

Entwicklung einer internen Proben- prozesskontrolle zur Quantifizierung von lebenden *Campylobacter* mittels real-time PCR

Ewa Pacholewicz¹, Christiane Buhler¹, Imke F. Wulsten¹,
Britta Kraushaar¹, Azuka Iwobi², Ingrid Huber², Kerstin Stingl¹

¹Nationales Referenzlabor für *Campylobacter*, BfR, Berlin

²Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim

Quantifizierung von *Campylobacter* auf Geflügelfleisch

Basiert auf ISO 10272-2:2017

Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Horizontales Verfahren zum Nachweis und zur Zählung von *Campylobacter* spp. - Teil 2: Koloniezählverfahren

Verluste der Kultivierbarkeit der Zellen durch Kälte- oder Sauerstoffstress bei z.B. Lagerung

Zellen, nicht mittels KbE nachweisbar, können jedoch potentiell infektiös sein

Unterschätzung des Risikos von Geflügelfleischkontamination

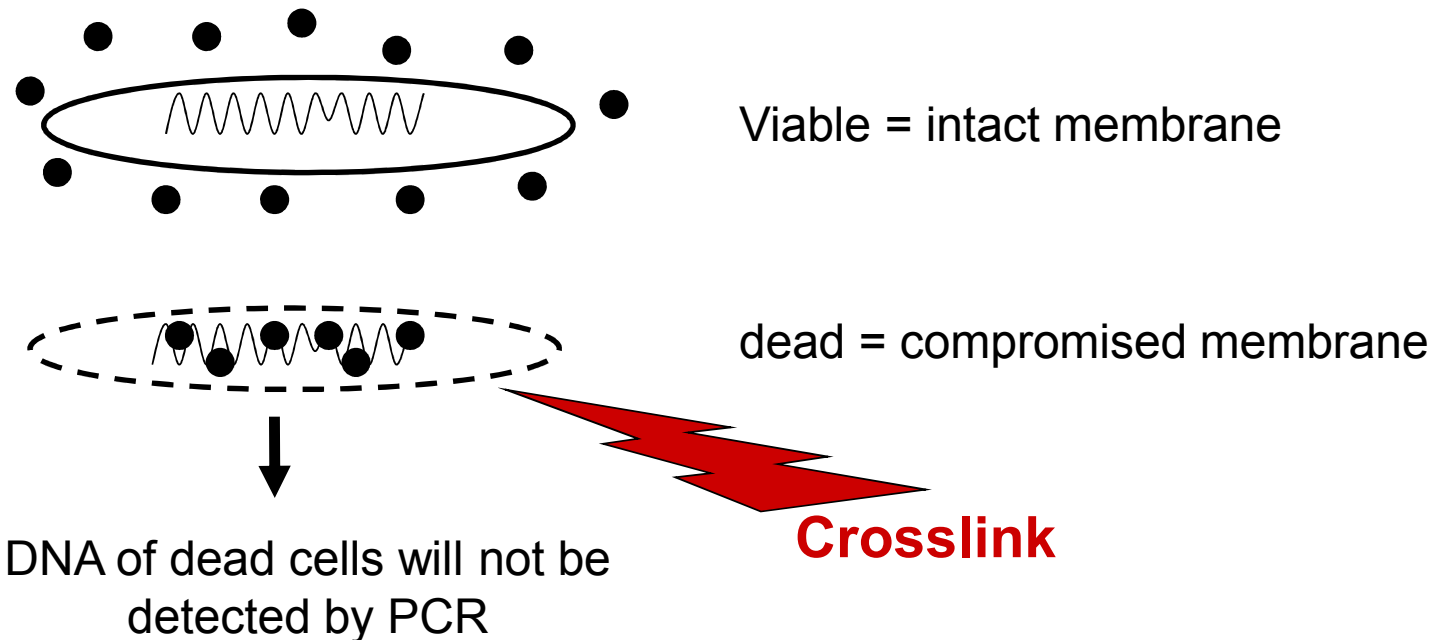
Kulturunabhängige Methoden zur Quantifizierung sind notwendig



