

DAS ONE-SYSTEM ZUM SCHNELLEN NACHWEIS VON SALMONELLEN

DAS 2-IN-1-SYSTEM: DNA-EXTRAKTION UND REAL-TIME PCR



›Autorin:

Dipl.-Oecotroph. Erika Lorenzen, Product-Management, Marketing & Sales CONGEN Biotechnologie GmbH, Headquarter Haus 55, Robert-Roessle-Str. 10, 13125 Berlin, Tel: +49 (0)30 9489 3517, Fax: +49 (0)30 9489 3510, Email: e.lorenz@congen.de, Web: www.congen.de

Molekularbiologische Analysemethoden zur Untersuchung auf pathogene Mikroorganismen werden bereits seit mehreren Jahren in der Routineuntersuchung von Lebens- und Futtermitteln eingesetzt. Sie ersetzen dabei nicht die klassischen Kultivierungsmethoden, sondern bieten eine zeitsparende Alternative oder werden zu einem ersten Screening nach einer ersten Anreicherungsstufe verwendet. CONGEN entwickelt aktuell eine Reihe kombinierter Nachweissysteme, die die Schritte der DNA-Extraktion und einen spezifischen

real-time PCR Nachweis umfassen, was den Zeit- und Kostenaufwand noch weiter optimiert.

SureFast® Salmonella ONE dient dem Schnellaufweis von Salmonellen. *Salmonella* spp. ist weltweit einer der bedeutendsten bakteriellen Krankheitserreger bei Menschen und Tieren. Aus dem jährlichen Bericht des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) über an Krankheitsausbrüchen beteiligten Lebensmitteln in Deutschland im Jahr 2017 geht hervor, dass 34 % der Fälle von Salmonellen verursacht wurden. Besonders rohe Fleischwa-

ren wie z.B. Rohwurstprodukte und rohes Mett aus Schweinefleisch wurden laut BELA-Meldungen mehrfach als Vehikel identifiziert. Darüber hinaus können Salmonellen auch in Geflügel, Milchprodukten, Schokolade und vielen weiteren Lebensmitteln wachsen. Die meisten humanen Infektionen sind auf *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium* zurückzuführen, obwohl grundsätzlich alle Serotypen potentiell pathogen sind. Um das Risiko für die öffentliche Gesundheit zu senken, legt die EU-Verordnung Nr. 1086/2011 die routinemäßige Untersuchung von frischem Geflügelfleisch auf *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium* fest. Aufgrund des ubiquitären Vorkommens von Salmonellen ist ein kontinuierliches Monitoring von der Primärproduktion bis hin zum Lebensmittelbetrieb notwendig.

DAS 2-IN-1-SYSTEM

Abbildung 1 gibt einen Überblick über das SureFast® Salmonella ONE System. Der Schritt der Nukleinsäureextraktion konnte auf etwa die Hälfte der üblichen Zeit (ca. 15 Minuten) reduziert werden, indem auf den Einsatz von Spin-Filter-Röhrchen und damit verbundener Aufreinigungs- und Elutionsschritte verzichtet wurde. Nach einer 16-20 stündigen Anreicherung in gepuffertem Peptonwasser gemäß

