

Etablierung eines real-time PCR-Assays zur Quantifizierung von *Vibrio parahaemolyticus* aus Lebensmitteln

Kathrin Oeleker¹, Susanne Fleischmann², Thomas Alter¹, Tassilo Seidler², Stephan Huehn¹

1 Institut für Lebensmittelhygiene, Freie Universität Berlin, Deutschland

2 Beuth Hochschule für Technik Berlin, Deutschland

Hintergrund

Vibrio (V.) parahaemolyticus zählt zu den bedeutendsten humanpathogenen Vertretern des Genus *Vibrio* und kommt ubiquitär in marinen Habitaten vor. Besonders an die Bedingungen von Küstengewässern angepasst, stellt das Bakterium einen bedeutenden Anteil der Flora des Gastrointestinaltraktes von Fischen und Wirbellosen dar. *V. parahaemolyticus* ist ebenfalls in der Lage, an bzw. in das Exoskelett von Krustentieren zu adhären, wodurch eine permanente Besiedelung der Oberfläche dieser Tiere erfolgt. Lebensmittelinfektionen mit *V. parahaemolyticus* werden regelmäßig in Zusammenhang mit dem Verzehr von rohen bzw. nicht ausreichend erhitzten, kontaminierten Fischen und Meeresfrüchten gebracht. Methoden zur schnellen und effektiven Detektion von *V. parahaemolyticus* aus den genannten Lebensmittelmatrizes sind vielfach in der Entwicklung. Die real-time PCR erlaubt anhand spezies-spezifischer Gentargets eine schnelle, sensitive und quantitative Detektion. Hierfür wird jedoch eine hoch reine bakterielle DNA benötigt, die frei von inhibierenden Substanzen aus der Lebensmittelmatrix ist. Die Isolierung von *V. parahaemolyticus* aus der Lebensmittelmatrix stellt daher eine Herausforderung dar.

Ziel dieser Arbeit war es, unterschiedliche Quantifizierungsansätze zur Isolierung von *V. parahaemolyticus* aus relevanten Lebensmittelmatrizes zu testen. Im Fokus stand die Prüfung der Anwendbarkeit der Matrixlyse. Vergleichend erfolgte die Prüfung eines direkten Verfahrens. Des Weiteren wurden Methoden zur Aufreinigung der bakteriellen DNA verglichen. Abschließend wurden bereits bestehende real-time PCR-Assays unter Nutzung der gewonnenen DNA getestet.

Ergebnisse & Diskussion

Mit Hilfe der Matrixlyse sollte aus der Lebensmittelmatrix eine kleine Menge an Bakterienzellen isoliert werden (Abb.1). Der Einsatz eines Sucrose-Puffers diente zur Stabilisierung der bakteriellen Zellmembran für die folgende Lysierung der Lebensmittelmatrix. Nach 30 min Inkubation bei 25 °C im Sucrose-Puffer wurde eine Vermehrung von *V. parahaemolyticus* um 1 log ermittelt. Eine Vermehrung konnte ebenfalls bei 4 °C beobachtet werden. Aufgrund der Fähigkeit von *V. parahaemolyticus*, Sucrose zu fermentieren und innerhalb von 10 Minuten einen gesamten Generationszyklus zu vollziehen sowie unter psychrotrophen Bedingungen zu wachsen, entfiel der Einsatz des Sucrose-Puffers, da die Vermehrung der Bakterienzellen eine quantitative Analyse verhindern würde.

Mit dem Einsatz eines Protease-Puffers, sowie eines Matrixlyse-Puffers fand nicht nur eine Lysierung der Lebensmittelmatrix, sondern auch eine Beschädigung der bakteriellen Zellmembran sowie der DNA statt. Durch den DNA-Verlust konnte ebenfalls keine quantitative Aussage getroffen werden.

Über die direkte Probenentnahme nach der Homogenisierung konnte ein fast verlustfreier Nachweis von *V. parahaemolyticus*-DNA aus natürlich kontaminierten Lebensmitteln erzielt werden. Alkalisches Peptonwasser (APW) stellte sich hierbei als optimale Verdünnungslösung dar. Bei der Verwendung von DNase freiem Wasser sowie Leitungswasser fand eine Reduktion der DNA-Konzentration von 0,5 log und mittels Aqua dest. von 1 log statt. Aufgrund der auftretenden mechanischen Belastung der Zellen sowie Schaumbildung wurde die Dauer der Homogenisierung auf eine Minute festgesetzt.