Kulturunabhängige Methode zur Quantifizierung

Inaktivierung der DNA von toten Zellen (mit permeable Membran) mittels interkalierenden Farbstoffs PMA (Propidium Monoazide); Nocker et al., 2006

Detektion von lebenden Zellen mittels real-time PCR



Kulturunabhängige Methode zur Quantifizierung

Quantifizierung von Bakterien mit intakter Membran mittels real-time PCR

Campylobacter jejuni, C. coli, C. lari

Josefsen et al., 2010

Salmonella typhimurium

Nocker et al., 2009

***Escherichia coli* O157:H7**

Nocker et al., 2009

Escherichia coli

Yang et al., 2011

Listeria monocytogenes

Pan and Breidt 2007; Nocker et al., 2009

Listeria innocua

Løvdal et al., 2011



Einschränkungen der Methode

Unzureichende Signalreduktion aus toten Zellen

Reduktion beeinflusst durch variable Parameter (Krüger et al., 2014)

- Inkubationstemperatur
- Farbstoffkonzentration
- Effizienz der kovalenten Vernetzung
- Lichtquelle
- Heterogenität der Matrix
- Länge der Zielsequenz

→ Interne Proben-Prozesskontrolle (ISPC) notwendig, um die Variationen quantitativ zu messen

ISPC (eine quantitativ definierte Suspension toter Zellen) durchgeführt direkt im selben Ansatz

Identifizierung von putativen neuen Targets für die ISPC *Campylobacter sputorum*

Isoliert aus Sperma vom Rind, bisher kein Nachweis bei Geflügel

Sequenz veröffentlicht: Iraola et al., 2014

Länge und Anzahl der chromosomalen Kopien stimmt mit *C. jejuni* überein

Insertionssequenz innerhalb der 16S rRNA Gen

Ähnliche Wachstumseigenschaften für *C. jejuni* und *C. sputorum*
wünschenswert für die effektive Handhabung und Vorbereitung der ISPC

DNA Standards für die Real-time PCR

Standards, die auf chromosomalen Kopien basieren, sind zuverlässig und reproduzierbar im Vergleich zu relativ variablen KbE Standards

