

Fachabteilung LSR

LEBENSMITTEL-MIKROBIOLOGIE

Schneller Nachweis von Salmonellen

Patricia Fischer für den LSR-Arbeitsausschuss Wissenschaftsdialog

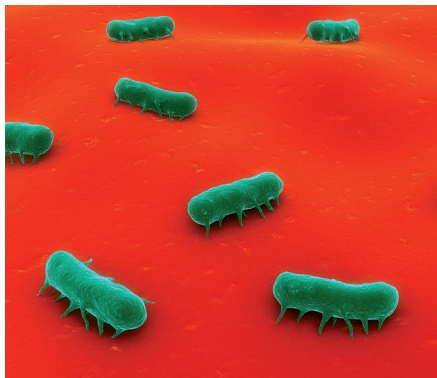
Beim Pathogennachweis in der Lebensmittel-Mikrobiologie ist *Salmonella spec.* der häufigste Parameter und wird daher an den drei Methoden Real Time-PCR, chromogene Medien und der Sandwich-Hybridisierung exemplarisch vorgestellt.

Chromogene Medien

Mit chromogenen Medien können pathogene Mikroorganismen einfach, sensitiv und spezifisch nachgewiesen und quantifiziert werden. Die Methode beruht auf dem spezifischen Nachweis von Enzymen in Pathogenen. Im Medium enthalten ist ein chromogenes Substrat, das von den Enzymen gespalten wird und dabei einen Farbstoff freisetzt. Kolonien werden charakteristisch eingefärbt, wenn die Bakterien diese spezifischen Enzyme enthalten, und lassen sich daher einfach von anderen Erregern unterscheiden. Für den qualitativen Nachweis werden die Proben in gepuffertem Peptonwasser (BPW) angereichert. Daraus wird ein Aliquot entnommen und auf einem chromogenen Nährboden ausgestrichen. Nach einer Inkubationszeit von 24 bis 48 Stunden (je nach Nährboden) kann die Platte ausgewertet werden. Negative Ergebnisse liegen schon nach etwa 48 Stunden (inkl. Voranreicherung) vor. Positive Kolonien werden über eine zweite Methode bestätigt (zum Beispiel Isomethoden, andere Schnellmethoden). Chromogene Medien sind preiswert, da pro Probe nur eine Anreicherung und eine Platte notwendig sind. Zudem ist die Methode meist validiert (unter anderem AFNOR, AOAC, gemäß ISO 16140).

Sandwich-Hybridisierung

Die Sandwich-Hybridisierung (SH) weist als eine der wenigen Salmonellen-Nachweise RNA und damit lebende Zellen nach. Sie beruht auf



der spezifischen Anlagerung von Sonden an Pathogen-charakteristische RNA-Fragmente. Nach einer Vorkultur (10 bis 24 Stunden) wird die Probe zentrifugiert und lysiert. Danach wird der Überstand mit Fänger- und Detektionssonden inkubiert und auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Der Nachweis wird mit Zugabe eines Enzym gestartet, dann die Probe gereinigt und nach insgesamt etwa zwei Stunden im Plattenlesegerät ausgelesen. Die SH beruht auf einer robusten und preiswerten Gerätetechnik und ermöglicht den Nachweis nicht-kultivierbarer Organismen. Sie ist in Genauigkeit, Spezifität und Empfindlichkeit zur Methode §64 ASU L00.00-20 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuches (LFGB) vergleichbar. Bei Überschreiten einer gewissen Nachweisgrenze (Hefen 100 Kbe/ml, Bakterien: 1.000 Kbe/ml) kann mit ihr auch quantifiziert werden.

Real Time-PCR

Die schnellste und sensitivste Methode ist die Real Time-PCR. Zur Vorbereitung werden die Proben in BPW acht bis 24 Stunden angereichert. Aus einem Aliquot wird daraufhin die Nukleinsäure isoliert, die dann durch eine PCR amplifiziert wird. Für die Nukleinsäure-Reinigung empfehlen sich je nach PCR-System,

Probenmatrix und Durchsatz unterschiedliche Methoden. Die einfachste und günstigste ist die chemisch/thermische Lyse der Zellen. Der gewonnene Überstand kann direkt für die PCR eingesetzt werden. Bei schwierigeren Proben kann die DNA mit Hilfe von Silika-basierten Säulen oder magnetischen Partikeln selektiv gereinigt werden. Bei höheren Durchsätzen kann die Partikel-Methode automatisiert werden.

Bei der Real Time-PCR werden spezifische Abschnitte der Salmonellen-DNA vermehrt und gleichzeitig fluoreszierende Sonden reversibel an die DNA angelagert. Durch den fluoreszenten Nachweis ist die Methode sehr sensitiv. Die PCR ist komplett automatisierbar. Mit einer Analyse-Software können selbst molekularbiologische Laien die Daten korrekt auswerten.

„Da die PCR einfach durchzuführen ist, sind die Ergebnisse reproduzierbar und verlässlich,“ beschreibt Sandra Luley, Qiagen, die Vorteile. „PCR ist sehr schnell, genau und sicher. Sie kann manuell oder automatisiert durchgeführt werden. Daher ist sie inzwischen fester Bestandteil standardisierter, bewährter Nachweismethoden. Die Lebensmittelindustrie weltweit setzt sie bereits ein, um die Produktqualität sicherzustellen.“

Allen drei vorgestellten Methoden ist die geringe Kreuzreaktivität, hohe Spezifität und schnelle Ergebnisse in maximal zwei Tagen gemein. Sie sind bereits in der Routine bewährt und werden in der Lebensmittelkontrolle immer mehr zum Einsatz kommen. ■



Termine für
LSR-Firmen

19. Januar 2012, Frankfurt am Main
Fachabteilungssitzung