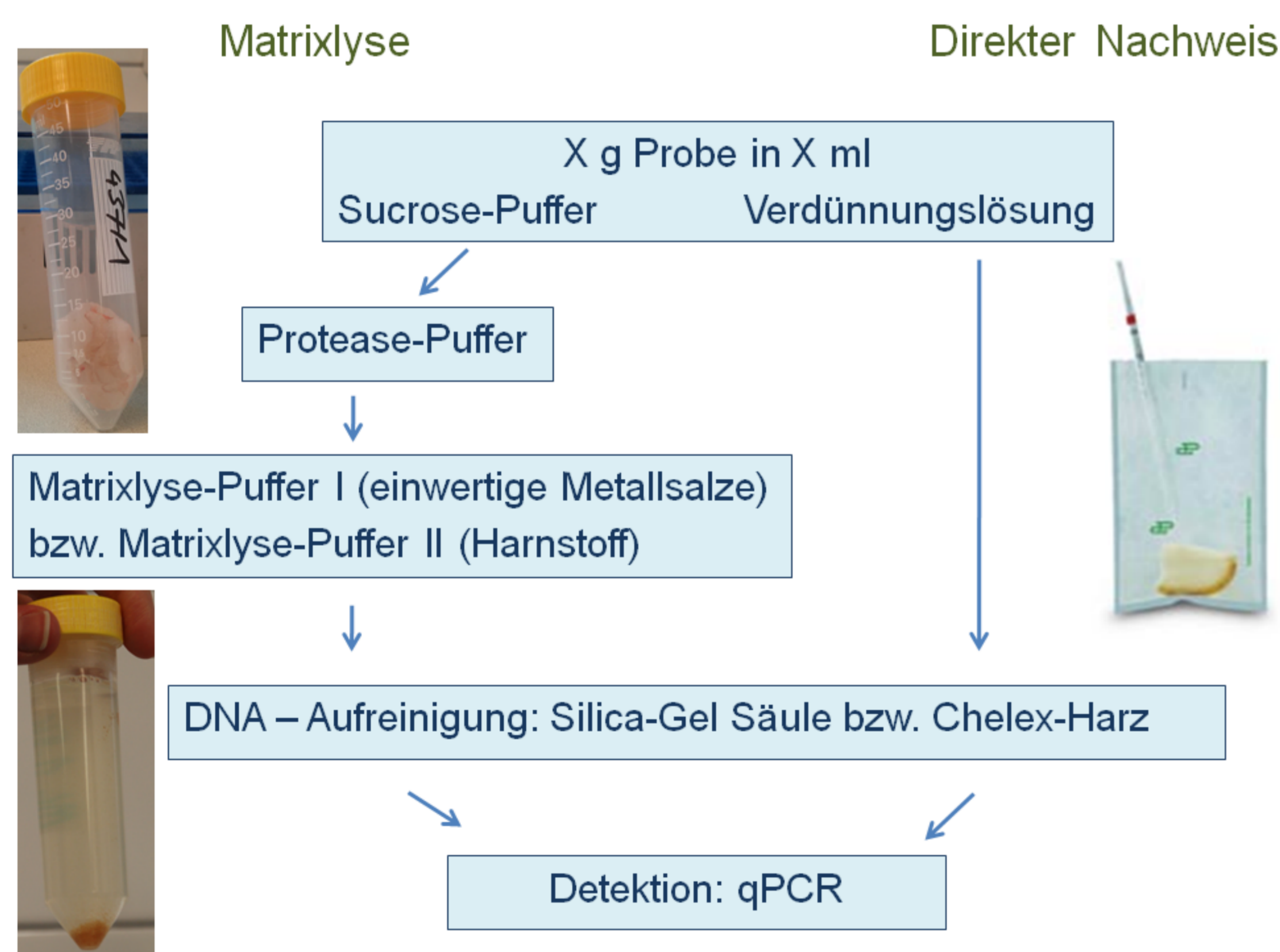


Abb.1 Fließschema des Versuchsaufbaus Matrixlyse im Vergleich zum direkten Nachweis

Im Vergleich der Methoden zur Gewinnung hoch reiner bakterieller DNA konnte mittels Silicagel-Säule eine optimale Aufreinigung für die sich anschließende Detektion mittels qPCR erzielt werden.