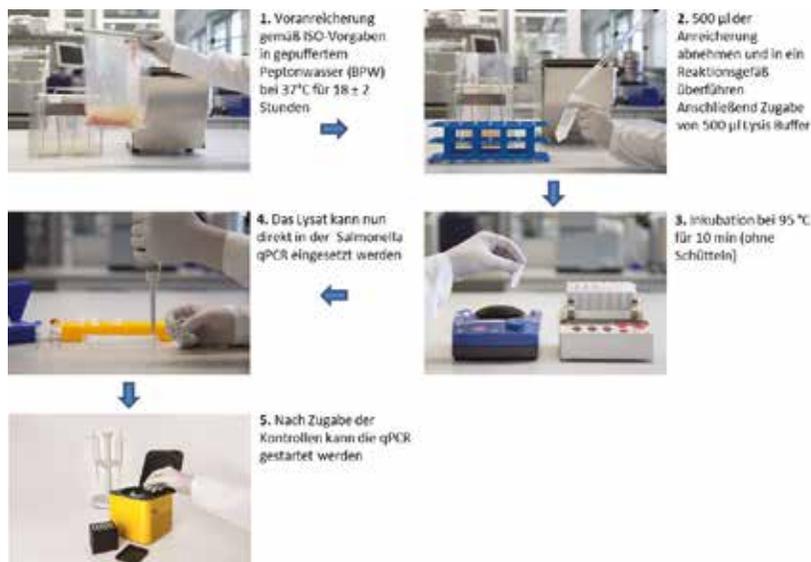


Abbildung 1: SureFast® Salmonella ONE- Das 2-in-1-System

Tabelle 1: Übersicht der Lebensmittelkategorien und Arten

Kategorie		Art		Protokoll Alternativmethode	Testmenge	Anzahl der Proben
1	Geflügelfleisch	a	roh, gefroren	BPW für 16 - 20 h bei 37°C ± 1°C	25 g	24
		b	Fertiggericht		25 g	21
		c	Verzehrfertiges Fertiggericht und Fertiggericht zum Wiedererhitzen		25 g	23
		Summe				
2	Fleischprodukte	a	roh, gefroren, gewürzt	BPW für 16 - 20 h bei 37°C ± 1°C	25 g	20
		b	Fertiggericht		25 g	20
		c	Verzehrfertiges LM* und Fertiggericht zum Wiedererhitzen		25 g	21
		Summe				
3	Milchprodukte	a	pasteurisiert	BPW für 16 - 20 h bei 37°C ± 1°C	25 g	20
		b	roh		25 g	26
		c	Pulver, Bestandteile		25 g	20
		Summe				
4	Gemüse	a	Fertiggericht	BPW für 16 - 20 h bei 37°C ± 1°C	25 g	20
		b	Frische Kräuter, Gewürze		25 g	26
		c	Verzehrfertiges LM*		25 g	26
		Summe				
5	Eiprodukte	a	pasteurisiert	BPW für 16 - 20 h bei 37°C ± 1°C	25 g	22
		b	Pulver		25 g	20
		c	Eiprodukte		25 g	20
		Summe				
6	Futtermittel	a	Haustier	BPW für 16 - 20 h bei 37°C ± 1°C	25 g	21
		b	Rind		25 g	21
		c	Rohmaterial		25 g	20
		Summe				
Alle Produkte						391

*LM=Lebensmittel

ISO-Vorgaben werden nach Sedimentation der Anreicherung 500 µl des Überstandes entnommen. Das gleiche Volumen eines speziell entwickelten Lysepuffers wird anschließend zugegeben und 10 Minuten bei 95 °C inkubiert. Das gewonnene Lysat kann direkt zum Einsatz in der PCR verwendet werden. Im Vergleich zu säulen-basierten Nukleinsäureextraktionskits zeigte sich, dass dieses Schnellverfahren aus verschiedenen Lebensmittelmatrices (z.B. Geflügel, Hackfleisch, Salami, Schokolade, Eiscreme, Kakaopulver, Gemüse, Kräuter, Babynahrung und Futtermittel) in

deutlich kürzerer Zeit mit der extrahierten DNA, PCR-Ergebnisse vergleichbarer Qualität generierte.

EXTERNER METHODENVERGLEICH

Um die Leistungsfähigkeit des 2-in-1-Detektionssystems besser bewerten zu können, beauftragte CONGEN ein externes Referenzlabor gemäß Arbeitsvorschrift für die Validierung alternativer Verfahren (ISO 16140-2:2016) eine Vergleichsuntersuchung unserer Alternativmethode mit dem kulturellen Referenzverfahren nach ISO 6579

durchzuführen. Der Salmonellen-Nachweis in der Real-time PCR erfolgte im FAM-Kanal, während der Erfolg der PCR mit einer internen Amplifikationskontrolle im VIC/HEX-Kanal überprüft wurde. Im Rahmen der Studie wurden die Sensitivität, relative Nachweisgrenze sowie Inklusivität und Exklusivität im Vergleich zur klassischen Referenzmethode geprüft.

Insgesamt wurden 391 Proben (188 positiv und 203 negativ) aus sechs Lebensmittelkategorien (Geflügelfleisch, Fleischprodukte, Milchprodukte, Gemüse, Eiprodukte,

Tabelle 2: Verteilung der Proben

	Natürlich kontaminiert	Inokulierte Proben			Summe
		≤ 5 CFU	CFU 5 < x ≤ 10	CFU 10 < x ≤ 15	
Anzahl der Proben	35	130	18	5	188
%	19	69	10	3	100

Tabelle 3: Ergebnisse Sensitivitätsstudie auf dem Roche LightCycler 480, PA= Positive Agreement, NA= Negative Agreement, PD= Positive Deviation, ND=Negative Deviation, FP= False Positive, SE alt%= Sensitivität der Alternativmethode in %, SE ref %= Sensitivität der Referenzmethode

