceae. Die Gattung Salmonella umfaßt die beiden Arten Salmonella enterica mit sechs bekannten Unterarten und Salmonella bongori.

2.2 Salmonellen-spezifische DNA-Sequenzen

Genbereiche, die für den spezifischen Nachweis von Salmonellen im Rahmen dieser Methode geeignet sind.

2.3 Real-time PCR

Enzymatische Reaktion, die eine in-vitro Vervielfältigung (Amplifikation) spezifischer DNA-Sequenzen mit dem Nachweis des spezifischen PCR-Produktes, das während des Vervielfältigungsprozesses entsteht, vereint. Die Amplifikation erfolgt durch Denaturierung doppelsträngiger DNA, Anlagerung von zwei Oligonukleotidprimern an die zu vervielfältigende Ziel-DNA-Sequenz und DNA-Synthese in Kombination mit dem Nachweis des spezifischen PCR-Produktes.

2.4 Reporter

Fluoreszenzmolekül, das nach Anregung durch elektromagnetische Strahlung einer bestimmten Wellenlänge zum Nachweis der Hybridisierung der spezifischen Sonden benutzt wird.

2.5 Quencher

Fluoreszenzmolekül, das die emittierte Energie eines Reporters absorbiert und damit dessen Fluoreszenzsignal unterdrücken kann.

2.6 Dark Quencher

Molekül, das die emittierte Energie eines Reporters absorbiert und damit dessen Fluoreszenzsignal unterdrücken kann. Die eigene emittierte Energie liegt aber in einem Spektralbereich, der nicht durch die optische Einheit eines Real-time PCR-Instrumentis nachgewiesen werden kann.

2.7 Basislinie

Niveau des Fluoreszenzsignals, bei dessen Überschreiten die Reaktion eine Fluoreszenzintensität über der Hintergrundfluoreszenz erreicht hat.

2.8 Threshold Cycle, Crossing Point

Punkt einer Vervielfältigungskurve, bei dem das Fluoreszenzsignal die Basislinie oder eine vordefinierte Linie kreuzt.

2.9 Passive Referenz

Fluoreszenzmolekül, das in dem PCR-Reaktionsansatz anwesend ist und zur Normalisierung des Reportersignals benutzt werden kann.

2.10 Hydrolyse-Sonde

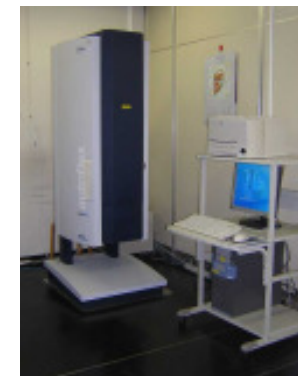
Oligonukleotidsonde, an die zwei Fluoreszenzmoleküle gebunden sind, die während des Vervielfältigungsprozesses durch die 5'-3' Exonukleaseaktivität sterisch getrennt werden.

2.11 Abkürzungen

DNA	Desoxyribonukleinsäure (en: deoxyribonucleic acid)
EDTA-Na ₂	Ethylendiaminetetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat
BPW	Geputtertes Peptonwasser
BPLS	Brilliantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose-Agar
FAM	6-Carboxyfluorescein
HEX	Hexachloro-6-carboxyfluorescein
IC	interne Amplifikationskontrolle
IC-DNA	interne Amplifikationskontrolle-DNA
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
ROX	Carboxy-X-Fluoramin
RV-Medium	Magnesiumchlorid-Malachitgrün-Medium nach Rappaport-Vassiliadis
TAMPA	6-Carboxy-Tetramethylrhodamin
XLD	Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar
dATP	Deoxyadenosintriphosphat
dCTP	Deoxycytosintriphosphat
dGTP	Deoxyguanosintriphosphat
dTTP	Deoxythymidintriphosphat
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat

Ausblick auf das nächste Jahrzehnt

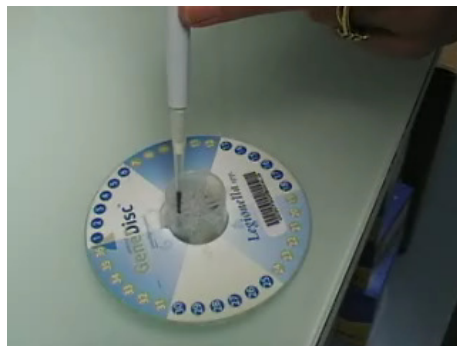
- Kombination von DNA und immunologischen Prinzipien: quantitative immuno-PCR (Niemeyer et al. 2007, Nature Protocol 2:1918-1930)
- Entwicklung von spektroskopischen Verfahren zum Nachweis von Erregern
 - Fourier-Transformations-IR-Spektroskopie (FTIR)
 - Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation –Time of Flight Spektroskopie (MALDI-TOF)
- Verbesserte FISH (Fluoreszenz in situ Hybridisierung) in Kombination mit anderen Techniken wie der Flow Cytometry
- Automatisierung, Hochdurchsatz
- Simultaner Nachweis und Charakterisierung von Erregern



Einige kommerzielle Entwicklungen...



Lateral Flow Assay, Firma Merck:
basierend auf einem Immunosorbent
Assay mit gold-markierten Antikörpern,
erhältlich für alle wichtigen pathogenen
Erreger



GeneDisc Cycler
(GeneSystems):
diagnostische Real-Time
PCR, für Routinelabore
geeignet, standardisiert,
erhältlich für verschiedene
Erreger

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit



Bundesinstitut für Risikobewertung

Thielallee 88-92 • D-14195 Berlin

Tel. +49 30-8412-2188 • Fax +49 30-8412-2953

burkhard.malorny@bfr.bund.de • www.bfr.bund.de