Für das qPCR-Assay zur Analyse natürlich kontaminierter Lebensmittel wurden zwei Genloci (*VP1331* und *gyrB*) bezüglich ihrer Nachweissicherheit verglichen. Der Nachweis beider Loci erfolgte vergleichend über zwei qPCR-Detektionssysteme mittels SYBR Green und TaqMan-Sonde.

Anhand von Standardkurven (Abb.2) des *V. parahaemolyticus*-Stammes SR3 und einer Standard-Prozesskontrolle des *V. parahaemolyticus*-Stammes PM15713 ergab sich eine Vergleichbarkeit der Detektionssysteme. Die Sensitivität lag hier bei 8,8 Genomäquivalenten (GÄ).

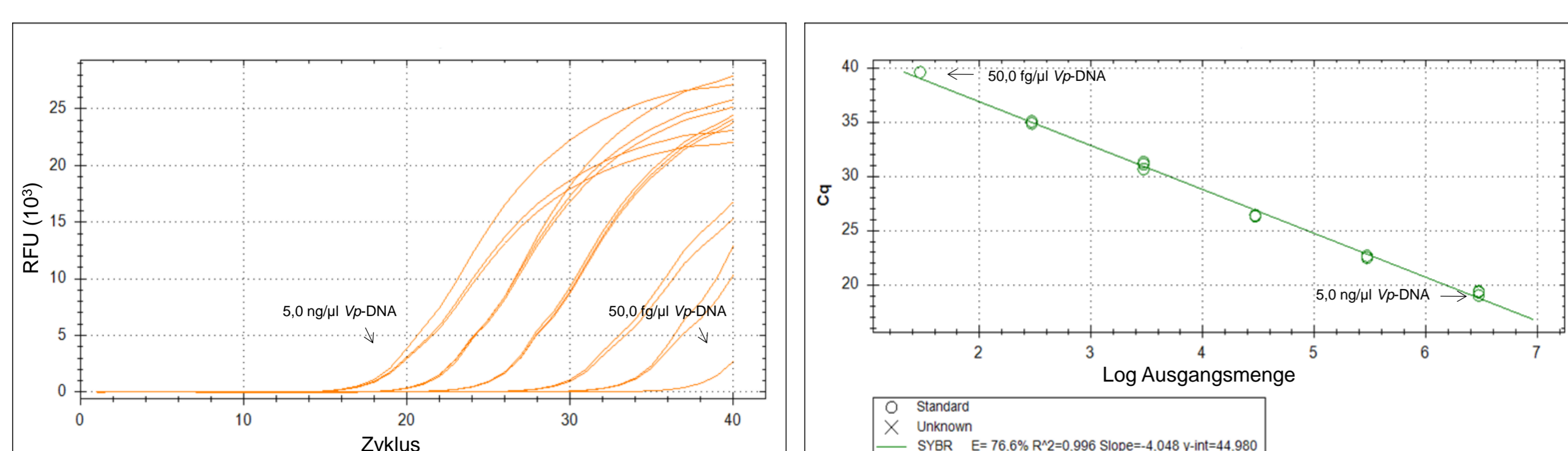


Abb.2 qPCR Standardkurve (SYBR Green)

Material und Methoden

Anzucht

Als Modellstamm diente ein aus Miesmuscheln isolierter *V. parahaemolyticus*-Stamm (SR3). Die Anzucht erfolgte unter aeroben Bedingungen in alkalischem Peptonwasser (APW) bei 37 °C für 12-16 h mit 200 rpm.

Artifizielle Kontamination (Spiking)

Als Lebensmittelmatrizes dienten tiefgefrorene sowie frische rohe Garnelen, Shrimps und Krabben aus dem Einzelhandel. Die artifizielle Kontamination erfolgte mit ca. 1×10^8 CFU, welche direkt zu dem 1:10 verdünnten Lebensmittelhomogenat hinzugegeben wurden.

DNA-Isolierung aus der Lebensmittelmatrix

Die Matrixlyse wurde nach Mayrl *et al.* (2009) [1] durchgeführt. Die Matrixlyse-Puffer basierten auf der Anwendung einwertiger Metallsalze sowie Harnstoff in Kombination mit Lutensol.