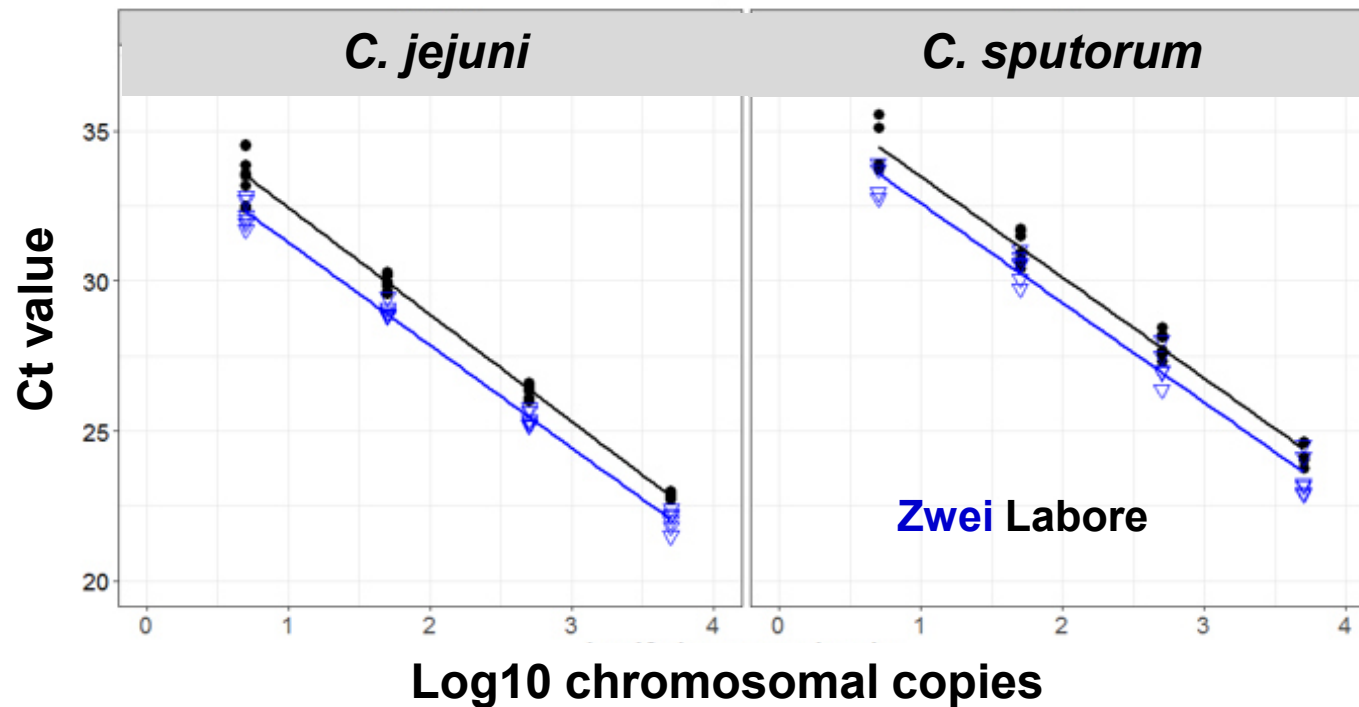


Abb. 3. Sechs unabhängige Standardkurven, Ansätze von zwei Laboren.

Exklusivität zur Verifikation des ISPC Targets

Kein falsch positives Ergebnis für das ISPC-Target aus *C. sputorum*

Tabelle 1. Ergebnisse der Exklusivitätsstudie. 0,1-1 ng und 10-600 ng DNA wurden für die Stämme und die Matrizen verwendet. Der Mangel an PCR-Inhibition wurde durch Zugabe einer internen Amplifikationskontrolle überprüft (Anderson et al., 2011; LFGB, 2013).

Tested reference strains	Real-time PCR results	Tested reference strains	Real-time PCR results	Tested field isolates/matrixes	Number of isolates/matrixes	Real-time PCR results
<i>Arcobacter butzleri</i> DSM 8739	negative	<i>C. hyointestinalis</i> DSM 19053	negative	<i>C. jejuni</i>	154	negative
<i>Arcobacter cryoaerophilus</i> DSM 7289	negative	<i>C. insulaenigrae</i> DSM 17739	negative	<i>C. coli</i>	75	negative
<i>Arcobacter skirrowii</i> DSM 7302	negative	<i>C. jejuni dolei</i> LMG 8843	negative	<i>C. lari</i>	1	negative
<i>C. coli</i> DSM 4689	negative	<i>C. jejuni</i> DSM 4688	negative	<i>C. lanienae</i>	1	negative
<i>C. concisus</i> CCUG 19996	negative	<i>C. lari concheus</i> LMG 11760	negative	<i>Helicobacter pullorum</i>	4	negative
<i>C. concisus</i> DSM 9716	negative	<i>C. lari</i> DSM 11375	negative	Chicken rinse	11	negative
<i>C. curvus</i> CCUG 13146	negative	<i>C. peloridis</i> LMG 13910	negative	Raw milk	2	negative
<i>C. fetus fetus</i> DSM 5361	negative	<i>C. sputorum bubulus</i> DSM 5363	positive			
<i>C. gracilis</i> DSM 19528	negative	<i>C. sputorum sputorum</i> DSM 10535	positive			
<i>C. helveticus</i> CCUG 33880	negative	<i>C. upsaliensis</i> DSM 5363	negative			