Kategorie	Anzahl der getesteten Proben	PA	NA	PD	ND	FP	SE alt %	SE ref %
Geflügelfleisch	68	29	34	1	1	3	96,8	96,8
Fleischprodukte	61	30	29	0	1	1	96,8	100,0
Milchprodukte	66	31	33	1	0	1	100,0	96,9
Gemüse	72	30	41	0	1	0	96,8	100,0
Eiprodukte	62	31	30	0	0	1	100,0	100,0
Futtermittel	62	30	30	0	2	0	93,8	100,0
Summe		181	197	2	5	6	97,3	98,9

Futtermittel) untersucht, wobei je Kategorie drei verschiedene Lebensmittelarten ausgewählt wurden. Pro Art wurden jeweils mindestens 20 Proben á 25 g untersucht. Tabelle 1 zeigt die Anzahl der Proben nach Lebensmittelkategorie und Art.

19 % der Proben waren natürlich und die Übrigen künstlich kontaminiert. Der überwiegende Teil der Proben wurde in einer Konzentration von kleiner oder gleich 5 CFU/Probe gemessen. Eine Übersicht über die Verteilung der Proben auf die verschiedenen Inokulationsstufen gibt Tabelle 2.

Die relative Sensitivität (SE) zeigt die Eignung des alternativen Verfahrens, den Analyt nachzuweisen, wenn er mit dem Referenzverfahren nachgewiesen wird. Die relative Sensitivität des alternativen Verfahrens wird nach folgender Formel berechnet:

$$SE_{alt} = \frac{(PA+PD)}{(PA+ND+PD)} \times 100$$

PA steht für die Anzahl der positiven Bestätigungen der Alternativmethode im Vergleich zur Referenzme-

thode, PD= positive Abweichungen der alternativen Methode, ND= negative Abweichungen der Alternativmethode. Entsprechend wird auch die Sensitivitätsrate der Referenzmethode berechnet:

$$SE_{ref} = \frac{(PA+ND)}{(PA+ND+PD)} \times 100$$

Die Sensitivitätsstudie wurde auf fünf Real-time PCR Geräten durchgeführt: Roche LightCycler 480 II, ABI 7500, BioRad CFX96, BMS MIC und Agilent Aria Mx. Tabelle 3 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der Sensitivitätsstudie auf dem Roche LightCycler® 480 II für die unterschiedlichen Kategorien. Insgesamt wurden mit der Alternativmethode über alle Kategorien und Cycler gute Ergebnisse im Vergleich zur Referenzmethode ermittelt.

FAZIT

Der extern durchgeführte Methodenvergleich zeigt, dass das neu entwickelte 2-in-1-Verfahren zum Nachweis von *Salmonella* spp. sensitiv, spezifisch und vergleichbar zur

ISO-Methode ist. Eine Analyse mit dem MicroVal und AOAC-RI zertifizierten SureFast® Salmonella ONE liefert in deutlich kürzerer Zeit Ergebnisse vergleichbarer Qualität und bietet somit eine gute Alternative für die kompakte Isolierung und qualitative Identifikation von *Salmonella* spp. in Lebens- und Futtermitteln. Eine kostenintensive Automatisierung lässt sich durch den Einsatz der ONE-Systeme in mittelständischen Betrieben vermeiden. Positive Befunde können darüber hinaus mit der Multiplex-PCR SureFast® Salmonella Species Enteritidis/Typhimurium 4plex auf *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium* analysiert werden. Weitere ONE-Systeme zum Nachweis von Pathogenen sind bereits in der Entwicklung und Validierung.

Weitere Informationen

erhalten Sie bei:

CONGEN Biotechnologie GmbH

Robert-Rössle-Str. 10

13125 Berlin

Telefon: +49 30 / 9489 3500

E-Mail: info@congen.de



Methodischer Dreh

Für Analysen und Applikationen in der Food-Industrie bietet Shimadzu Hard- und Software-Gesamtlösungen für tierische und pflanzliche Produkte, Duft- und Geschmacksstoffe, Speisen und Getränke, Lebensmittelverarbeitung und -verpackung.

- **Analysesysteme für die gesamte Nahrungsmittelindustrie**

- **Sicherheit von der Produktion bis zur Verpackung**
- **Kostenloser Zugang zu Expertenwissen**