Für den direkten Nachweis wurde 1 ml des 1:10 verdünnten Lebensmittelhomogenates aus dem Seitenfilter des Stomacherbeutels entnommen. Als Lösungsmittel dienten APW, Aqua dest., Leitungswasser sowie DNase freies Wasser.

DNA-Aufreinigung

Die DNA-Aufreinigung erfolgte mittels einer 5 % Chelexharz-Lösung sowie vergleichend über ein Silica-Gel basiertes Säulensystem (Qiagen; Dneasy Blood & Tissue Kit).

Quantitative Detektion (qPCR)

Für die quantitative Detektion wurden die qPCR-Assays nach Liu *et al.* (2012) [2] und Cai *et al.* (2006) [3] angewandt.

Mit Hilfe des SYBR-Systems konnte anhand der Schmelzkurve die Spezifität der PCR-Reaktionen nachvollzogen werden. Der Schmelzpunkt des spezifischen *V. parahaemolyticus*-Produktes lag bei 83 °C (Abb.3).

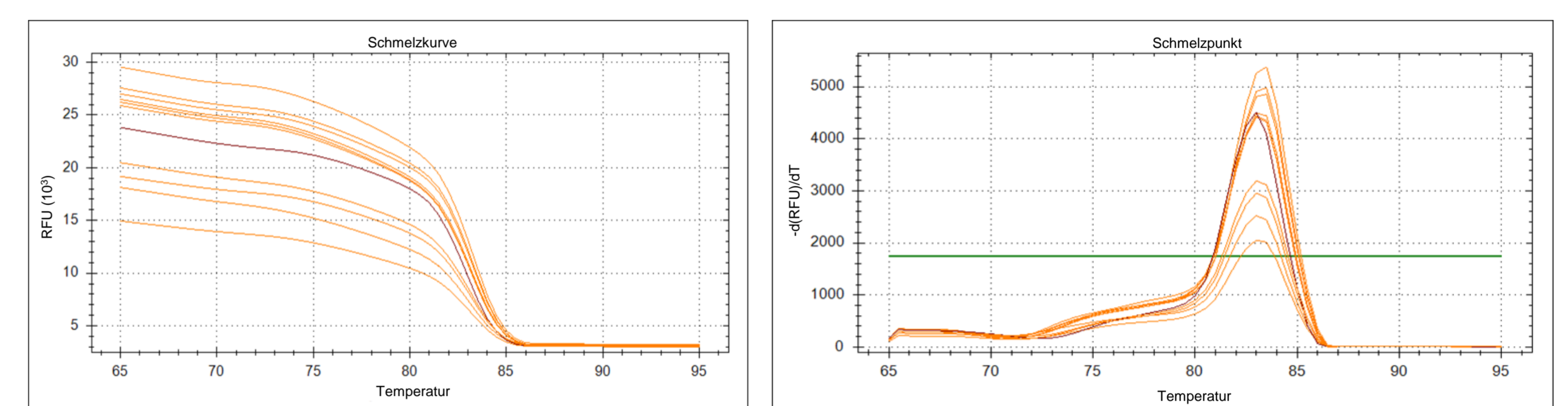


Abb.3 Schmelzkurven und Schmelzpunkte der Standards (SYBR Green)

Bei der Detektion des spezies-spezifischen Gens *VP1331* wurden aufgrund möglicher Mutationen dieses Genabschnittes bei den Wildstämmen unspezifische PCR-Reaktionen beobachtet. Der Sequenzabschnitt des *gyrB* Gens ist für *V. parahaemolyticus* essentiell und somit hochkonserviert. Mit Hilfe dieser Gensequenz ergab sich ein deutlich stabileres qPCR-Assay (Abb.4).