„proof-of-principle“

Kontaminationsversuche mit *C. jejuni* und der ISPC in Hühnerabschwemmungen

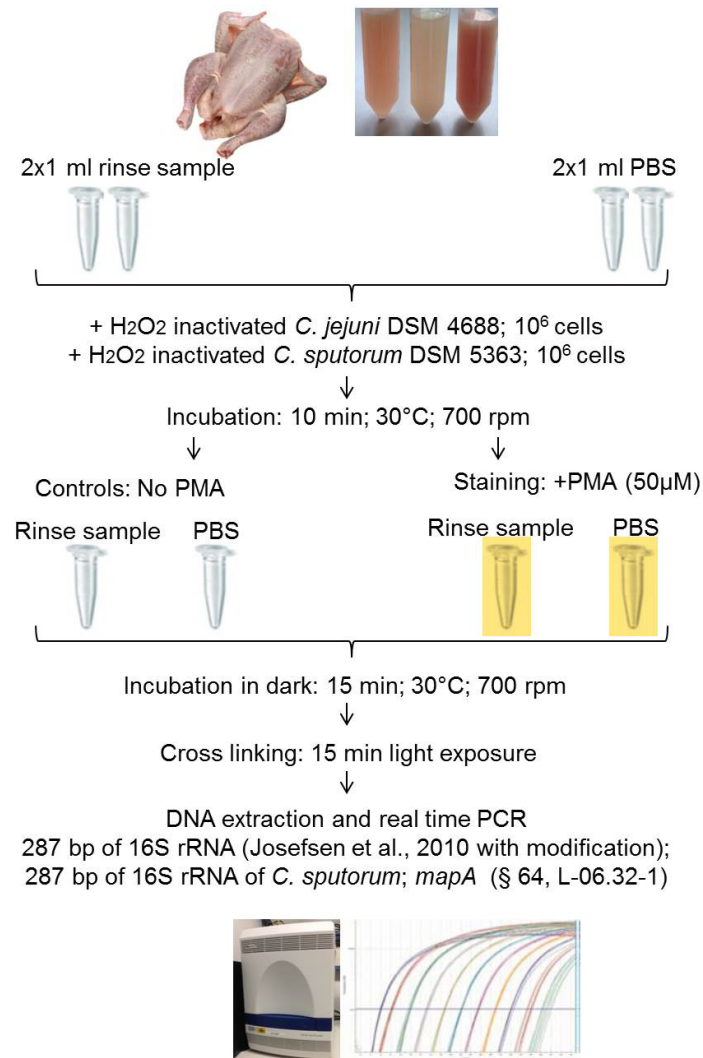


Abb. 4. Zusammenfassung der Versuchsplan.

Vergleich von PCR-Performanz unterschiedlicher Targets

A, Die Signalreduktion von toten Zellen bei der **PMA-Behandlung (rot)** und des **DNA-Verlustes durch Extraktion (blau)** sind vergleichbar für ISPC- und *C. jejuni* (mit H₂O₂-getötet); **B**, nicht aber bei zwei verschiedenen Targets in *C. jejuni* Zellen