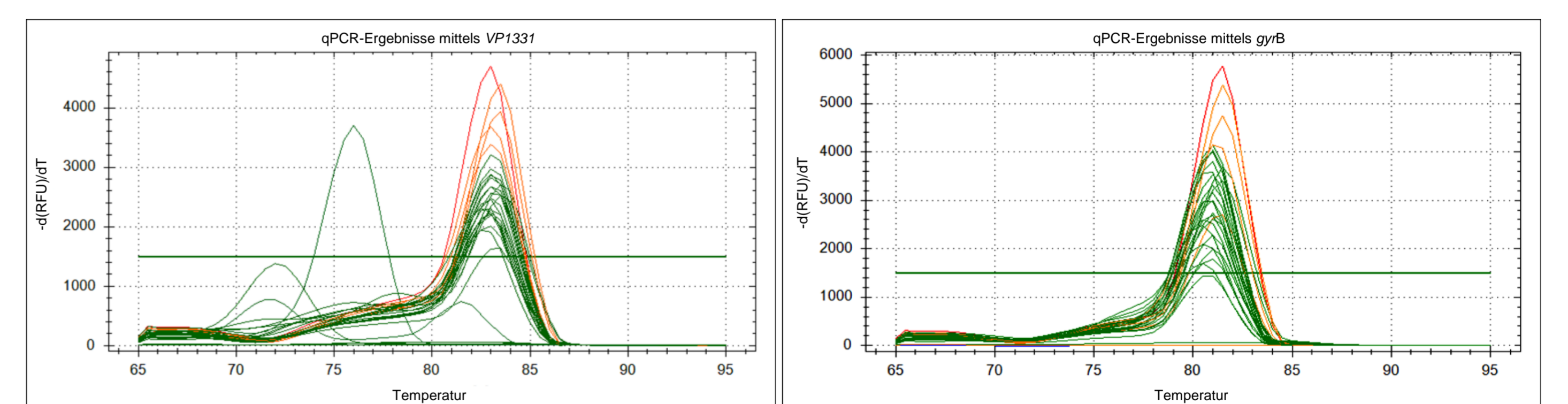


Abb.4 qPCR-Ergebnisse der Genloci *VP1331* und *gyrB* (SYBR Green)

Fazit

Zur Etablierung der Matrixlyse wurden zwei unterschiedliche Lysierungsansätze basierend auf einwertigen Metallsalzen und Harnstoff in Kombination mit Lutensol zum Schutz der Bakterien genutzt. Die Anwendung der Lyse-Puffer in Kombination mit Protease-Puffer fand mit und ohne vorausgehenden Sucrose-Puffer-Inkubation zum Zellschutz statt. Im Vergleich zur Matrixlyse ermöglichte der direkte Nachweis eine schnellere Analyse der Lebensmittelproben, wodurch ein Auflösen der Lebensmittelmatrix zur quantitativen Detektion von *V. parahaemolyticus* nicht notwendig war. Während der Etablierung des direkten Nachweises konnte bei der Nutzung von APW als Verdünnungslösung im Vergleich zu anderen Lösungen mit 0,5 bis 1 log ein höherer Anteil an *V. parahaemolyticus* ermittelt werden. Die Dauer der Homogenisierung wurde hierbei auf eine Minute festgelegt.

Die Gewinnung hoch reiner bakterieller DNA konnte durch den Einsatz eines Silica-Gel basierten Säulensystems realisiert werden.

Für das qPCR-Assay zur Analyse natürlich kontaminierter Lebensmittel wurden zwei Genloci, das spezies-spezifische Gen *VP1331* sowie das hoch konservierte *gyrB* Gen, in ihrer Nachweissicherheit verglichen. Der Nachweis beider Loci erfolgte über qPCR-Detektionssysteme mittels SYBR Green und TaqMan-Sonde mit einer Sensitivität von 8,8 GÄ. Aufgrund der Vergleichbarkeit der Ergebnisse konnte das gegen Inhibitoren aus der Lebensmittelmatrix empfindlichere TaqMan-Sonden-System durch das preisgünstigere SYBR-System ersetzt werden.

Das etablierte qPCR-Assay ermöglichte innerhalb eines Arbeitstages eine schnelle, hoch sensitive sowie quantitative Detektion von *V. parahaemolyticus* aus relevanten Lebensmittelmatrizes wie Shrimps, Garnelen und Krabben.

Literatur:
[1] Mayrl, E., Roeder, B., Mester, P., Wagner, M., Rossmanith, P., 2009. Broad range evaluation of the matrix solubilization (matrix lysis) strategy for direct enumeration of foodborne pathogens by nucleic acids technologies. *J Food Prot* 72, 1225-1233 [2] Liu, B., He, X., Chen, W., Yu, S., Shi, C., Zhou, X., Chen, J., Wang, D., Shi, X., 2012. Development of a real time PCR assay for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood. *Protein Cell* 3, 204-212 [3] Cai, T., Jiang, L., Yang, C., Huang, K., 2006. Application of real-time PCR for quantitative detection of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood in eastern China. *FEMS Immunol Med Microbiol* 46, 180-186