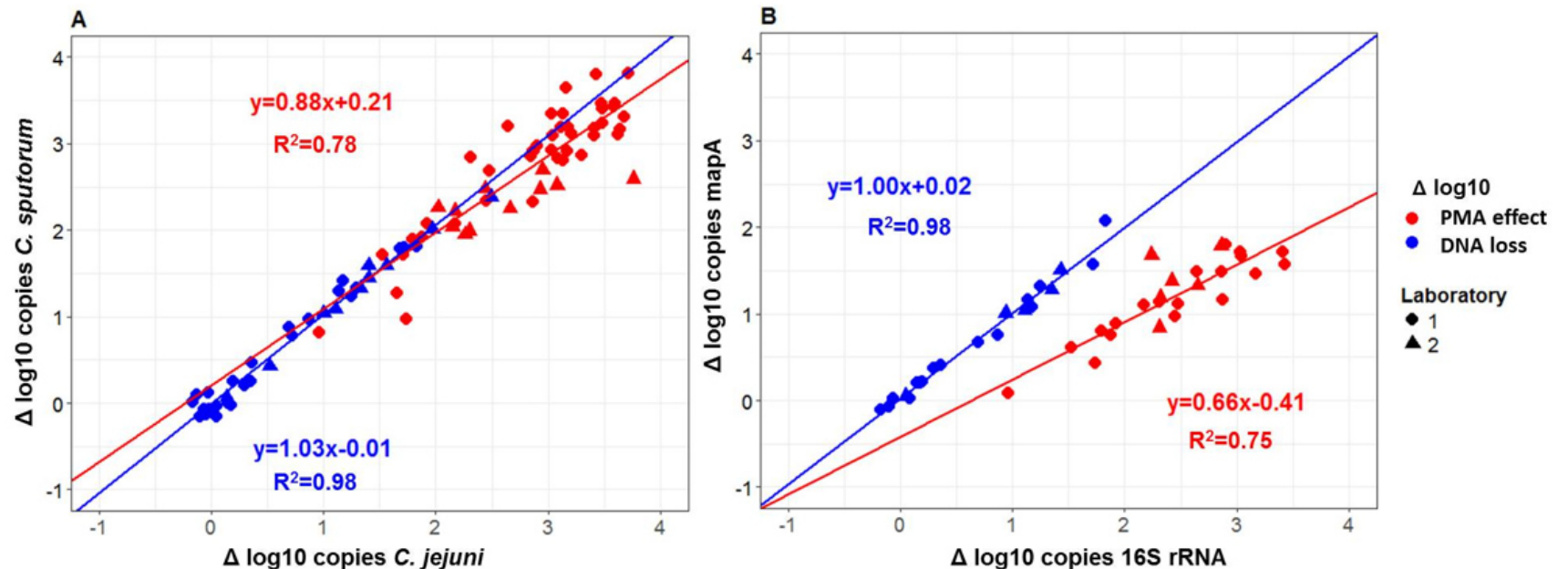


Abb. 5. Ergebnisse der Regressionsanalyse.

Schlussfolgerungen

- Zur Entwicklung einer ISPC zur quantitativen Detektion von *Campylobacter* wurde nach Sequenzanalyse ein geeignetes Target gefunden. Dieses basiert auf der 16S rRNA Sequenz der *C. sputorum*.
- Entscheidende Parameter der ISPC: gleich lang, identische Kopienzahl, ähnliche Membran-Permeabilitäten wie vergleichbar abgetötete *C. jejuni*.
- ISPC detektiert Variationen bei der DNA-Aufreinigung und der Proben-spezifischen Adsorption interkalierender Farbstoffe (Matrix-Effekte die zur Variationen des Restsignals von toten Zellen führen).
- Weitere Forschung wird sich auf die Konservierung der ISPC konzentrieren, damit sie an verschiedene Laboratorien verteilt werden kann.
- Ringversuch wird durch das LGL im Herbst 2018 zur Validierung des ISPC ausgerichtet:
→ Teilnehmer willkommen!

Perspektiven der lebenden/toten diskriminierenden Quantifizierungsmethode von *Campylobacter*

- Mittelfristig wird die Methode für Lebensmittelbehörden und Unternehmer (bzw. Einzelhändler, Schlachthöfe) einsetzbar sein
- Senkung der Kosten, Zeit, Verbesserung der Handhabung
- Verbesserung des Nachweises von intakten und potentiell infektiösen Erregern z. B. zum verbesserten Nachweis von Transmissionsrouten in Betrieben
- Höhere Qualitätskontrollmaßnahmen sowie Interventionsstrategien sollen so für die Verbesserung der Lebensmittelsicherheit und -hygiene zugänglich sein

Danksagung

Diese Studie wurde von der SFP des BfR und vom BMBF (Projekt CAMPY-TRACE, 031B0054A, PTJ-BIO) finanziert.

Danke für Ihre Aufmerksamkeit

Ewa Pacholewicz

Bundesinstitut für Risikobewertung
Diedersdorfer Weg 1, 12277 Berlin, GERMANY
Phone +49 30 - 184 12 - 1331
Fax +49 30 - 184 12 - 2966
ewa.pacholewicz@bfr.bund.de